

OBTENCION DE ANALOGOS DE PRODUCTOS NATURALES FURANONAFTOQUINONICOS Y EVALUACION DE SU ACTIVIDAD ANTIMALARICA FRENTE A *Plasmodium falciparum*

RESUMEN

La síntesis de los compuestos (1) y (2) fue realizada a través del uso de reacciones de ciclación y fotoadición. La posterior desacetilación de estos compuestos, permitió obtener (3) y (4) con anillo de furano. Los compuestos fueron evaluados como antimaláricos frente a cepas TG8 resistentes a cloroquina, obteniéndose para todos los casos una buena actividad, con valores de CI_{50} entre 3.16×10^{-6} a 1.52×10^{-5} M.

PALABRAS CLAVES: Tabebuia, Naftoquinonas, furanonaftoquinonas, malaria.

ABSTRACT

Compounds (1) and (2), were obtained by cyclization and photoaddition reaction, followed by deacetylation generating the compounds (3) and (4) with furan ring and found to show significant activity against chloroquine-resistant TG8 strain from Plasmodium falciparum. The CI_{50} was between 3.16×10^{-6} - 1.52×10^{-5} M.

KEYWORDS: *Tabebuia, Naphthoquinones, furanonaphthoquinones, malariae*

RICARDO GAITAN IBARRA

Químico Farmacéutico, Ph.D.
Profesor Titular
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Universidad de Cartagena
rigaitan2003@yahoo.es

EDUARDO ARGUELLO

Químico Farmacéutico, Ms.C.
Profesor Titular
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Universidad de Cartagena
eduardni@yahoo.com.mx

WILFREDO ALVAREZ

Estudiante de Química
Farmacéutica
Tesis
Universidad de Cartagena
wilfredoalvarez2001@yahoo.es

SAYDA JARABA SALGADO

Estudiante de Química
Farmacéutica
Tesis
Universidad de Cartagena
saydapaola@yahoo.es

1. INTRODUCCIÓN

La malaria es considerada actualmente como una enfermedad de países en vía de desarrollo, como consecuencia de muchos factores: poca disponibilidad al cuidado médico y carencia de herramientas de diagnóstico adecuadas en los países endémicos [1]. Se estima actualmente que la incidencia global de la enfermedad, varía entre 300-500 millones de casos clínicos anuales, de los cuales 1-3 millones son fatales [2], muchas de estas muertes se ubican en la población infantil menor de cinco años. En África donde ocurre el 90% de todos los casos de mortalidad mundial, la enfermedad es directamente responsable de la muerte de uno en cada cinco niños [3]. Más del 40% de la población mundial vive en áreas endémicas de malaria, éstas se encuentran ubicadas en regiones tropicales y subtropicales del planeta [4].

A través de la historia, han sido varios los esfuerzos con el fin de controlar la transmisión de la enfermedad [5], los mayores esfuerzos han estado dirigidos a la

eliminación del parásito (*plasmodium*) y el vector (mosquito *anopheles*), el desarrollo de vacunas ha sido también un invaluable esfuerzo [6]. La primera gran iniciativa fue llevada a cabo por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1955-1969) a través del Programa para Erradicación de la Malaria, controlando al vector, utilizando particularmente DDT, este esfuerzo aunque fallido en las zonas endémicas, consiguió la erradicación en el Sur de Europa, Norte de África y Medio Oriente. A pesar de todos los esfuerzos realizados por controlar la enfermedad, el número de casos de la malaria sigue en constante incremento [7], esto es debido principalmente, a la resistencia del mosquito a los insecticidas, y más preocupante, el rápido desarrollo de resistencia a los fármacos disponibles para combatirla [8], sin embargo, la reciente finalización del Proyecto genoma *Plasmodium falciparum* y *Anopheles gambiae* abre nuevas esperanzas para el futuro control de la enfermedad; mientras tanto, la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas, sigue siendo un aporte valioso para el control de la malaria [9].

