

# **MOLÉCULAS BIOACTIVAS CONTRA Leishmania (Viannia) panamensis. ACTIVIDAD Y OPTIMIZACIÓN MOLECULAR**

**DIANA PATRICIA CARDONA SÁNCHEZ**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de Doctora en Ciencias Químicas  
Tutor: Luis Fernando Echeverri L. Ph. D Cotutor: Winston Quiñones F., Ph. D.

**Universidad de Antioquia**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Posgrado en Ciencias Químicas

**MEDELLIN, 2006**



# Tabla de contenidos

RESUMEN .	1
AGRADECIMIENTOS .	3
INTRODUCCION .	5
Antecedentes .	7
1.1 Leishmaniosis . .	7
1.1.1 Distribución . .	8
1.1.2 Etiología . .	10
1.1.3 Manifestaciones Clínicas de la Leishmaniosis .	15
1.1.4 Medicamentos contra la Leishmaniosis . .	18
1.2 Productos naturales y la búsqueda de antiparasitarios .	19
1.3 Química Computacional . .	21
1.4 Bibliografía .	23
2. OBJETIVOS . .	29
2.1 Objetivo General .	29
2.2 Objetivos específicos . .	29
3. RESULTADOS Y DISCUSION .	31
3.1 Estudio experimental y computacional de la actividad leishmanicida de withajardinas y acnistinas .	31
3.1.1 Introducción .	31
3.1.2 Withanolidos . .	31
3.1.3 Actividad Leishmanicida .	33
3.1.4 Química Computacional . .	37
3.1.5 Conclusiones .	45
3.1.6 Bibliografía .	46
3.2 Isósteros (Cromanos) como farmacóforos leishmanicidas <i>in vitro</i> . .	47
3.2.2 Benzopiranos .	48

3.2.3 Resultados y Discusion . . .	49
3.2.4. Conclusiones . . .	54
3.2.5 Bibliografía . . .	54
3.3 Evaluación preliminar de la actividad leishmanicida de varias especies de la familia Solanaceae . . .	55
3.3.1 Introducción. . .	55
3.3.2 Actividad Leishmanicida . . .	56
3.3.3 Conclusiones . . .	61
4. CONCLUSIONES . . .	63
5. MATERIALES . . .	65
5.1 MATERIAL VEGETAL . . .	65
5.2 MATERIAL BIOLÓGICO . . .	66
5.3 SOLVENTES Y REACTIVOS . . .	66
5.4 MATERIALES CROMATOGRÁFICOS. . .	67
5.5 OTROS EQUIPOS . . .	67
5.6 SOFTWARE . . .	67
6. PARTE EXPERIMENTAL . . .	69
6.1 ASPECTOS GENERALES . . .	69
6.2 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE SUSTANCIAS DE ORIGEN NATURAL . . .	69
6.2.1 Withajardinas y Acnistinas . . .	70
6.2.2 Hiosciamilactol y Larnaxolida A . . .	70
6.3 TRANSFORMACIONES HEMISINTÉTICAS DE LOS CROMANOS . . .	70
6.3.1 Obtención de 6-nitro y 8-nitro-cromanona (Compuestos 1 y 2 respectivamente) . . .	70
6.3.2 Obtención de 6-nitrotiocromeno (3) . . .	70
6.3.3 Obtención de 4-acetilcromano (4) . . .	71
6.3.4 Obtención de 4-acetiltiocromano (5) . . .	71
6.3.5 Obtención de 1- tiocromanona - sulfóxido (mezcla enantiomérica 6) . . .	71
6.3.6 Obtención de tiocromanona sulfona (7) . . .	72
6.3.7 Obtención de 4-tiocromanol-sulfóxido (8), (9) y (10) . . .	72

6.3.8 Obtención de 4-tiocromanol sulfona (11) . .	72
6.3.9 Obtención de tioxanten- 9-ona sulfona (12) . .	72
6.3.10 Obtención de 2-fenil-1-tiocromeno-sulfóxido (13) . .	73
6.3.11 Obtención de 2-fenil-1-tiocromeno sulfona (14) .	73
6.4 BÚSQUEDA DE ESPECIES CON ACTIVIDAD LEISHMANICIDA .	73
6.4.1 Colección y Selección del material. .	73
6.4.2 Obtención de extractos .	73
6.5 ENSAYOS BIOLÓGICOS . .	74
6.6 MÉTODOS COMPUTACIONALES .	75
6.7 CARACTERÍSTICAS ESPECTROSCÓPICAS .	75
6.8 BIBLIOGRAFÍA .	81
7. PERSPECTIVAS .	83
8. PUBLICACIONES .	85
Anexos . .	89
ANEXO 1 . .	89



## RESUMEN

La leishmaniosis es una enfermedad que se encuentra dentro del grupo llamado “Enfermedades

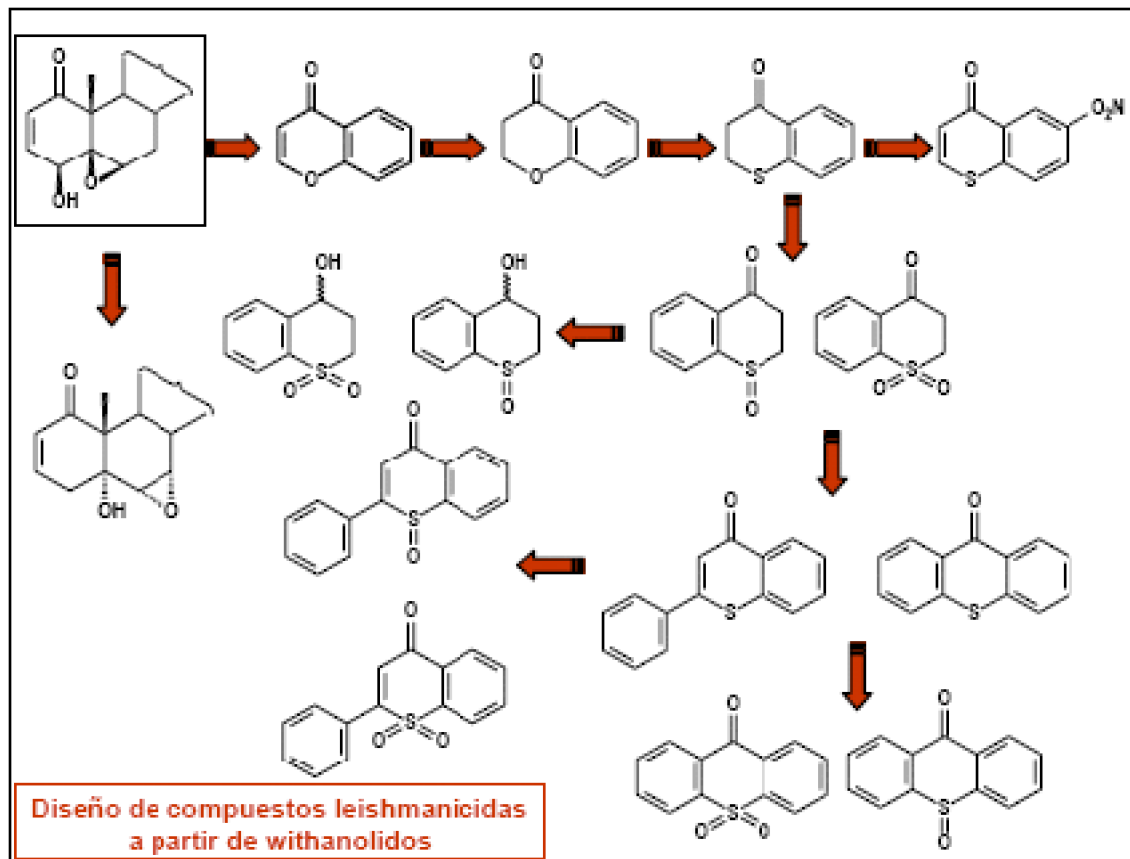
Huérfanas”, dado el poco interés que generan para la industria farmacéutica. En Colombia la población expuesta es de unos 10 millones de habitantes y en el 2005 se registraron 8115 casos por el SIVIGILA. Se dispone de pocos medicamentos con actividad reducida reducida e incluso hay resistencia por el parásito.

Los productos naturales han sido una fuente valiosa de moléculas bioactivas y algunos de ellos, como la quinina y la artemisinina, han sido fuente de antiparasitarios. En esta tesis se planteó el estudio del efecto de dos tipos de productos naturales, las withajardinas y las acnistinas, sobre amastigotes de *Leishmania (V.) panamensis*, ya que por su similitud estructural podrían modificar o bloquear la biosíntesis de esteroides en el parásito. Si bien los resultados indicaron una intensa actividad leishmanicida también se detectó una alta citotoxicidad. Ambos eventos biológicos son dependientes de la estructura y están íntimamente ligados según los estudios de modelación molecular que se desarrollaron.

Sin embargo, a partir del sistema farmacofórico formado por los anillos A y B, se generó una cabeza de serie del tipo cromano, que por modelación molecular y bioensayos guiados produjo sustancias con una actividad similar al de las acnistinas y withajardinas, pero con menor toxicidad.

También se desarrolló la búsqueda de otros farmacóforos en plantas taxonómicamente afines, con una aproximación etnobotánica. De esta manera se obtuvo un nuevo farmacóforo emparentado con las acnistinas y withajardinas, pero prácticamente atóxico.

El esquema siguiente ilustra las etapas que permitieron generar nuevas moléculas bioactivas contra *Leishmania (V.) panamensis* en esta tesis.



*Diseño de compuestos leishmanicidas a partir de withanolidos*



---

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Maria Libia y Jesús.

A mi hermano, Yobany.

A la Familia Sánchez Arenas.

Agradezco a Colciencias y la Universidad de Antioquia por permitir el acceso a la Beca-Crédito y la financiación de la tesis.

Al posgrado en Ciencias Químicas por sus gestiones y apoyo durante la realización del doctorado.

Al profesor y amigo Ramiro Fonnegra, por sus enseñanzas y amabilidad; es alguien de quien tengo muchísimo por aprender.

A los Drs. Iván Darío Vélez, Sara Robledo e integrantes de su grupo (PECET-Universidad de Antioquia), que siempre brindaron su asesoría y colaboración en el desarrollo de los ensayos biológicos y desarrollo del proyecto.

Al Dr. Scott G. Franzblau, Director del Institute for Tuberculosis Research- University of Illinois at Chicago, por darme la oportunidad de desarrollar la pasantía en su institución y brindarme su apoyo en todo lo que a su alcance tuviera para el desarrollo de mi tesis. De igual manera al grupo que el coordina, quien dedicó todo su tiempo y disposición para dar el entrenamiento y la asesoría que necesité.

Al Instituto de Ciencias Naturales (ICN) de la Universidad Nacional de Colombia y los investigadores Rafael Notario y Víctor Cruz del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC - España) por su colaboración en la parte botánica y cálculos de modelación molecular respectivamente .

Al profesor Bernardo Vicente por su amistad y apoyo incondicional durante el desarrollo de mi tesis.

A los profesores del grupo de investigación, Fernando Torres, Rosendo Archbol, Gloria Cardona, Tatiana Lobo y Gustavo Escobar por su diligente colaboración y apoyo.

A los profesores de la Facultad de Química Farmacéutica: Gloria Holguin, Oscar Florez,

Adriana Ruiz, Nohelia Gómez, Margarita Restrepo, Carlos Cataño, Rafael Salamanca y Amanda Mejía, por brindarme su apoyo incondicional y estar siempre pendientes de mis logros y dificultades.

A Edwin Correa, Walter Murillo, Antony Rueda, Diana Lorena y Lina Carrillo gracias por su colaboración en los momentos más importantes en el desarrollo de la tesis.

A mis compañeros de laboratorio de Química Orgánica de Productos Naturales: Yony, Jesus, Diego, Juliana, Alvaro, Wilson, Adriana, Guillermo, Jorge Ivan, Cesar, Ana Maria, Andrei, Natalia, Javier y Marinelda por que con ellos compartí horas de trabajo, alegrías y dificultades.

A mis grandes amigas Luz Marina, Janeth y Noreley porque siempre han estado en los momentos que más las he necesitado.



# INTRODUCCION

Las enfermedades infecciosas endémicas tales como la Leishmaniosis, Malaria, Enfermedad de Chagas y Tuberculosis son responsables de la mayor morbilidad y mortalidad en el ámbito mundial, especialmente en los países en desarrollo; la primera de ellas afecta alrededor de 12 millones de personas en 88 países, con una incidencia anual cercana a 2 millones de casos y 500.000 muertes. Desde hace 60 años el tratamiento se basa en el empleo de sales de antimonio; no obstante, su eficacia ha disminuido ostensiblemente por la aparición de cepas resistentes lo cual al parecer se asocia con tratamientos incompletos debido a los efectos secundarios, la duración del tratamiento, la consecución del medicamento y la vía de administración. Por estas razones amplios grupos de la población acuden a tratamientos empíricos con cáusticos o con plantas para tratar de curar la enfermedad.

En vista del panorama anterior, en esta tesis se pretende contribuir a la búsqueda de nuevas moléculas y modelos estructurales que permitan obtener en un futuro no lejano nuevos tratamientos que mejoren las expectativas de vida de la población afectada por esta enfermedad.

El trabajo desarrollado comprende tres fases. La primera de ellas se relaciona con el estudio de la acción leishmanicida de dos clases de esteroides, las withajardinas y acnistinas y el análisis de sus propiedades estructurales y electrónicas mediante modelación molecular.