En nuestro grupo de investigación aislamos de algunas bignoniaceas, compuestos del tipo furanonaftoquinonas, las cuales fueron evaluadas como antimaláricos frente a cepas de *Plasmodium bergheii* y *P. Falciparum* [10]. Teniendo en cuenta que muchos de estos compuestos no fueron evaluados por disponer de poca cantidad y que otros fueron ensayados como mezclas racémicas, nos propusimos obtenerlos sintéticamente, al igual que a sus análogos y de ser posible resolverlos en sus antipodas ópticas a fin de realizar ensayos más exhaustivos y concluyentes. En este trabajo presentamos la síntesis, caracterización y evaluación de la posible actividad antimalárica de algunos análogos furanonaftoquinónicos.

2. RESULTADOS Y DISCUSION

Para evaluar el efecto de una cadena lateral acetoxi en la posición dos del sistema furanonaftoquinonas, cuatro derivados fueron sintetizados y sus actividades determinadas en el ensayo. Los compuestos (1) y (2), fueron preparados de 2-OH-1,4-naftoquinonas y acetato de vinilo utilizando el procedimiento de Wu y col. [11], con fines comparativos el compuesto (1) fue sintetizado regioselectivamente por la ruta sintética de Kobayashi y col. [12] y los compuestos (3) y (4) por desacetoxilación en presencia de ácido p-toluensulfónico. La estructura de los compuestos (1) y (2) fueron determinadas por comparación de sus propiedades espectrales (principalmente EM y RMN¹H) con valores previamente reportados en la literatura [11-13], aunque los compuestos (1), (2) y (3), han sido sintetizados previamente, no encontramos reportes de síntesis para el compuesto (4).

La fotocicloación fue encontrada que era completamente regioselectiva; ningún isómero diferente a (1) fue detectado. La regioquímica esperada en vista de las observaciones previas, permitió obtener a (1) con un rendimiento de 28%, muy superior al obtenido por cicloación con CAN.

Cada uno de estos compuestos fueron evaluados como antimaláricos frente a *Plasmodium falciparum* y los valores de CI₅₀ fueron calculados (Tabla 1). La 2-Acetoxi-2,3-dihidronafto[2,3b]furan-4,9-diona (1) y la Nafto[2,3-b]furan-4,9-diona (3), presentaron la mayor actividad, mientras que los compuestos 2-Acetoxi-2,3dihidronafto[1,2b]-furan-4,5-diona (2) y Nafto[1,2-b]furan-4,5-diona (4), tuvieron una respuesta menor, aunque no muy distante de los valores reportado para (1) y (3).

Los resultados de actividad para los compuestos evaluados, nos permiten inferir que existe una estrecha relación entre la actividad biológica y la geometría de las moléculas. Aquellas que ordenan el sistema tricíclico de una forma lineal, presentaron la mejor respuesta en comparación con las del sistema tricíclico angular y que la presencia de los sustituyentes acetoxi en la posición dos del anillo furanoide, parece tener poca influencia en la manifestación de la respuesta.

Es de anotar que algunos compuestos furanonaftoquinónicos han sido evaluados como antimaláricos, sin embargo, ningún estudio de actividad antiplasmodio ha sido reportado para estos compuestos.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Generalidades:

La síntesis se realizó utilizando tres tipos de reacciones (figura 1), bajo condiciones de atmósfera inerte.

Los puntos de fusión fueron medidos en un Calorímetro diferencial de barrido DSC-7 Perkin Elmer, las lecturas obtenidas no fueron corregidas. Los espectros de IR se determinaron en un Microscopio FTIR Nic Plan. Los espectros de RMN¹H, fueron realizados en un espectrometro Bruker AM 300 MHz, utilizando cloroformo y acetona deuterada como solvente y TMS como estándar de referencia. Los espectrómetros de masa fueron obtenidos con un Cromatógrafo de gases Agilent HP 6890 con detector Selectivo de Masa HP 5973.

La silicagel utilizada en la cromatografía de columna fue Si gel Merck G60 (230-400 mesh), para la cromatografía en placa delgada preparativa utilizamos placas de Si gel GF₂₅₄ (Analtech, 500 µm, 20 x 20 cm).

La actividad de estos compuestos fue determinada utilizando el método HRP2 que se basa en la medición de la proteína rica en histidina (HRP2) producida por *P. falciparum* durante su desarrollo. Los experimentos se realizaron con la cepa 7G8 (Brasil) de *Plasmodium falciparum* resistente a cloroquina, mantenida en cultivo *in vitro* con la metodología de Trager & Jensen (1976) modificada en eritrocitos A+ a un hematocrito del 5%, en medio RPMI 1640 (SIGMA). Para el experimento se preparó una dilución del cultivo de la cepa 7G8 a un hematocrito del 3% y una parasitemia de 0.5% de anillos (cultivo sincronizado con sorbitol) de manera que el hematocrito en cada pozo de los platos al momento de la prueba era de 1.5%. Las concentraciones fueron ensayadas por triplicado

3.2 Reacción de ciclación: 2-Acetoxi-2,3-dihidronafto[2,3-b]furan-4,9-diona (1) y 2-Acetoxi-2,3-dihidronafto[1,2-b]furan-4,5-diona (2).

2-hidroxi-1,4-naftoquinona (0.34 g) y vinil acetato (2 mL) fueron disueltos en acetonitrilo (80 mL) a temperatura ambiente. Esta solución fué enfriada a 0°C y Nitrato amónico de cerio IV, CAN (2.2 g) fueron agregados a la solución, que cambió inmediatamente de amarillo a naranja. La reacción fué detenida después de 30 min. con una solución acuosa de cloruro de amonio. Después de la evaporación del exceso de solvente y alqueno, el producto fué extraído con acetato de etilo. La fase orgánica fué lavada con una solución acuosa de Bicarbonato de sodio y sal, secada con sulfato de sodio y concentrada a vacío. Se separaron los compuestos por columna cromatográfica, utilizando como eluente una

mezcla Hexano: Acetato de etilo (1:1). Cada fracción fué concentrada y cristalizada de diclorometano para dar los compuestos:

2-Acetoxi-2,3-dihidronafto[2,3-b]furan-4,9-diona(1) : Cristales amarillos (50 mg, 9.94%), p.f 192.2 °C ; ¹H RMN δ 2.12 (3H,s), 3.15(1H,dd), 3.42(1H,dd), 6.98(1H,dd), 7.72(2H,m), 8.11(2H,m); ¹³C RMN δ 21.11, 33.56, 98.85, 123.28, 126.22, 126.50, 131.04, 132.787, 133.36, 134.30, 158.24, 168.49, 176.60, 181.98; EM m/z 258[M⁺], 216, 198, 188, 170, 160; TR 15.903; IR (Nujol) 1760,1682.7, 1662.3, 1629.8, 1592.6, 1574.

2-Acetoxi-2,3-dihidronafto[1,2-b]furan-4,5-diona(2) : Cristales naranja (54mg, 10.73%), P.F 157.3 °C ; IR(Nujol) 1750, 1694.1, 1647.8, 1614; EM m/z 216, 198, 188, 170, 160; TR 15.908.

3.3 Reacción de fotoadición: 2-Acetoxi-2,3-dihidronafto[2,3-b]furan-4,9-diona (1).

La reacción de 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (0.34 g) con acetato de vinilo (1.9 mL) en acetona (80mL) por 7 h a temperatura ambiente se concentró al vacío y después de separar cromatográficamente, utilizando como eluente Diclorometano, se obtuvo una fracción amarilla que se concentró al vacío y cristalizó de este mismo solvente dando el compuesto 2-Acetoxi-2,3-dihidronafto[2,3-b]furan-4,9-diona(2) como cristales amarillos (136 mg, 28 %).

3.4 Reacción de desacetoxilación Nafto[2,3-b]furan-4,9-diona(3).

La mezcla de 2-Acetoxi-2,3-dihidronafto[2,3-b]furan-4,9-diona (1) (159mg) y p-TsOH (53mg) en Benceno seco(19mL) fué colocada en reflujo por 4 h. la solución inicialmente amarilla se tornó a un color café. Posteriormente, la mezcla fué tratada con una solución salina y secada con Sulfato de sodio, concentrada al vacío y purificada por columna cromatográfica utilizando como eluente Cloroformo. El compuesto Nafto[2,3-b]furan-4,9-diona (3) fué obtenido como cristales amarillos [13] (80mg, 65.6%). RMN δ 7.08(1H,d), 7.89(2H,m), 8.17(3H,m); ¹³C RMN δ 110.1, 128.3, 128.4, 135.8, 135.9, 151.5, 207.1; EM m/z 198 [M⁺], 170, 142, 114; TR 2.80; IR 1618.3 cm⁻¹, 1651.1 cm⁻¹, 1694.8 cm⁻¹.