Como consecuencia se desarrolla en la segunda fase la aproximación a un farmacóforo, el cual nuevamente se somete a modificaciones estructurales y análisis de

actividad. Finalmente en la tercera fase y debido a la dificultad para modificar la toxicidad de los withanolidos evaluados, sin afectar la actividad se han buscado extractos de plantas pertenecientes a la familia Solanaceae en los cuales se puedan encontrar farmacóforos con mejores propiedades farmacológicas.

Esta tesis se desarrolló en el Grupo de Química Orgánica de Productos Naturales, en cooperación con los grupos de investigación de la Universidad de Antioquia: Estudios Botánicos y el PECET; el Grupo de Taxonomía y Sistemática Botánica del ICN de la Universidad Nacional de Colombia y los investigadores Rafael Notario y Victor Cruz del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC-Madrid-España).

# Antecedentes

## 1.1 Leishmaniosis

La Leishmaniosis se describe como una serie de enfermedades antropozoonóticas con una diversidad epidemiológica y clínica importante<sup>1</sup>. Es causada por un parásito perteneciente al género *Leishmania* y transmitida a través de la picadura de insectos dípteros hembra del género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y al género *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo. Aunque existen otras posibles vías de transmisión como congénita, sexual y transfusión sanguínea. Afecta tejido cutáneo, mucosas y órganos del sistema mononuclear fagocítico, produciendo los cuadros clínicos de Leishmaniosis cutánea, mucocutánea, cutánea difusa y visceral.



*Figura 1.*

Formas clínicas de la Leishmaniasis (Fotos PECET, Modificado de Agudelo et al., 2000)<sup>3</sup>

### **1.1.1 Distribución**

La Leishmaniasis es una enfermedad endémica con una amplia distribución a nivel mundial: se encuentra en los cinco continentes, afectando 88 países, de los cuales 72 se encuentran en vía de desarrollo. Tiene una prevalencia en 12 millones de personas y una población en riesgo de 350 millones de individuos. La incidencia anual estimada es de 1.0 a 1.5 millones de casos por Leishmaniasis cutánea y 500.000 casos debido a la Leishmaniasis visceral. Sin embargo, se considera que el número de casos que se presentan a nivel mundial es mayor que el reportado oficialmente<sup>1</sup>. En Estados Unidos donde no se tenían reportes en la actualidad es considerada como una zoonosis emergente.

A su vez el riesgo de coinfecciones *Leishmania* / VIH está correlacionado con cambios en el modelo de dispersión de las dos enfermedades; en ciertos países la Leishmaniosis visceral está llegando a ser más urbana presentándose en los suburbios de grandes ciudades y simultáneamente el VIH está alcanzando progresivamente, las áreas rurales<sup>1</sup>.

En Colombia la Leishmaniosis es una enfermedad endémica, en el transcurso de 2005, se registraron por el SIVIGILA5 8115 casos de Leishmaniosis. Del total de casos registrados, 8058, 99.3% fueron de Leishmaniosis Cutánea (Figura 2); 0.4% de Leishmaniosis Mucosa y 0.3% de Leishmaniosis Visceral. Este número representa un aumento del 25.6% (5998 casos), en el número absoluto de casos con relación a lo observado en el año 2004 el cual presentó un total de 5620 casos.

La Leishmaniosis continúa siendo un problema de salud pública importante y a pesar de algunos esfuerzos para eliminar el vector y reducir las poblaciones de mamíferos reservorios, la falta de continuidad en los programas de control, principalmente debido a los altos costos, ha favorecido la reemergencia de la enfermedad y la aparición de cepas de *Leishmania* que no responden efectivamente al tratamiento con Glucantime.

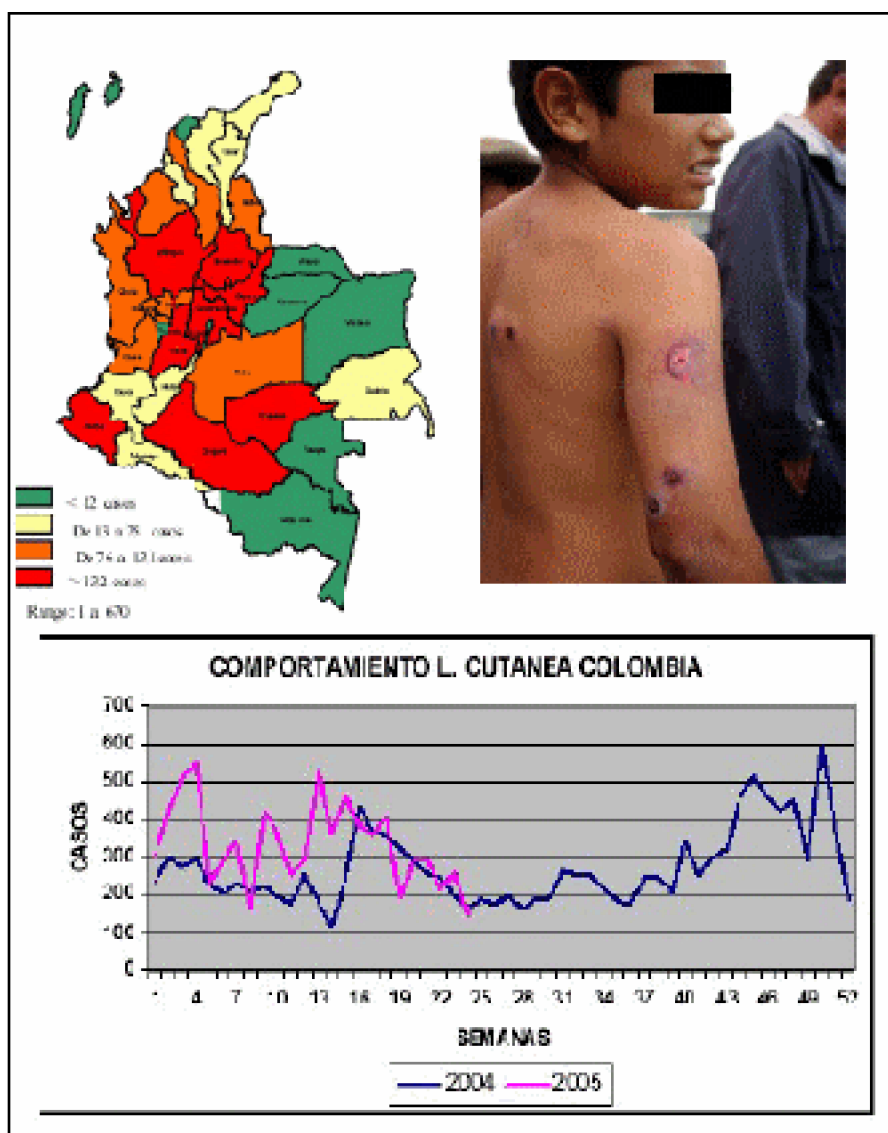


Figura 2.

Comportamiento de los casos de Leishmaniosis cutánea en Colombia año 2005. (Modificado de SIVIGILA 20055 y Molano A.7)

## 1.1.2 Etiología

### 1.1.2.1 Características del Parásito

El género *Leishmania* es un grupo de protozoos flagelados pertenecientes a la familia Trypanosomatidae, orden Kinetoplastide, que requiere esencialmente dos hospederos diferentes para completar su ciclo biológico: (a) un insecto que cumple el papel de vector del parásito y (b) un vertebrado, principalmente mamíferos incluyendo al humano, que cumple el papel de reservorio o de hospedero definitivo.

El parásito presenta dos estadios (Figura 3): el promastigote (forma extracelular) y el



amastigote (forma intracelular) El promastigote es una forma móvil de aproximadamente veinte micras de largo que posee un flagelo adherido a un organelo similar a la mitocondria, llamado kinetoplasto. Metabólicamente, utilizan aminoácidos y azúcares como fuente principal en condiciones aeróbicas. El pH (7) y temperatura de desarrollo (25-27 °C) de este estadio del parásito, claramente se parecen a las condiciones biológicas del intestino del insecto.

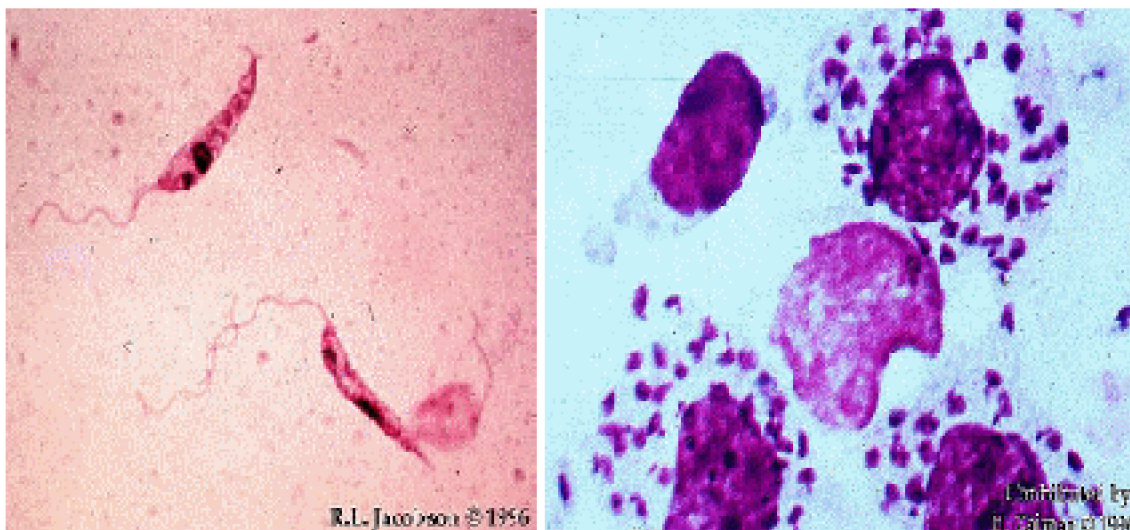


Figura 3.

Estadios de desarrollo de *Leishmania* sp<sup>8</sup>,

Los amastigotes viven dentro de vacuolas lisosomales de las células fagocíticas<sup>2</sup>. A diferencia de los promastigotes carecen de flagelo y presentan una forma ovalada o redondeada y miden de dos a cinco micras de diámetro mayor, poseen núcleo, generalmente excéntrico y adyacente a éste se encuentra el kinetoplasto<sup>3</sup>. Su pH y temperatura óptima de desarrollo es de 4-5 y 37 °C respectivamente. Bioquímicamente su principal fuente de energía son los ácidos grasos de cadena larga los cuales puede transformar en CO<sub>2</sub> y agua en mayor grado que los promastigotes.

El género de *Leishmania* se divide en dos subgéneros, *Leishmania (Leishmania)* sp. y *Leishmania (Viannia)* sp<sup>10</sup>(Tabla 1).

<b>ESPECIES</b>	<b>ENFERMEDAD</b>	<b>UBICACIÓN GEOGRÁFICA</b>
<i>L. (L.) donovani</i>	LV, LDPKZ	India, Norte y Este de China, Pakistán y Nepal
<i>L. (L.) infantum</i> <sup>a</sup>	LV	Mediterráneo, Balcanes, Asia, Noroeste de China, Norte y Sub Sahara
<i>L. (L.) chagasi</i> <sup>a</sup>	LV, LC (rara)	Latino América
<i>L. (L.) Archibuxi</i>	LV, LC	Sudan, Kenya y Etiopía
<i>L. (L.) major</i>	LC	Noroeste de China, Noroeste de India, Pakistán y Africa
<i>L. (L.) tropica</i>	LC, LV	Mediterráneo, Región Asiática del Oeste, India
<i>L. (L.) anthracis</i>	LC, LCD	Etiopía Kenya, Yemen
<i>L. (L.) mexicana</i>	LC, raramente LM	México, Centro América y Texas
<i>L. (L.) amazonensis</i>	LC, LCD, raramente LV	Amazonas, Brasil
<i>L. (L.) pifanoi</i>	LC, LCD	Venezuela
<i>L. (L.) gamhiani</i>	LC	Venezuela
<i>L. (L.) venezuelensis</i>	LC	Venezuela
<i>L. (V.) braziliensis</i>	LC, LM	Latino América
<i>L. (V.) guyanensis</i>	LC	Guyana, Surinam, Amazonas
<i>L. (V.) peruviana</i>	LC	Perú, Argentina
<i>L. (V.) panamensis</i>	LC	Panamá, Costa Rica, Colombia

Abreviaturas: LV (Leishmaniosis visceral), LDPKZ (Leishmaniosis pérmica pos-kala-azar), LC (Leishmaniosis cutánea), LCD (Leishmaniosis cutánea difusa).

Aunque difieren en nombre y origen geográfico, datos moleculares sugieren que *L. infantum* y *L. chagasi* pueden ser la misma especie.

*Tabla 1.*

Principales Especies de *Leishmania* que infectan al Hombre ( Modificado)

### 1.1.2.2 Los Vectores

Los insectos que hospedan las especies de *Leishmania* involucradas en la transmisión de la leishmaniosis pertenecen a los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* (Figura 4) en el Viejo Mundo y en el nuevo Mundo respectivamente<sup>2</sup>. Se caracterizan por ser insectos pequeños que miden de 2-3 mm de longitud y de costumbres nocturnas. A nivel de su saliva se han descrito varias sustancias que desempeñan un papel muy importante en el proceso de transmisión del parásito, tales como los vasodilatadores, maxadilan (*Lutzomyia*) y adenosina (*Phlebotomus*); la apirasa (*Phlebotomus* y *Lutzomyia*) que es un factor de antiagregación plaquetaria, entre otros. Los cuales contribuyen a disminuir la sensibilización e inflamación del hospedero.