3.5 Nafto[1,2-b]furan-4,5-diona(4).

La mezcla de 2-Acetoxi-2,3-dihidronafto[1,2-b]furan-4,5-diona (2), (118mg) y p-TsOH (41mg) en benceno seco (15mL), fué colocada en reflujo por 4 h. el producto de la reacción fué tratado con solución salina y secado con sulfato de sodio, concentrado al vacío y purificado por cromatográfica utilizando como eluente cloroformo. El compuesto Nafto[1,2-b]furan-4,5-diona (4) fué obtenido como cristales rojos (43mg, 47.8%). RMN¹H δ 6.91(1H,d), 7.58(2H,m), 7.79(1H,m), 7.85(1H,d),

8.00(1H,d); RMN ¹³C δ 110.2, 123.9, 131.6, 132.0, 137.1, 147.8, 207.1; EM m/z 198, 170 [M⁺], 142, 114; TR 3.40; IR 1592.6 cm⁻¹, 1662.3 cm⁻¹, 1682.7 cm⁻¹.

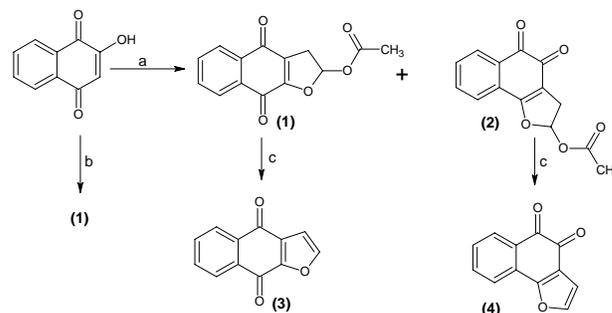


Figura 1. a) 2-OH-1,4-naftoquinona, acetato de vinilo, acetonitrilo, CAN, 30 min., 0 °C; b) 2-OH-1,4-naftoquinona, acetato de vinilo, acetona, 7h, T.A; c) p-TsOH, benceno (seco), 4h, reflujo.

3.6 Ensayos de actividad

De acuerdo con la CI₅₀ obtenida para cada extracto se consideró que aquellos con CI₅₀ menor o igual que 5 µg/mL presentan muy buena actividad antiplasmodio, entre 5 y 10 µg/mL presentan buena actividad y mayor que 10 µg/mL se consideran inactivos (Deharo, *et al.*, 2000).

| Compuesto | CI ₅₀ | Actividad |
|---|--|-----------|
| 2-Acetoxi-2,3-dihidronafto[2,3-b]furan-4,9-diona(1) | 5.89 x 10 ⁻⁶ M 1.521 ug/mL | Muy buena |
| 2-Acetoxi-2,3-dihidronafto[1,2-b]furan-4,5-diona(2) | 1.52 x 10 ⁻⁵ M 3.922 ug/mL | Muy buena |
| Nafto[2,3-b]furan-4,9-diona(3) | 3.16 x 10 ⁻⁶ M 0.626 ug/mL | Muy buena |
| Nafto[1,2-b]furan-4,5-diona(4) | 1.49 x 10 ⁻⁵ M 2.947 ug/mL | Muy buena |
| Cloroquina | 1.97 x 10 ⁻⁷ M 0.082 ug/mL | Muy buena |

Tabla 1. Sensibilidad de la cepa 7G8 cloroquina-resistente de *P.falciparum* contra los compuestos sintetizados.