El contacto intradomiciliar y peridomiciliar con estos vectores ocurre generalmente

después de las cinco de la tarde y en la noche cuando los domicilios se encuentran cerca a bosques, fenómeno asociado con tala de árboles, cultivos ilícitos, asentamientos en los bosques, construcción de carreteras, etc. Teniendo en cuenta que el elemento que determina el mayor riesgo de infección en los diferentes tipos de hábitats es la densidad de reservorios mamíferos infectados con *Leishmania*<sup>11</sup>. El panorama anterior ha cambiado notablemente como lo demuestran algunos reportes de casos a nivel urbano, atribuido a migración, deforestación y calentamiento global generando cambios en el comportamiento de los vectores.



Figura 4.

Espécimen de *Lutzomyia* sp. (Tomado de UTMB center for tropical diseases )

Entre las especies de *Leishmania* involucradas en el Viejo Mundo se encuentran *Leishmania major*, *Leishmania aethiopica* y *L. infantum*; y por su parte en el Nuevo Mundo, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania lainsoni*, *Leishmania naiffi*, *Leishmania panamensis*, *Leishmania peruviana*, *Leishmania shawi* (subgénero *Viannia*), *Leishmania mexicana*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania venezuelensis* y *L. chagasi*<sup>14</sup>. Algunas de estas especies han sido reportadas como especies antropofílicas con hábitos intradomiciliario y peridomiciliario.

### 1.1.2.3 Los Reservorios

La leishmaniosis se puede presentar en reservorios selváticos y domésticos. Donde los hospederos mamíferos incluyen roedores, marsupiales, caninos, primates. Los humanos y otros animales tales como caballos, cerdos y conejos son considerados hospederos accidentales (Figura 5). En el caso de la Leishmaniosis visceral causada por *Leishmania infantum*, el perro es el hospedero más importante.



*Figura 5.*

Algunos Reservorios de *Leishmania* sp. (Modificado de Simpson y Opperdoes )

#### **1.1.2.4 El Ciclo de Vida**

Todas las especies de *Leishmania* son morfológicamente similares en su ciclo de vida involucrando un hospedero vertebrado y uno invertebrado. Puede considerarse que el ciclo inicia cuando el vector pica un reservorio y/o hospedero infectado, ingiriendo con la sangre, los parásitos en forma de amastigotes (Figura 6); muchos de éstos son destruidos en las primeras horas pero otros se transforman en promastigotes procíclicos/metacíclicos, se dirigen al intestino medio del insecto en donde se multiplican rápidamente por fisión binaria longitudinal, luego migran a la proboscis, localizándose alrededor de la válvula esofagiana. La transmisión del parásito ocurre cuando el insecto se alimenta nuevamente y regurgita los parásitos almacenados en la válvula esofagiana dejándolos en la laguna de sangre que se formó en la piel con la picadura.

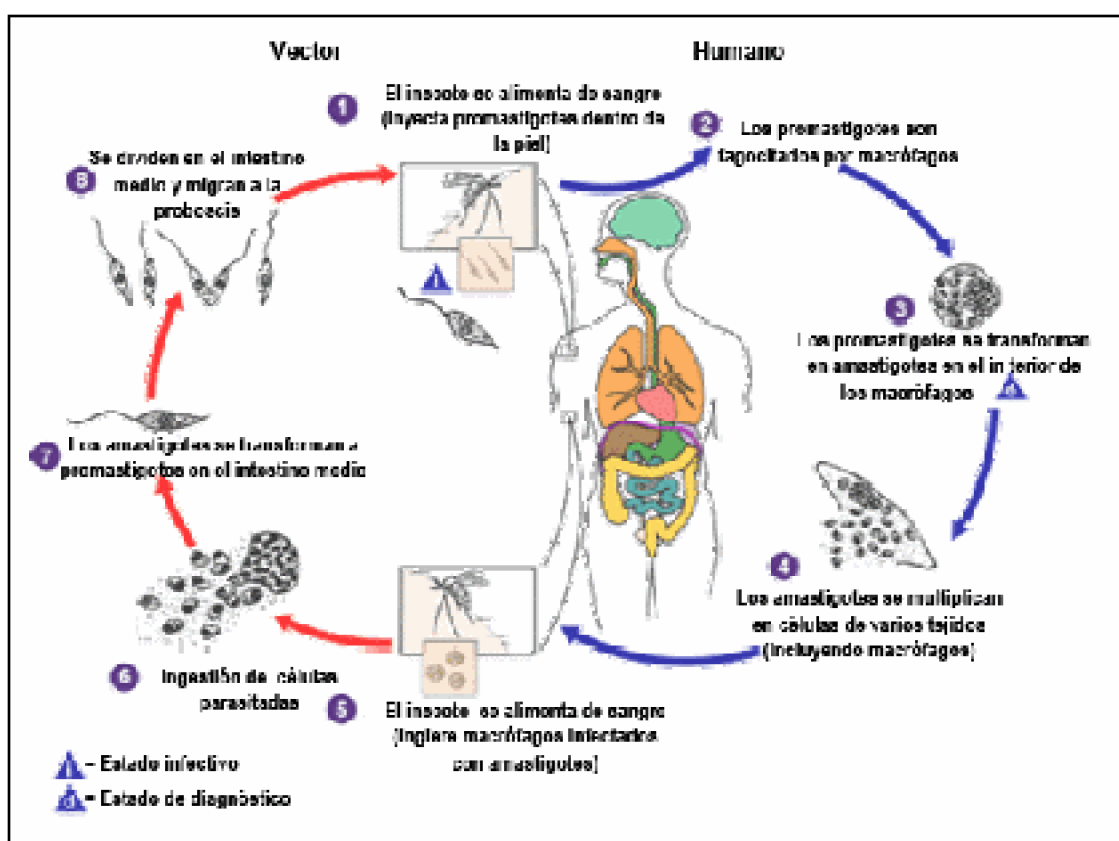


Figura 6.

Ciclo de vida de *Leishmania* (Tomado de Centres for Disease Control & Prevention)

### 1.1.3 Manifestaciones Clínicas de la Leishmaniosis

La leishmaniosis es una enfermedad seria y algunas veces fatal, la cual depende de las especies de *Leishmania* involucradas en la infección y de la respuesta inmune del individuo infectado, generando una gran variedad de manifestaciones clínicas, las cuales se encuentran agrupadas en cuatro categorías clínicas: Leishmaniosis cutánea, Leishmaniosis mucosa, Leishmaniosis cutánea difusa y Leishmaniosis visceral.

#### 1.1.3.1 Leishmaniosis cutánea

La Leishmaniosis cutánea es producida por una amplia variedad de especies de *Leishmania* relacionadas genéticamente, las cuales combinadas con los mecanismos del sistema inmune del hospedero dan como resultado un gran espectro de manifestaciones clínicas, histopatológicas e inmunopatológicas. Es producida por especies de *Leishmania*, subgéneros *Viannia* y *Leishmania*<sup>18</sup>, en el Viejo Mundo por *Leishmania major* y *Leishmania tropica*<sup>6,19</sup>. El número anual de casos de Leishmaniosis cutánea diagnosticada en Colombia ha incrementado durante los últimos años de 6500 casos para el 2003 a 8058 registrados en el 2005 por el SIVIGILA.

Las principales manifestaciones clínicas son papulas eritematosas en áreas

expuestas del cuerpo donde vectores infectados se han alimentado. El período de incubación puede ser tan corto como 1-2 semanas o tan prolongado como 1-2 meses. La lesión temprana puede presentar prurito pero no dolor; la úlcera puede permanecer relativamente seca con una costra seca o puede exudar material seropurulento. Pueden presentarse lesiones múltiples dependiendo del grado de la exposición a insectos infectados, el tiempo y por ende múltiples picaduras. Ocasionalmente las úlceras curan de forma espontánea, pero pueden persistir por 1 año o más sin tratamiento<sup>6</sup>. Cuando las lesiones ocurren en el pabellón auricular y la infección es causada por especies de *L. mexicana*, puede ocurrir mutilación del pabellón auricular. Otras especies de *Leishmania* pueden invadir los cordones linfáticos circundantes a la lesión produciendo linfadenopatías regionales<sup>3</sup>.

### **1.1.3.2 Leishmaniosis mucocutánea Americana**

Es producida por *Leishmania braziliensis*, *Leishmania panamensis* y *Leishmania guyanensis*. La enfermedad inicia con una lesión cutánea o escara típica en el lugar donde el insecto se alimentó, y luego los microorganismos migran vía linfática hasta la mucosa. Las lesiones de la mucosa tienen un efecto lento sin embargo de carácter progresivo, principalmente sobre la cavidad nasal y oral; adicionalmente, pueden extenderse a tejido circundante.

Este tipo de Leishmaniosis está asociado con especies de *Leishmania* del subgénero *Viannia*; en Sur América la especie más involucrada es *L. (V.) braziliensis*, en Colombia *L.(V.) panamensis*<sup>3</sup>. Aunque en el Nuevo Mundo ha sido reportada Leishmaniosis mucocutánea en pacientes inmunosuprimidos con VIH debida a *L. donovani*, *L. major* y *L. infantum* .

### **1.1.3.3 Leishmaniosis cutánea difusa**

Es considerada una complicación muy extraña de la Leishmaniosis cutánea asociada con una ausencia de respuesta inmunológica a los antígenos de *Leishmania*. Se inicia con una lesión cutánea ulcerativa regular pero luego progresa afectando múltiples sitios como nódulos sin ulceraciones o placas en áreas más frescas del cuerpo, como en lepra.

Es causada por especies del complejo *Leishmania mexicana*, la especie más asociada con esta forma es la *L. amazonensis*, aunque se han reportado casos aislados de otras especies. La respuesta al tratamiento con antimoniales es pobre, presentándose frecuentes recaídas. La Leishmaniosis cutánea difusa ha sido reportada en Brasil, Colombia, Venezuela, México y República Dominicana<sup>3</sup>.

### **1.1.3.4 Leishmaniosis visceral**

Es una infección diseminada a otros órganos producida por el subgénero *L. (Leishmania)* e incluye *L. donovani* y *L. infantum* en el Viejo Mundo y *L. chagasi* en el Nuevo Mundo. Aunque tienen un nombre y origen geográfico diferente, datos moleculares sugieren que *L. infantum* y *L. chagasi* son en realidad la misma especie<sup>10</sup>.

Su vector principal es *Lutzomyia longipalpis*, con excepción de la Costa Caribe



*Leishmania* VIH, 1990–1998 (Tomado de OMS)

### **1.1.4 Medicamentos contra la Leishmaniosis**

---

Los antimoniales pentavalentes (Glucantime® y Pentostam®) han sido considerados como el medicamento de elección durante los últimos 60 años; sin embargo, se requiere de grandes dosis de antimonio pentavalente (20 mg/kg de peso corporal/día durante 20 días)<sup>22</sup>, un esquema que crea una morbilidad considerable: artralgias o mialgias severas en al menos el 50% de los pacientes, molestias gastrointestinales, aumento en los niveles de enzimas hepáticas en aproximadamente el 30% de los pacientes, alteraciones cardiovasculares en al menos 10% de los pacientes y ocasionalmente trombocitopenia y neutropenia<sup>23</sup>. El índice de fallas terapéuticas con Glucantime® es cercano al 10% de los casos que realizan tratamiento completo en Colombia. Además, en zonas rurales los tratamientos son incompletos<sup>24</sup>. Otros compuestos como Pentamidina y Amfotericina B aunque efectivos, son más tóxicos y costosos (ej. Liposomas de Amfotericina B: US\$ 1500)<sup>1</sup>. En el caso del Miltefosine el primer medicamento vía oral resultó muy efectivo durante un ensayo clínico fase III en el tratamiento de leishmaniosis visceral en adultos<sup>4</sup> e incluso se reporta que se están realizando ensayos clínicos en fase IV, pero solo se ha empleado en pocos casos contra leishmaniosis cutánea y su costo aun se encuentra en negociación, el cual probablemente será cercano a los US\$ 50.

Aunque se han reportado pocos casos de resistencia debido a su reciente uso, se ha encontrado que es fácil inducirla en cultivos *in vitro*<sup>4</sup>, por lo que aún es una necesidad urgente la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas.

En la actualidad, el conocimiento de los posibles mecanismos de resistencia involucrados<sup>4;25-28</sup> pueden permitir generar nuevas sustancias que eviten su desarrollo y a la vez se planteen diferentes blancos contra trypanosomatides<sup>29-31</sup>, puesto que la filogenética sugiere que estos parásitos son células eucarióticas de evolución relativamente temprana; de hecho su organización celular difiere considerablemente de las células de los mamíferos<sup>32</sup>.

Las rutas bioquímicas presentes en trypanosomatides pero ausentes en sus hospederos debería, en teoría, proporcionar blancos excelentes para el diseño racional de fármacos<sup>19</sup>. Varias de estas rutas son comunes para todos los trypanosomatides patogénicos, así que un fármaco de amplio espectro sería en teoría de utilidad clínica contra las tres enfermedades (trypanosomiasis africana, trypanosomiasis americana y Leishmaniosis)

Los blancos específicos de mayor interés actual son:

- **Transporte de poliaminas**
- **Transportadores y enzimas involucrados en el metabolismo de purinas 34**
- **Protein kinasas**
- **Biosíntesis del Microtubulo**
- **Metabolismo del Folato**



- **Cistein-proteasas**
- **Tripanotiona Reductasa, Tripanotiona sintetasa y Glutationil espermidina sintetasa**
- **Enzimas Glicolíticas**
- **Metabolismo de ácidos grasos y esteroides**

Esta última ruta fue el inicio de esta investigación, ya que la importancia del metabolismo de los esteroides en los trypanosomatides ha sido demostrada indirectamente por el efecto de agentes antifúngicos, los cuales son inhibidores de su biosíntesis. Fármacos basados en el imidazol y triazol (ketoconazol e itraconazol), las alilaminas (terbinafina) y los azaesteroides, inhiben las enzimas 14 $\alpha$ -metilesterol-14-demetilasa, escualeno 2,3-epoxidasa y  $\Delta$ 24-esterol metil transferasa, respectivamente, ocasionando una disminución en los esteroides normales y una acumulación de esteroides modificados, con posibles consecuencias citostáticas o citotóxicas sobre el parásito, *Leishmania* y *Trypanosoma*

En esta tesis se consideró que las withajardinas y las acnistinas podrían bloquear la biosíntesis de ergosterol y esteroides relacionados, por poseer una alta funcionalización en los anillos A y B del sistema esteroide, de tal manera que podrían efectuarse alquilaciones sobre alguna de las enzimas de la ruta. Además la función hidroxilo en el C-14 de las withajardinas también podría inhibir la 14-demetilasa irreversiblemente.

## 1.2 Productos naturales y la búsqueda de antiparasitarios

La Química de Productos Naturales sigue siendo un interesante campo para farmacólogos y químicos sintéticos; de un lado porque ofrecen moléculas bioactivas que sirven como modelo y a partir de las cuales se pueden generar sustancias para aplicación en farmacología o en agricultura. Aproximadamente el 60% de la población mundial recurre a las plantas para el tratamiento de sus enfermedades. Dado que en los países tropicales como Colombia se dispone de un gran potencial biotecnológico en virtud de su exquisita variabilidad biológica, muchos investigadores se han dedicado a la búsqueda de compuestos activos contra diferentes agentes infecciosos en plantas, microorganismos, y organismos marinos, como se describe a continuación.

### **Expectativas en el desarrollo de nuevos medicamentos a partir de productos naturales.**

Las moléculas con actividad antiparasitaria han sido objetivo de numerosas revisiones en los últimos siete años, y según los reportes individuales, muchas de ellas tendrían un futuro promisorio como moléculas líderes para desarrollar nuevos fármacos. A pesar de todos los esfuerzos hechos y de la multitud de moléculas y extractos analizados, por qué razón han ocurrido tan pocos éxitos con la abundancia de moléculas

naturales reportadas en la literatura<sup>40-52</sup>. Esta es una pregunta con pertinencia científica y social, pero que en alguna manera pone en tela de juicio a la naturaleza como fuente de moléculas bioactivas. Sin embargo son los métodos, la organización de la investigación farmoquímica y los objetivos planteados a diferentes niveles los que deben ser analizados. Varias aproximaciones pueden presentarse como respuesta:

- El modelo experimental no es el adecuado, bien sea por su estadio o porque no es una forma infecciosa y patogénica en la vida real.

- Algunas dosis son francamente extremas e incluso ocasionalmente no se tiene en cuenta que la actividad puede originarse por una propiedad fisicoquímica (pH, alteración de la osmolaridad, etc) más que por una acción bioquímica definida y específica.

- Los altos índices de toxicidad son enmascarados por las altas actividades reportadas. En otras palabras, existen moléculas muy activas pero también muy tóxicas y por lo tanto su índice de selectividad (IS) no es el adecuado para emprender otros estudios.

- Posiblemente la actividad se debe a residuos de solventes altamente tóxicos, como por ejemplo metanol.

- La exclusión de plano de posibles moléculas bioactivas debido a la alta toxicidad de los extractos; sin embargo cabe la posibilidad de que la molécula activa sea muy diferente de la tóxica y solo de-replicaciones sucesivas de un extracto permitirán definir quien es quien en un extracto.

- Pocas veces se emprenden ensayos confirmatorios en modelos experimentales más seguros y no se realiza una fase de optimización molecular que permita definir que partes de la molécula están involucradas en la actividad.

- Usualmente se toma una gran cantidad de especies y de extractos, de tal manera que la capacidad operativa y analítica es desbordada en sus aspectos logísticos y económicos; los ensayos preliminares *per se* justifican una hipotética y amplia exploración etnobotánica.

- Los procedimientos de de-replicación de las sustancias activas e identificación de los principios activos son lentos y azarosos. Incluso puede existir descomposición y carencia de actividad por un posible sinergismo o antagonismo de una mezcla de sustancias.

- Finalmente la casi totalidad de la investigación tiene orígenes netamente académicos y para la industria farmoquímica su renuencia para abordar el tema puede tener connotaciones más mediáticas que económicas; por suerte está cambiando este paradigma hacia una aproximación más racional de los recursos de la biodiversidad y el respeto de los derechos de las comunidades.

De hecho el único medicamento que ha engrosado el arsenal quimioterapéutico para controlar la leishmaniosis es la Miltefosina, una sustancia sintética diseñada sin ninguna plantilla de un producto natural.

## 1.3 Química Computacional

La búsqueda de moléculas como candidatos potenciales a medicamentos se hace hoy con ayuda de la química computacional, una de cuyas ramas, la Modelación Molecular, permite obtener moléculas reales o virtuales con una gran probabilidad de poseer una acción específica e incluso predecirse su biodisponibilidad y toxicidad.

Las aproximaciones al Diseño de Moléculas se enfocan desde dos puntos de vista. El primero de ellos exige el conocimiento de la molécula blanco sobre la cual se ejerce la actividad y el segundo una relación entre la estructura y una actividad definida para una serie de moléculas; este último es el caso usual en química de productos naturales en el cual se determina un efecto farmacológico, pero no se conoce el mecanismo de acción.

La primera aproximación permite adaptar la molécula de interés sobre un espacio topológico y estereoelectrónico del sitio de interacción con la molécula blanco. De esta última se conoce su disposición espacial, la cual se puede consultar en una base de datos de acceso público. Mediante diferentes software (Sybyl, Catalyst, etc, etc) se determinan las características que debe poseer una molécula para posiblemente interactuar con un blanco (distancias, zonas hidrofílicas e hidrofóbicas, ángulos de enlace, entre otras). Creando de esta manera moléculas virtuales que interactúan con ese blanco (Docking) y se llega a una serie de candidatos que luego de sintetizarse se ensayan, y según los resultados nuevamente se reoptimizan.

La segunda aproximación es un poco mas compleja, ya que exige una cantidad apreciable de moléculas para sacar una correlación firme entre la estructura y la actividad y/o la toxicidad experimental. Como en el primer caso, hay que conocer la disposición espacial de la molécula, que usualmente se logra por difracción de rayos X<sup>57</sup>. Posteriormente y mediante análisis tipo 2DQSAR y 3DQSAR se correlaciona la actividad con una propiedad de la molécula, por ejemplo distancias, ángulos de enlace, polaridad, hidrofílicidad, hidrofobicidad, coeficiente de partición, tamaño de grupos, grupos electro-atrayentes o donantes, etc<sup>57-62</sup>.

Con base en estos descriptores se sintetizan nuevas moléculas que se evalúan experimentalmente, para llegar finalmente a una sustancia muy activa y con poca toxicidad si es del caso.

Algunas aplicaciones de la Modelación Molecular al diseño y obtención de nuevas sustancias bioactivas se describen a continuación<sup>63</sup> :

El megazol, una sustancia sintetizada en 1968 y luego descartada por el riesgo de generar mutagenicidad, fue reportada con actividad contra *Trypanosoma cruzi*. Posteriormente, otros investigadores mediante el modelo químico de Teoría de los Funcionales de Densidad para Sistemas Heterocíclicos (CHIH-DFT), indicaron que los sitios reactivos de esta molécula correspondían al grupo amino, basado en la localización del HOMO y que el ataque nucleofílico tomaría lugar en el O<sup>1964</sup>. Sin embargo el mecanismo de mutagenicidad asociado al parecer no se ha resuelto.

En la búsqueda y refinamiento de nuevas moléculas antiparasitarias, una de las publicaciones más recientes reporta un nuevo derivado de dihidrobenzofurano denominado (**2g**) como un compuesto antileishmania líder, según datos experimentales *in vitro* (Concentración Inhibitoria, CI 50 = 0.1 µg/mL) y posterior evaluación de la relación estructura actividad aplicando el modelado de superficie del receptor *Quasar 65*.

En una búsqueda sistemática de ligandos con la subestructura P-X-P para la purinatransferasa de *T. cruzi* en la base de datos CSD se encontraron una serie de ligandos conocidos como bifosfonatos, sustancias utilizadas en trastornos óseos. Estos sometieron a estudios moleculares utilizando métodos de mecánica molecular demostrando que este grupo de compuestos son similares al sustrato natural de la purina transferasa. La correlación con estudios *in vitro* demostró que los bifosfonatos más potentes fueron pamidronato y risedronato, que inhiben la enzima purinatransferasa de *Trypanosoma cruzi* en el rango de concentraciones micromolares<sup>66</sup>.

En el trabajo realizado por Bordas et al. 2003<sup>67</sup> se describió la aplicación del CoMFA para derivar el sitio de enlace hipotético de herbicidas tipo dicloroacetamida. Igualmente destacan la importancia y aplicabilidad que tienen metodologías computacionales como el CoMFA y CoMSIA en el diseño de ligandos cuando se desconoce la estructura tridimensional de la proteína diana.

Dado el perfil de actividad de la Artemisinina y sus derivados contra *P. falciparum* en un estudio realizado se reportaron una serie de análogos de artemisinina con actividad antileishmania, y simultáneamente utilizando la metodología CoMFA establecieron una relación estructura actividad; encontrando que la sustitución en C- 9β mejora la actividad antileishmania comparado con la artemisinina, al igual que los 10-deoxo derivados. Sin embargo, continúan realizando estudios con el fin de disminuir su toxicidad y potenciar su biodisponibilidad<sup>68</sup>.

A partir de un grupo de 53 compuestos con actividad antimalarica, principalmente alcaloides del tipo naftilisoquinolínicos, pero también fenilntraquinonas se realizaron investigaciones con modelos 3D-QSAR basados en la metodología CoMSIA, permitiendo establecer la importancia del átomo de nitrógeno y el hallazgo de que una función oxigenada en posición C6 de la estructura de la isoquinolina disminuye la actividad antimalarica<sup>69</sup>.

Se espera que en un futuro muy próximo la Química Computacional y la Modelación Molecular permitan definir criterios de construcción de nuevas y mejores moléculas para uso en farmacología humana y veterinaria así como en el campo agrícola.

Aunque esta investigación no pretende en manera alguna recorrer todos los caminos involucrados en el desarrollo de una molécula líder, tiene tres puntos que se complementan adecuadamente:

- Una teoría bioquímica para justificar la selección de varias moléculas de partida, consistente en el posible efecto inhibitorio de una clase de moléculas sobre el metabolismo de esteroides propios del parásito.
- El análisis por modelación molecular de la relación entre la estructura, la actividad y la toxicidad para obtener una nueva clase de farmacóforo.

- Finalmente la búsqueda de un nuevo farmacóforo por consideraciones quimiotaxonómicas.

## 1.4 Bibliografía

1. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2004, 27, 305-318.
2. de Almeida M. C.; Vilhena V.; Barral A.; Barral-Neto M. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2003, 98, 861-870.
3. Agudelo S.; Velez I. Leishmaniosis: aspectos clínico- epidemiológicos, diagnóstico, tratamiento y control. *Medicina & Laboratorio* 2000, 9, 145-166.
4. Ouellette M.; Drummelsmith J.; Papadopoulou B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist. Updat.* 2004, 7, 257-266.
5. Ministerio de Protección Social, Instituto Nacional de Salud, and SIVIGILA. Informe leishmaniasis semestre 2005. [http://www.ins.gov.co/pdf/vcsp/informe\\_leishmaniasis\\_1sem\\_2005.pdf](http://www.ins.gov.co/pdf/vcsp/informe_leishmaniasis_1sem_2005.pdf). Fecha de acceso: 21/11/05
6. Balaña-Fouce R.; Reguera R. M.; Cubria J. C.; Ordoñez D. The pharmacology of Leishmaniasis. *Gen. Pharmac.* 1998, 30, 435-443.
7. Molano A. 2005. <http://www.prensarural.org/molano20050409.htm>. Fecha de acceso: 01/08/05
8. Jacobson R. L. Fotografía de promastigotes. 1996. [http://medstat.med.utah.edu/parasitology/AllSmallJpg/Ltrop\\_RLJacobson.jpg](http://medstat.med.utah.edu/parasitology/AllSmallJpg/Ltrop_RLJacobson.jpg). Fecha de acceso: 28/07/05
9. Zaiman. Fotografía de amastigotes. 1996. [http://medstat.med.utah.edu/parasitology/AllSmallJpg/Ldon\\_Zaiman.jpg](http://medstat.med.utah.edu/parasitology/AllSmallJpg/Ldon_Zaiman.jpg). Fecha de acceso: 28/07/05
10. Wilson M. E.; Jeronimo S. M. B.; Pearson R. D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. *Microb. Pathogenesis* 2005, 38, 147-160.
11. Duque P.; Velez I.; Morales M.; Sierra D. Sand flies fauna Involved in the transmission of cutaneous leishmaniasis in afro-Colombian and amerindian communities of Choco, Pacific Coast of Colombia. *Neotropical Entomology* 2004, 33, 255-264.
12. Agudelo L. A. ; Uribe J.; Sierra D.; Ruiz F.; Velez I. Presence of american cutaneous leishmaniasis vectors surrounding the city of Medellín, Colombia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2002, 97, 641-642.
13. UTMB center for tropical diseases. <http://www.utmb.edu/ctd/archives/1998/lanza02.jpg>. Fecha de acceso: 29/07/05
14. Gramiccia M.; Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniasis and