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se obtuvo cuatro análogos furanonaftoquinónicos: dos dihidrofuranonaftoquinonas y dos furanonaftoquinonas, cuyas estructuras fueron confirmadas por análisis espectroscópicos. Los ensayos de actividad mostraron que los compuestos tienen muy buena actividad antimalárica siendo resultados promisorios. Se recomienda hacer pruebas de efecto hemolítico y citotoxicidad antes que cualquier otra, ya que en algunos compuestos se observó cambio de color en los pozos,

tornándose cafés o rojos muy oscuros, lo que generalmente en el cultivo in vitro de *P. falciparum* coincide con hemólisis total o casi total y/o muerte de la mayoría de los parásitos. Desde el punto de vista relación estructura química-actividad biológica, la geometría de las moléculas juega un papel importante en la actividad, siendo las lineales más activas que las angulares para todos los casos, de igual manera la prolongación de la conjugación es importante ya que los análogos furánicos (3) y (4) fueron más activos que sus análogos acetoxilados.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores de este trabajo, deseamos expresar nuestro más sincero agradecimiento a Colciencias y a la Universidad de Cartagena por el apoyo financiero brindado, código 1107-04-16527 y al Grupo malaria de la Universidad de Antioquia por la realización de los ensayos de actividad antimalárica.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] BREMAN J. The Eras o the Hippopotamus: Manifestations, Dterminants and Estimates o the malaria Burden. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 64 (1,2), 1-11, 2001.
- [2] World Heath Organization (2002) The World Health Report 2002: Reducing Risks, Promoting Healthy lie. Annex Table 2. Deaths by Cause, Sex and Mortality Stratum in WHO Regions: Geneva, 2002; pp. 186-191.
- [3] World Heath Organization (1999) The World Health Report 1999: Making a difference: Geneva,1999; pp. 49-63.
- [4] SACHES, J; MALANEY,P. The Economic and Social Burden o Malarie. *Nature* 415, 680-685, 2002.
- [5] ALILIO Martín, S. BYGBJERG, I.C.; BREMAN, J.G. Are Multilateral Malaria Research and Control Programs The Most Successful?. Lessons rom the Past 100 years in Arica. *Am. J. Trop. Medicine Hyg.* 71, 268-278, 2004.
- [6] RICHIE, T. L.; SAUL A. Progress and Challenges or Malaria vaccines. *Nature*, 415, 694.701, 2002.
- [7] SNOW, R.W.; TRAPE,J; MARSH, K. The Past, Present and future of Childhood Malaria, Mortality in Africa. *Trends. Parasitol.* 17, 593-597, 2001.
- [8] Greenwood, B.; Mutabingwa, T. Malaria in 2003. *Nature* (London United Kingdom), 415, 670-672, 2003.
- [9] HOMAN, S.L.;SUBRAMANIAN, G.M. Collins Rank, H. Venter, J.C. Plasmodium, Human and anopheles Genomics and malaria. *Nature* 415,702-709, 2002.
- [10] PÉREZ. H. DÍAZ. F y MEDINA. J. D. Chemical investigation and in vitro antimalarial activity of *Tabebuia ochracea* ssp. *Neochrisantha. Internacional Journal of Pharmacognosy.* Vol 35 N°4, pag 227, 1997.
- [11] CHONGMING Wu, RANDAIL K. Johnson, Michael R. Mattern, Jackson C. Wong and David G. I. Kingston. Synthesis of Furanonaphthoquinones with Hydroxyamino Side Chains. *J. Nat. Prod.*, 62, 963-968, 1999.
- [12] KOBAYASHI. Kazuhiro, Hideki Shimizu, Akiyoshi Sasaki and Hiroshi Suginome. Photoinduced Molecular Transformations.140. New One-step General Synthesis of Naphtho-[2,3-b]-furan-4,9-diones and Their 2,3-Dihydro Derivates by the Regioselective [3+2] Photoaddition of 2-hydroxy-1,4-naphthoquinones with Various Alkynes and Alkenes: Application of the Photoaddition to a Two-Step Synthesis of Maturinone. *J. Org. Chem.* , 58, 4614-4618, 1993.
- [13] YONG Rok. Lee.; BYUNG So Kim.; YONG Ug Jung.; WHA Soon Cha.; Nam Woo Kim. Facile Sinthesis of Avicequinone-B Natural Product. *Sinthetic Communications.* , 32, 3099-3105,2002.