- approaches to disease control. *Int. J. Parasitol.* **2005**, 35, 1169–1180
15. Simpson L. [http://164.67.39.27/parasite\\_course-old/leish\\_files/introduction1.htm](http://164.67.39.27/parasite_course-old/leish_files/introduction1.htm). Fecha de acceso: 28/07/05.
16. Opperdoes F. <http://www.icp.ucl.ac.be/~opperd/parasites/> Fecha de acceso: 28/07/05
17. Centres for Disease control & Prevention. **2004**. <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Leishmaniasis.htm>) Fecha de acceso: 28/07/05
18. Silveira F. T.; Lainson R.; Corbett C. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2004**, 99, 239-251.
19. Davis A. J.; Murray H. W.; Handman E. Drugs against leishmaniasis: a synergy of technology and partnerships. *Trends Parasitol.* **2004**, 20, 73-76.
20. Desjeux P. ; Alvar J. Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Ann. Trop. Med. Parasitol. (Supplement)* **2003**, 97, S3-S15.
21. OMS.Fecha de acceso: 29/07/05**2001**  
[http://www.who.int/csr/resources/publications/CSR\\_ISR\\_2000\\_1leish/en/index.html](http://www.who.int/csr/resources/publications/CSR_ISR_2000_1leish/en/index.html).
22. Berman J. D. Treatment of new world cutaneous and mucosal leishmaniasis. *Clin. Dermatol.* **1996**, 14, 519-522.
23. Herwaldt B. L.; Berman J. D. Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostam) and review of pertinent clinical studies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1992**, 46, 296-306.
24. Velez I.; Hendrickx E.; Robledo S. M.; Agudelo S. Leishmaniosis cutánea en Colombia y género. *Cadernos de Saude Publica. Rio de Janeiro* **2001**, 17, 171-180.
25. Jones P. M.; George A. M. Multidrug resistance in parasites: ABC transporters, Pglycoproteins and molecular modelling. *Int. J. Parasitol.* **2005**, 35, 555-566.
26. Klokouzas A.; Shahi S.; Hladky S. B.; Barrand M. A.; Van Veen H. W. ABC transporters and drug resistance in parasitic protozoa. *Int. J. Antimicro. Ag.* **2003**, 22, 301-317.
27. Leandro C.; Campino L. Leishmaniasis: efflux pumps and chemoresistance. *Int. J. Antimicro. Ag.* **2003**, 22, 352-357.
28. Brochu Ch.; Wang J.; Roy G; Messier N.; Wang X ; Saravia N.; Ouellette M. Antimony uptake systems in the protozoan parasite Leishmania and accumulation differences in antimony-resistant parasites. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **2003**, 47, 3073-3079.
29. Barret M.; Mottram J.; Coombs G. Recent advances in identifying and validating drug targets in trypanosomes and leishmanias. *Trends Microbiol.* **1999**, 7, 82-88.
30. Gelb M.; Hol W. Drugs to combat tropical protozoan parasites. *Science* **2002**, 297, 343- 347.
31. Croft S. L.; Coombs G. H. Leishmaniasis- current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol.* **2003**, 19, 502-508.
32. McCarter J. P. Genomic filtering: an approach to discovering novel antiparasitics.

- 
- Trends Parasitol.* **2004**, *20*, 462-468.
33. Reguera R.; Tekwani B.; Balaña-Fouce R. Polyamine transport in parasites: a potential target for new antiparasitic drug development. *Comp. Biochem. Physiol. C* **2005**, *14*, 51-164
34. El Kouni M. H. Potential chemotherapeutic targets in the purine metabolism of parasites. *Pharmacol. Ther.* **2003**, *99*, 283-309.
35. Doerig Ch. Protein kinases as targets for anti-parasitic chemotherapy. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1697*, 155-168.
36. Croft S.; Yardley V. Chemotherapy of Leishmaniasis. *Curr. Pharm. Des.* **2002**, *8*, 319-342.
37. Werbovets K. Target based drug discovery for Malaria, Leishmaniasis and Trypanosomiasis. *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 835-860.
38. Roberts C. W.; McLeod R.; Rice D. W.; Ginger M.; Chance M. L.; Goad L. J. Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2003**, *126*, 129-142.
39. Ginger M.; Chance L.; Sadler I.; Goad L. The biosynthetic incorporation of the intact leucine skeleton into sterol by the Trypanosomatid *Leishmania mexicana*. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 11674-11682.
40. Rocha L. G.; Almeida J. R.; Macedo R. O.; Barbosa-Filho J. M. A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine* **2005**, *12*(6-7), 514-535
41. Singh S.; Sivakumar R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *J. Infect. Chemother.* **2004**, *10*, 307-315
42. Chan-Bacab M.; Peña-Rodríguez L. Plant natural products with leishmanicidal activity. *Nat. Prod. Rep.*, **2001**, *18*, 674-688.
43. Ghosh M.; Bandyopadhyay S. Present status of antileishmanial vaccines. *Mol. Cell. Biochem.* **2003**, *253*, 199-205,
44. Sindermann H.; Croft S. L; Engel K. R.; Bommer Eibl W. H.; Unger J. C.; Engel J. Miltefosine (Impavido): the first oral treatment against leishmaniasis. *Med. Microbiol. Immunol.* **2004**, *193*, 173-180
45. Tagboto S.; Townson S. Antiparasitic properties of medicinal plants and other naturally occurring products. *Adv. Parasitol.* **2001**, *50*, 199-295
46. Mayera A. , Haman M. T. Marine pharmacology in 2001-2002: marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Comp. Biochem. Physiol. C*, **2005**, *140*, 265 - 286.
47. Clark A. Natural products as a resource for new drugs. *Pharm. Res.* **1996**, *13*, 133-1141
48. Hoet S.; Opperdoes F.; Quetin-Leclercq, J. Natural products active against African trypanosomes: a step towards new drugs. *Nat. Prod. Rep* **2004**, *21*, 353-364
49. Kayser O.; Kiderlen A. F., Croft S. L. Natural products as antiparasitic drugs.

- Parasitol. Res.* **2003**, *90*, S55–S62
50. Cordell G. A. Natural products in drug discovery – Creating a new vision. *Phytochemistry Rev.* **2002**, *1*, 261–273
51. Cordell G. A. Changing strategies in natural products chemistry. *Phytochemistry* **1995**, *40*, 1585–1612.
52. Cordell G. A. Biodiversity and drug discovery – a symbiotic relationship. *Phytochemistry* **2000**, *55*, 463–480.
53. Schneider G.; Fechner U. Computer- based *de novo* design of drug-like molecules. *Nature Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 649-663.
54. Koehn F. E.; Carter G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 206-220.
55. McCarthy J. D. An overview of in silico design and screening: Toward efficient drug discovery. *Curr. Drug Disc.* **2002**, *2*, 20-23.
56. Baldino C.; Caserta J.; Goetzinger W.; Harris M.; Hartsough D.; Yohannes D.; Yu L., Kyranos J. High-throughput medicinal chemistry for efficient drug discovery *Curr. Drug Disc.* **2004**, *4*, 15-19.
57. Blundell T.L.; Jhoti H.; Abell Ch. High-throughput crystallography for lead discovery in drug design. *Nature Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 45-54.
58. Hansch C.; Leo A.; Hoekman D. (1995) Exploring QSAR - Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants. American Chemical Society, Washington, D.C.
59. Gallegos A.; Girone X. Topological quantum similarity measures: applications in QSAR. *J. Mol. Struct. Theochem.* **2005**, *727*, 97–106
60. Hirons L.; Holliday J.; Jelfs S. ; Willett P.; Gedeck P. Use Of The R-Group Descriptor for Alignment-Free QSAR. *QSAR Comb. Sci.* **2005**, *24*, 611-619.
61. Dixon S.; Merz K.; Lauri J. QMQSAR: Utilization of a Semiempirical Probe Potential in a Field-Based QSAR. *Method J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 23–34.
62. Bevan D. R. QSAR and Drug Design. <http://www.netsci.org/Science/Compchem/feature12.html>. Acceso 29/09/05).
63. Hardy L. W.; Malikayil A. The impact of structure-guided drug design on clinical agents. *Curr. Drug Disc.* **2003**, *3*, 15-23.
64. Flores-Holguin N.; Glossman-Mitnik D. CHIH-DFT determination of the reactivity sites of the antiparasitic drug megalzol. *J. Mol. Struct. Theochem* **2005**, *723*, 231-234.
65. Van Miert S.; Van Dyck S.; Schmidt T.; Brun R.; Vlietinck A.; Lemiére G.; Pieters L. Antileishmanial activity, cytotoxicity and QSAR analysis of synthetic dihydrobenzofuran lignans and related benzofurans. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 661-669.
66. Fernandez D.; Wenck M. A.; Craig S. P.; Delfino J. M. The purine transferase from *Trypanosoma cruzi* as a potential target for bisphosphonate-based chemotherapeutic compounds. *Bioorg. Med. Chem. Letters* **2004**, *14*, 4501-4504.



67. Bordás B.; Komíves T.; Lopata A. Ligand-based computer-aided pesticide design. A review of applications of the CoMFA and CoMSIA methodologies. *Pest. Manag. Sci.* **2003**, *59*, 393-400.
68. Avery M.; Mursleedharan K. ; Desai P. ; Achintya K.; Bandyopadhyaya A. ; Furtado M.; Tekwani B..Structure-Activity Relationships of the Antimalarial Agent Artemisinin. 8. Design, Synthesis, and CoMFA Studies toward the Development of Artemisinin-Base Drugs against Leishmaniasis and Malaria. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4244-4258.
69. Bringmann G.; Rummey Ch. 3D QSAR Investigations on Antimalarial Napthylisoquinoline Alkaloids by Comparative Molecular Similarity Indices Analysis (CoMSIA), Based on Different Alignment Approaches. *J. Chem. Inf. Comp. Sci.* **2003**, *43*, 304-316



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo General

Buscar moléculas naturales o semisintéticas que posean acción sobre amastigotes de *Leishmania (Viannia) panamensis* y mediante bioensayos guiados realizar estudios de modelación molecular para generar otros compuestos leishmanicidas.

### 2.2 Objetivos específicos

Aislar e identificar Withajardinas y Acnistinas presentes en *Deprea orinocensis* (H. & B) Rafineski y *Dunalia solanacea* Kunth.

Determinar su efecto leishmanicida *in vitro* sobre amastigotes intracelulares de *Leishmania (V.) panamensis* y la citotoxicidad sobre células U937.

Modificar las sustancias de origen natural de acuerdo a los resultados anteriormente descritos y evaluar su potencial leishmanicida.

Analizar por modelación molecular los sitios activos de las moléculas, el farmacóforo

y la posible correlación entre la actividad leishmanicida y la toxicidad.

Seleccionar un nuevo farmacóforo de partida con base en la actividad de las sustancias naturales, sus derivados y el estudio de modelación molecular.

Derivatizar el nuevo farmacóforo y estudiar el efecto leishmanicida *in vitro*.

Realizar estudios bioguiados con extractos de plantas afines a *Dunalia solanacea* y *Deprea orinocensis*, obtener un perfil de sus posibles componentes y si fuera el caso, aislar e identificar el compuesto bioactivo.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSION

### 3.1 Estudio experimental y computacional de la actividad leishmanicida de withajardinas y acnistinas

#### 3.1.1 Introducción

---

En estudios previos se ha explorado una amplia gama de metabolitos secundarios contra *Leishmania*, entre ellos agonistas y antagonistas de ecdisonas, triterpenos y esteroides tales como azadirachtina, cucurbitacinas, glicosidos cardiacos<sup>1</sup>, entre otros. Más recientemente se han reportado los efectos tripanocidas y leishmanicidas de alcaloides esteroidales en *Holarrhena curtisii* <sup>2</sup> y *Dunalia brachyacantha* <sup>3</sup>. En este capítulo se describe el efecto citotóxico y leishmanicida de dos clases de withanolidos (acnistinas y withajardinas), los cuales se describen a continuación.

#### 3.1.2 Withanolidos

---

Los withanolidos son un grupo de lactonas esteroidales que han sido aislados de varios géneros de la familia Solanaceae<sup>4</sup>. Varias de estas sustancias han mostrado diferentes

tipos de actividad biológica, tales como citotóxica, anticancer, antiinflamatoria y hepatoprotectora<sup>5</sup>, entre otras. Hace algunos años en nuestro grupo de investigación se aislaron e identificaron dos nuevas series de withanolidos, las acnistinas y las withajardinas (Figura 8), algunas de las cuales tienen acción inmunosupresora<sup>5</sup>.

Se propuso inicialmente en esta parte de la tesis que algunos withanolidos podrían interferir con la biosíntesis y la acción de esteroides indispensables para el metabolismo del parásito ya que estos microorganismos necesitan ergosterol y esteroides alquilados en C-24 para su crecimiento y supervivencia puesto que no pueden transformar el colesterol del huésped<sup>6</sup> y como tales podrían ser excelentes candidatos para el control de la leishmaniasis.

Desde un punto de vista químico, la estructura de algunos withanolidos es similar a las ecdisonas, una serie de hormonas que requieren los insectos y algunos tripanosomatidos para su metamorfosis, ya que poseen hidroxilaciones en C-14 y C-17, así como diferentes funcionalizaciones de los anillos A y B.

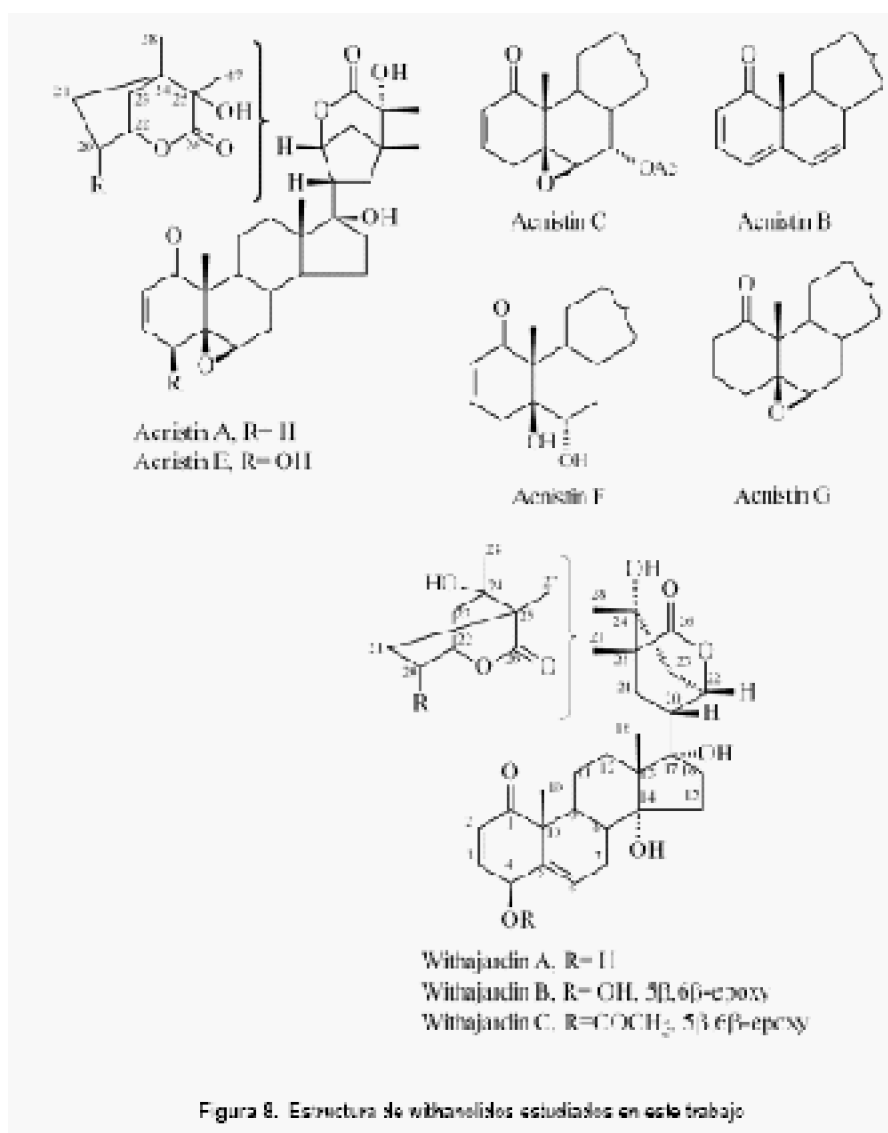


Figura 8. Estructura de withanolidos estudiados en este trabajo

Debido a que se encontró que la actividad de las withajardinas y acnistinas es fuertemente dependiente de la estructura, se presentan algunas aproximaciones computacionales para determinar los aspectos estructurales que inciden en las relaciones en la actividad y los sitios que interactúan con una posible molécula blanco. Las aproximaciones computacionales representan una buena alternativa para mejorar el perfil farmacológico de diversas clases de sustancias e incluso para crear nuevas moléculas de acuerdo a parámetros estereoelectrónicos, polaridad, fuerza de campo, hidrofobicidad, constante dieléctrica, etc<sup>7 8</sup>.

### 3.1.3 Actividad Leishmanicida

Una sustancia es considerada con actividad leishmanicida promisorio cuando tiene un Índice de Selectividad mayor a 10 ( $IS = CL_{50}/CE_{50}$ ). Sin embargo, en este estudio se ha encontrado que seleccionar únicamente este parámetro, no es adecuado porque no solo cuando se tienen sustancias poco tóxicas y muy activas es factible obtener dicho índice, ya que el mismo se puede lograr cuando se tienen sustancias poco citotóxicas y no efectivas.

Por lo tanto en esta tesis se consideró inicialmente que una sustancia es promisorio cuando su concentración efectiva ( $CE_{50}$ ) es  $< 50.0 \mu\text{g/mL}$  y su concentración letal ( $CL_{50}$ )  $> 50.0 \mu\text{g/mL}$ . Sin embargo, cuando se realizó la conversión a la unidad  $\mu\text{M}$  esto llevó a redefinir el rango establecido para la  $CE_{50}$  a una concentración  $< 25 \mu\text{g/mL}$ . Adicionalmente, en el caso de extractos, son considerados promisorios aquellos que presenten un porcentaje de inhibición mayor al 50% cuando son evaluados a una concentración  $\leq 50 \mu\text{g/mL}$  y el mismo parámetro de citotoxicidad antes mencionado. Estos parámetros son entonces los utilizados para analizar el grado de bioactividad de las diferentes sustancias y extractos que se trabajaron en esta tesis como se describe a continuación para los withanolidos en primer plano. **Es de anotar que los valores de las gráficas corresponden al promedio de uno o varios experimentos que se hicieron por triplicado; el tratamiento estadístico de los datos se encuentra en el anexo 1.**

Las acnistinas y withajardinas se diferencian fundamentalmente en la cadena lactónica en el C-17 y la hidroxilación del C-14 en el segundo grupo. Como se describe más adelante el perfil de actividad de ambas clases de withanolidos es similar y por tanto se ha considerado en una aproximación que estos dos grupos tienen poca influencia en la actividad leishmanicida y por el contrario la funcionalización de los anillos A y B incide notablemente:

- El efecto sobre amastigotes de *L. (V) panamensis* muestra que la acnistina E y la withajardina B (**Tabla 2**) exhiben un fuerte efecto leishmanicida. Estas dos sustancias tienen en común un sistema 2-en-1-ona, un  $5\beta,6\beta$ -epoxi y un hidroxilo en C-4 del sistema esteroide; las acnistinas A y C a pesar de carecer del hidroxilo también tienen un fuerte efecto leishmanicida.

Compound	CL <sub>50</sub> µg/mL (µM)	CE <sub>50</sub> * µg/mL (µM)	IS (CL <sub>50</sub> / CE <sub>50</sub> )
Acnistin A, <u>1</u>	0.27 (0.6)	3.0 (6.4)	0.1
Acnistin B, <u>2</u>	35.5 (78.4)	51.8 (121.2)**	0.7
Acnistin C, <u>3</u>	1.7 (3.2)	2.3 (4.9)	0.7
Acnistin F, <u>4</u>	1.0 (2.1)	1.0 (2.1)	1.0
Acnistin F, <u>5</u>	158.5 (324.4)	76.0 (155.5)	2.1
Acnistin G, <u>6</u>	8.5 (18.0)	7.9 (16.7)	1.1
Withajardin A, <u>7</u>	10.4 (37.0)	30.0 (63.3)	0.6
3-OMe-withajardin A, <u>8</u>	248.0 (495.4)	>50.0	***
Withajardin B, <u>9</u>	3.8 (7.6)	1.1 (2.2)	3.5
Withajardin C, <u>10</u>	9.5 (17.4)	12.8(23.5)	0.8
Glucantime®	400.0	6.7	59.7

\* CE<sub>50</sub>: concentración de compuesto, que causa una reducción del 50% de los parásitos intracelulares en comparación con cultivos en ausencia de compuesto y a su vez utilizando Glucantime® como medicamento control.

IS= Índice de Selectividad se considera aceptable cuando este es <10.0

\*\* En este caso la CE<sub>50</sub> fue mayor que la concentración CL<sub>50</sub> debido a que es necesario una concentración mayor del medicamento para matar el 50 % de los parásitos.

\*\*\* No se puede calcular el IS porque el valor de CL<sub>50</sub> en este caso es un intervalo abierto.

*Tabla 2. Actividad leishmanicida de Withajardinas y Acnistinas*

Esta relación entre la estructura y la actividad contrastan en cierto grado con lo reportado anteriormente para los withanolidos similares aislados de *Dunalia brachyacantha*, evaluados sobre promastigotes de *L. (L) amazonensis*, *L. (V) braziliensis*, *L. (L) donovani* y epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, presentando una CI<sub>50</sub> de 1.0 - 10.0 µg/mL<sup>3</sup>; y el compuesto tipo 5β,6β-epoxi fue menos activo que su correspondiente deoxianálogo, cabe mencionar que estos ensayos no se realizaron sobre la forma infectiva que se encuentra en el hospedero y adicionalmente la cepa de *L. amazonensis* fue aislada de un insecto y no de un paciente.

- El grupo hidroxilo en el C-4 es muy importante, pues su ausencia en las acnistinas A y C los hace casi tres veces menos potentes. En el caso de la acetilación del grupo hidroxilo, esto conlleva a una disminución ostensible de la citotoxicidad conservando el grado de efectividad, pues la withajardina C tiene una CE<sub>50</sub> de 12.8 µg/mL contra 1.1 µg/mL de la withajardina B.

- Cambios en el sistema carbonilo α,β insaturado disminuye la efectividad. Por ejemplo, en el aducto 3-metoxi withajardina A (CE<sub>50</sub> >50 µg/mL), la reducción del sistema 2-en-1-ona disminuye notablemente la acción leishmanicida en comparación a la Withajardina B.

- De igual manera, la acnistina G que posee el grupo epóxido pero no el sistema 2-en-1-ona, exhibe una CE<sub>50</sub> de 7.9 µg/mL, es decir casi tres veces inferior a la de su

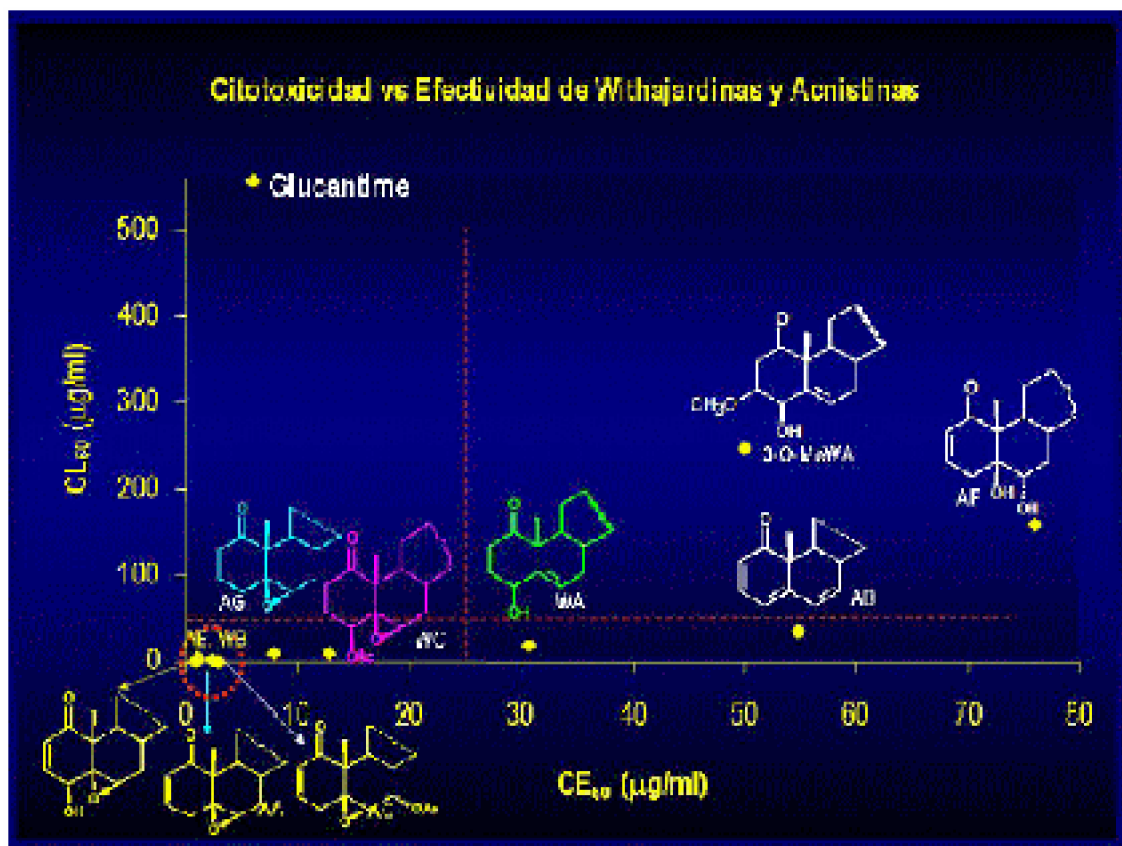


análogo estructural, la acnistina A. Sin embargo, cuando se compara la withajardina A con la acnistina G ( 30.8 vs 7.9  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente) se observa que es predominante la influencia del grupo epóxido que el mismo sistema carbonilo  $\alpha,\beta$  insaturado sobre la bioactividad.

- En el caso de la acnistina F, que es un compuesto tipo 4-deoxi-5,6-dihidroxi pero que conserva el sistema carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado, la actividad es casi 75 veces inferior a la de la acnistina E.

- De otro lado, la presencia de un doble enlace en lugar de un grupo  $5\beta,6\beta$ -epóxido como en la withajardina A disminuye la acción leishmanicida como también la formación de un aducto Michael en el C-3. Además, un sistema conjugado sin el epóxido, tal como en la acnistina B es carente de efectividad.

Con relación al Índice de selectividad (IS) de todas estas moléculas y del Glucantime® no se considera un único parámetro decisorio y de elección. Dado que este medicamento de referencia a pesar de tener un IS tan elevado *in vitro* ocasiona un gran nivel de toxicidad *in vivo*. Lo que nos demuestra que un IS muy grande no permite eliminar el riesgo de generar toxicidad. De otro lado, moléculas no efectivas y no citotóxicas me permiten de igual manera obtener un IS mayor de 20.



\*Acnistinas y Withajardinas. AA (acnistina A), AB (acnistina B), AC (acnistina C), AE (acnistina E), AF (acnistina F), AG (acnistina G) WA (Withajardina A); WB (Withajardina B); WC (Withajardina C); 3-O-MWA, 3-OMetoxiwithajardina A)

Figura 9. Citotoxicidad vs Efectividad de Withajardinas y Acnistinas

Aunque, la actividad leishmanicida de los withanolidos antes mencionados está muy correlacionada con la citotoxicidad (Figura 9), cambios en la estructura modifican en mayor grado la citotoxicidad que la efectividad. Así, la apertura del epóxido reduce el efecto citotóxico 600 veces, mientras que la efectividad disminuye 25 veces únicamente (acnistina F vs acnistina A). Adicionalmente, el grupo carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado es menos importante que el grupo epóxido (acnistina G vs acnistina A) dado que la efectividad fue reducida 2.6 veces y el grado de citotoxicidad en 31 veces. En la serie de withajardinas, la presencia de un doble enlace en lugar de un C $\beta$ 5,C $\beta$ 6 epóxido reduce la toxicidad 5 veces y se conserva algún grado de actividad leishmanicida (withajardina A vs Withajardina B). Con el fin de comprender algunas características estereoelectrónicas que intervienen en la actividad leishmanicida, se ha adelantado un estudio computacional al respecto, como se explica a continuación.

---

### 3.1.4 Química Computacional

---

Las acnistinas y las withajardinas se diferencian estructuralmente en tres hechos principales<sup>5,9-12</sup> (Figura 8).

- La cadena lateral en el C-17 de las acnistinas es un sistema bicíclico de cinco y seis miembros, mientras que en las withajardinas es un biciclo de 6 miembros cada uno.

- La estereoquímica de la hidroxilación en el C-17, para las acnistinas es  $\beta$ , mientras que en las withajardinas es  $\alpha$ .

- Estos últimos compuestos poseen una hidroxilación extra en C-14 con configuración  $\alpha$ .

A partir de las premisas anteriores y siguiendo las fases del análisis 3D-QSAR enumeradas en la introducción, se detallan a continuación los resultados obtenidos en cada una.

#### 3.1.4.1 Análisis conformacional

Tanto las acnistinas como las withajardinas estudiadas en este trabajo constan de dos subestructuras relativamente rígidas: una esteroidal y un sistema biciclo. Ambas están unidas por un enlace sencillo que permite la rotación mutua de las dos subestructuras. La principal diferencia entre withajardinas y acnistinas reside en la naturaleza del sistema biciclo y de su disposición en la cadena esteroidal. Sin embargo, los resultados experimentales de bioactividad muestran que esta es similar en los dos grupos de compuestos con igualdad de sustituyentes en el anillo esteroidal. Esto sugiere que la subestructura responsable de la bioactividad debe ser el esqueleto esteroidal. Por tanto, en adelante sólo se considerará la subestructura esteroidal como objeto de la modelación QSAR.

El esqueleto molecular de los withanolidos está compuesto por cuatro ciclos fusionados, se puede considerar bastante rígido desde un punto de vista conformacional. La diferencia estructural más notable entre los distintos compuestos se localiza en la geometría del anillo A. La presencia del  $5\beta,6\beta$ -epóxido saca este anillo del pseudopiano formado por el resto de anillos del esqueleto esferoidal, logrando medirse un ángulo  $\phi$  entre los planos formados de un lado por los átomos 1,2,3,4 y, por otro el resto de átomos en los anillos B,C,D (5-17) (Figura 10).

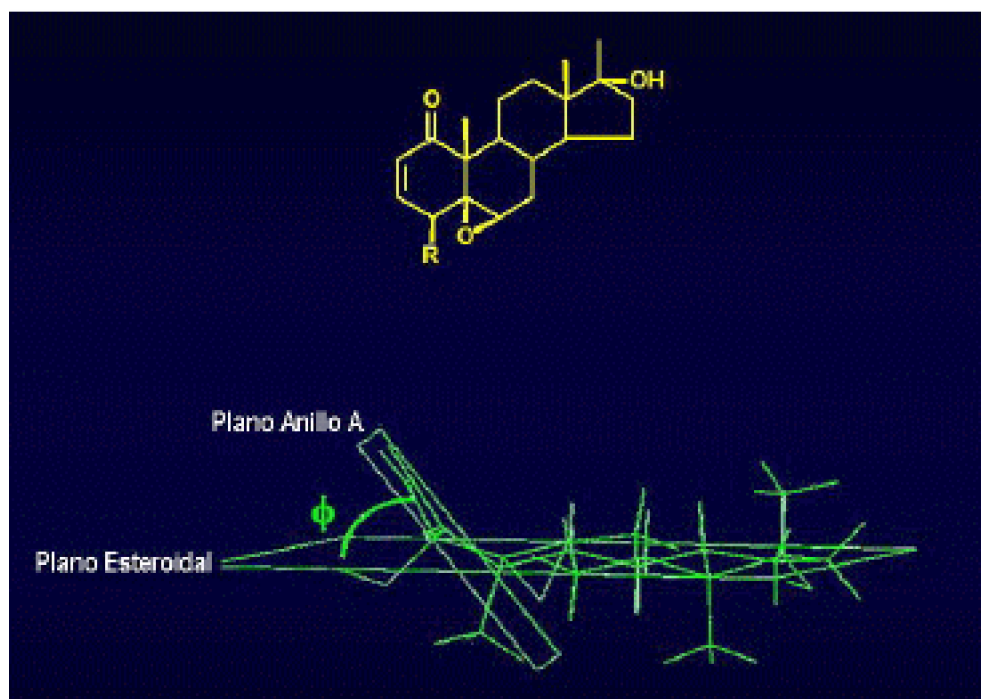


Figura 10. Estructura conformacional de la Acnistina E y la posición del anillo A

Los datos experimentales para la actividad leishmanicida y la citotoxicidad versus el ángulo  $\phi$  se muestran en la **Figura 11**. Puede observarse un incremento cuasi-lineal de la bioactividad con la apertura del ángulo  $\phi$  para ambas clases de compuestos. En la Acnistina A, un compuesto muy activo y tóxico que tiene un epóxido de  $5\beta,6\beta$ , el ángulo medido es  $47^\circ$ , pero se incrementa a  $61^\circ$  para la Acnistina E, el compuesto más activo en el grupo. El ángulo del plano es más abierto para esta molécula por la presencia de un grupo hidroxilo cercano al

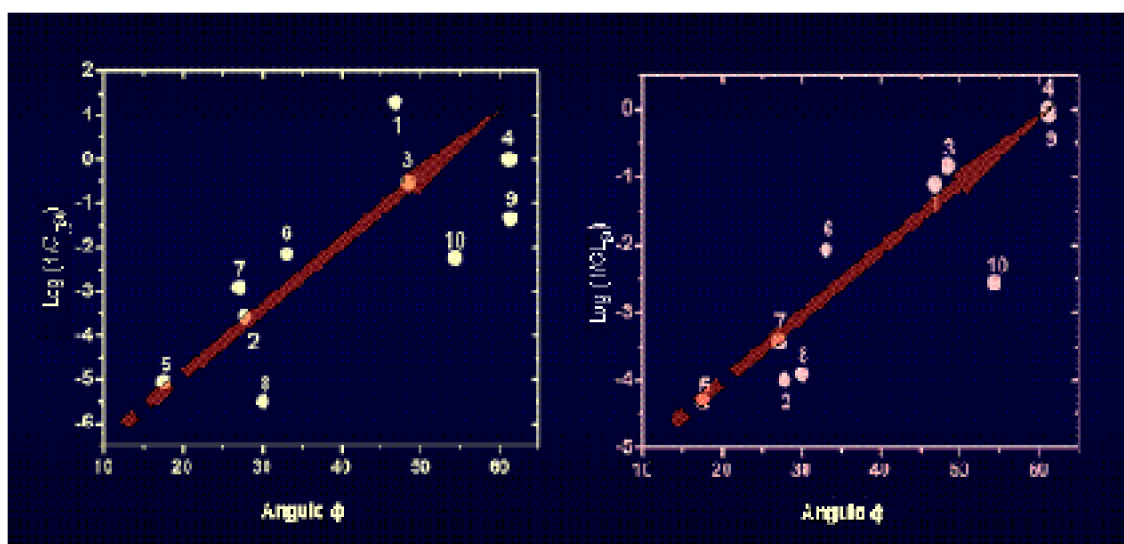


Figura 11. Correlaciones entre  $\text{Log}(1/CL_{50})$  y  $\text{Log}(1/CE_{50})$  vs el ángulo del plano del Anillo A. Los números se refieren a los compuestos de la Tabla 2.

Las estructuras optimizadas al nivel de teoría B3LYP/6-31G(d)13 reproducen

bastante bien las extraídas de la Base de Datos Cristalográfica de Cambridge14 (RMSD < 0.01 Å para los átomos comunes, sin hidrógenos en el caso de la Acnistina E). Sin embargo es preciso mencionar que el cálculo teórico encuentra un conformero más estable para dicha Acnistina, debido a una estabilización extra ocasionada por un enlace de hidrogeno intramolecular entre el hidroxilo en 4 y el oxígeno del epóxido. Esta interacción no se encuentra en las estructuras cristalográficas, debido probablemente al entorno cristalino. En principio, se considera esta conformación en el modelado QSAR, en atención a los siguientes criterios: 1) Mantener la concordancia con los datos cristalográficos y 2) En el hipotético caso de interacción con un receptor, esta conformación se vería favorecida por la propia interacción intermolecular.

#### 3.1.4.2 Regla de Alineación

Dada la rigidez del esqueleto esteroidal se decide alinear todas las moléculas objeto del estudio QSAR utilizando los siguientes átomos 5,8,10,13,14. En la **Figura 12** se representa el resultado de dicho alineamiento, junto con el cubo que delimita la región tridimensional donde se han calculado los descriptores estereoelectrónicos que se pretenden correlacionar con los datos experimentales de bioactividad.

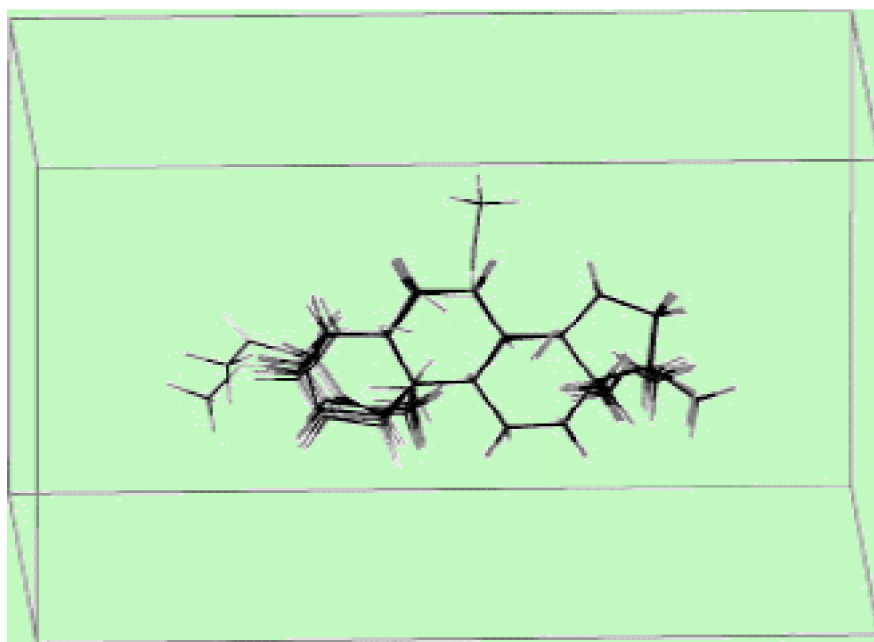


Figura 12. Alineación de moléculas

#### 3.1.4.3 Cálculo de descriptores moleculares

En el entorno 3D-QSAR los descriptores moleculares consisten en una malla tridimensional de puntos, en la que a cada punto se le asigna el valor de la energía de interacción entre la molécula en cuestión y un átomo probeta situado en dicho punto. Las energías de interacción que se consideran inicialmente son la estérica y la electrostática, que representarían las contribuciones más comunes en una interacción ligando-receptor hipotética. La energía estérica se calcula mediante la expresión de van der Waals

asignando a cada átomo los parámetros correspondientes del Campo de Fuerzas Tripos, tales como radio de van der Waals y coeficientes de atracción y repulsión. La energía electrostática es calculada mediante la expresión de Coulomb, teniendo en cuenta la carga electrostática de cada átomo obtenida del cálculo mecanico-cuántico por ajuste del potencial electrostático (formalismo CHELPG). Se seleccionó como átomo probeta un átomo de C con hibridación  $sp^3$  y carga +1, que suele ser usado para mapear dicho tipo de interacciones en los modelos 3DQSAR. Se han probado distintas mallas tridimensionales, en las que se ha variado la distancia entre puntos de 0.5 a 2 Å, buscando un compromiso entre una mayor resolución de los campos tridimensionales y una reducción del ruido estadístico por la acumulación de valores que no aportan señal.

Dada la naturaleza de la energía de interacción en las cercanías del radio atómico, donde el componente estérico aumenta notablemente en una distancia interatómica pequeña, se seleccionan unos valores de corte para dicha energía, y se asigna este valor de corte a todas las energías correspondientes a puntos más cercanos al radio de cada átomo. Los valores de energía electrostática no se calculan en estos puntos y se le asigna el mismo valor nominal que la energía de corte. Esta manipulación es estadísticamente aconsejable, para mantener la continuidad de los descriptores tridimensionales, e intuitivamente aceptable, dado que las interacciones ligando-receptor se suponen en distancias superiores al radio de van der Waals.

#### **3.1.4.4 Modelos PLS15**

En principio se ha contemplado la búsqueda de correlaciones entre los datos experimentales de actividad leishmanicida y citotoxicidad de forma separada con los campos estérico y electrostático de las acnistinas y withajardinas descritos en la **Tabla 2**. Los valores de bioactividad han sido recalculados aplicando la transformación  $\text{Log}(1/CE_{50})$  y  $\text{Log}(1/CE_{50})$ , según el caso y siguiendo las recomendaciones estándar en el ámbito QSAR16.

Además de buscar modelos que puedan explicar la bioactividad de dichos compuestos, también se requiere que dichos modelos puedan discriminar entre efectividad y citotoxicidad. Sin embargo, el conjunto de datos experimentales muestran una alta correlación entre ambos conjuntos de datos ( $r^2 = 0.76$ ), como puede observarse en la **figura 11**. Es por ello probable que 3D-QSAR sea incapaz de proporcionar un modelo que proponga mejoras estructurales que aumenten la actividad leishmanicida y disminuyan la citotoxicidad.

En la **Tabla 3** se presentan los datos estadísticos de regresión obtenidos mediante validación cruzada (Leave-One-Out crossvalidation (LOO)), para distintas combinaciones de campos moleculares y variables dependientes.

ACTIVIDAD LEISHMANICIDA						
Energía de corte (kcal/mol)	30	30	30	90	10	5
Intervalo de red (Å)	1	2	0.5	1	1	1
Coficiente $q^{2*}$	0.555	0.441	0.545	0.544	0.562	0.552
Error estándar de predicción (unidades log)	1.237	1.388	1.251	1.251	1.227	1.240
CITOTOXICIDAD						
Energía de corte (kcal/mol)	30	30	30	90	10	5
Intervalo de red (Å)	1	2	0.5	1	1	1
Coficiente $q^{2*}$	0.157	0.049	0.149	0.186	0.171	0.245
Error estándar de predicción (unidades log)	2.264	2.404	2.274	2.224	2.245	2.145

(\*) Modelo de dos componentes

Tabla 3. Parámetros CoMFA para la bioactividad y Datos Estadísticos de "validación cruzada"

Finalmente se selecciona la combinación de campos estérico y electrostático definidos en una región con un tamaño de red de 1 Å, y con un valor de corte para la energía de interacción de 10 kcal/mol, en el caso de la actividad leishmanicida; y 5 kcal/mol en el caso de la citotoxicidad. Los modelos finales resultantes de correlacionar estas bioactividades con dichos campos moleculares sin validación cruzada y extrayendo dos componentes en cada caso, arrojan los siguientes datos estadísticos:

- Para la actividad leishmanicida:  $r^2 = 0.988$  , Error Estándar de Estimación= 0.231 en unidades log.

- Para la citotoxicidad:  $r^2 = 0.891$  , Error Estándar de Estimación = 0.852 en unidades log. Dada la complejidad de la ecuación QSAR obtenida, que define la bioactividad en términos de los valores de energía de interacción en cada punto de la red, es usual representar dicha información en forma de gráficos moleculares con los campos de interés mapeados sobre alguna estructura molecular. En particular, el campo correspondiente a multiplicar la desviación estándar obtenida en cada punto por el coeficiente asociado a dicho punto en la ecuación QSAR, es de enorme interés dado que permite discriminar las áreas que realmente influyen en el modelo y que sentido, positivo o negativo tiene esta influencia.

En las **Figuras 13 y 14** se representa el campo de desviación estándar de la subestructura de la acnistina A sin el sistema biciclo sobre el C-17, desde dos puntos de vista diferentes, ecuatorial y axial, respectivamente. Los modelos obtenidos de la actividad leishmanicida se muestran en la parte izquierda de las figuras con las isosuperficies en forma de malla. Los modelos obtenidos para la citotoxicidad aparecen

en la parte derecha con las isosuperficies en formato sólido; se han separado las contribuciones provenientes de los campos estérico y electrostático. En cada caso los valores más positivos se representan en rojo y los más negativos en azul.

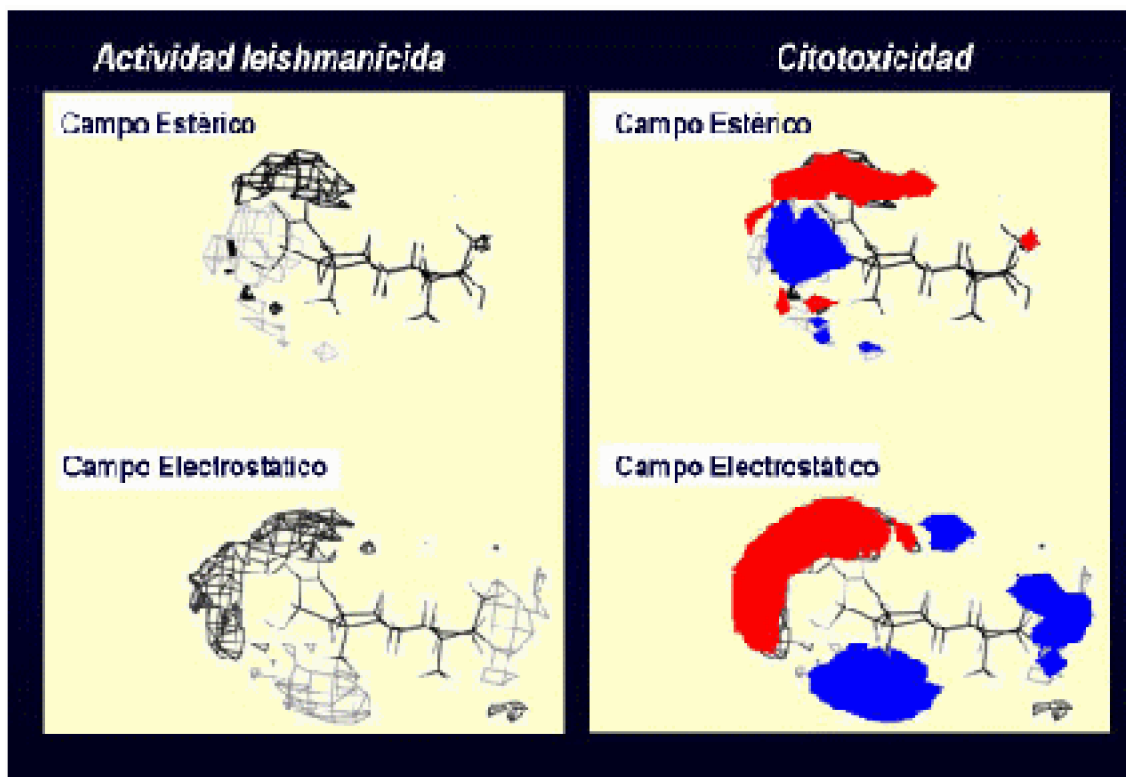


Figura 13. Campos CoMFA. Vista Ecuatorial de la subestructura de la Acnistina A

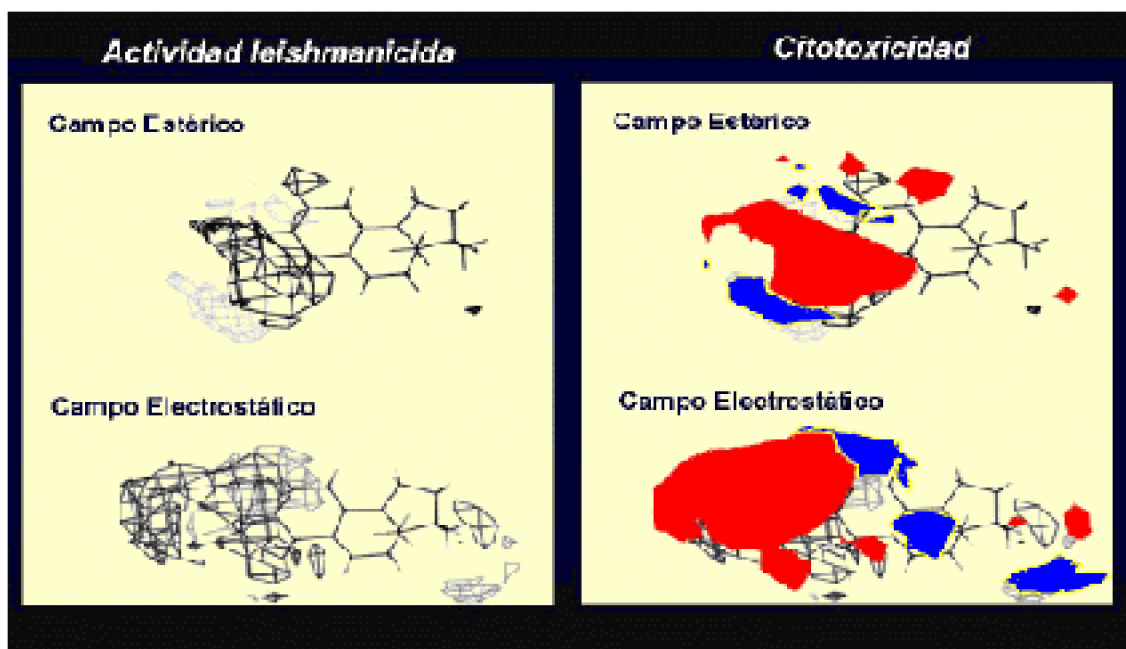


Figura 14. Campos CoMFA. Vista Axial de la subestructura de la Acnistina A

En la parte superior de las figuras se representa el efecto del campo estérico. Las



zonas de malla oscura indican áreas donde un aumento de campo estérico resulta en aumento de la bioactividad, siendo lo contrario para las zonas en gris claro. Se puede observar en dichas figuras la focalización del modelo en el anillo A. **De dicho modelo se deriva que sustituyentes relativamente voluminosos en la prolongación de dicho anillo mas allá del doble enlace en C2,C3 son beneficiosos para la actividad leishmanicida, pero también para incrementar la citotoxicidad. Así mismo, un aumento de campo estérico en la zona que ocuparía el anillo A si se mantuviera en el pseudoplano esteroideal sería perjudicial tanto para la efectividad como para la citotoxicidad.**

Para interpretar los efectos del campo electrostático es necesario tener en cuenta la naturaleza bipolar de dicho campo (positivo y negativo). Así se tiene que el área roja que rodea al anillo A está indicando que un aumento de carga positiva en dicha zona resulta en un incremento tanto de la efectividad como de la citotoxicidad. **Por otro lado, la zona coloreada en azul en el entorno del oxígeno del epóxido indica que un aumento de carga negativa en esa posición supone un incremento tanto de la efectividad como de la citotoxicidad.**

Además, se observa otra zona, menos significativa, de influencia electrostática en las proximidades del anillo D, que parece estar ligada a la diferencia entre acnistinas y withajardininas relacionada con la sustitución en el C-17. El modelo parece asociar una pequeña parte de la varianza en los datos experimentales a las diferencias electrostáticas entre ambos tipos de compuestos.

Adicionalmente, la influencia del ambiente electrostático sobre la bioactividad en forma de un dipolo intramolecular también se puede observar cuando se grafican los datos experimentales contra el dipolo molecular (**Figura 15**). Puede deducirse que existe una correlación entre el momento dipolar y la efectividad, lo cual está de acuerdo con los resultados generados en CoMFA. Sin embargo el modelo 3D-QSAR puede ser utilizado para identificar la orientación del dipolo que incrementa la bioactividad.

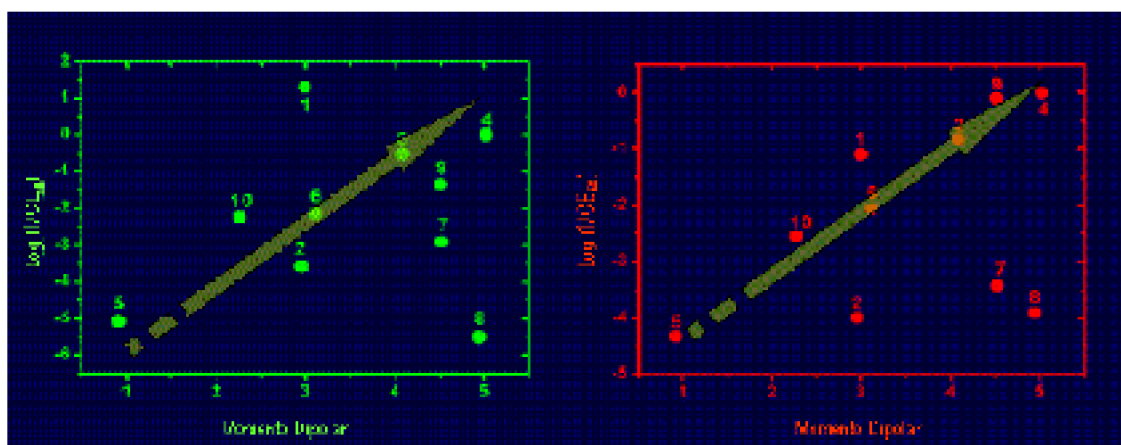


Figura 15. Correlaciones entre  $\text{Log}(1/CL50)$  y  $\text{Log}(1/CE50)$  vs el Momento Dipolar. Los números se refieren a los compuestos de la Tabla 2.

Otra fuente de validación lateral para el modelo CoMFA puede ser el cálculo del parámetro de lipofilicidad  $\text{ClogP}$ , como se evidencia en la **Figura 16**, en la cual se observa una buena correlación entre los datos experimentales y los valores de  $\text{ClogP}$ . Sin

embargo, el descriptor de lipofilidad separa las acnistinas de las withajardinas.

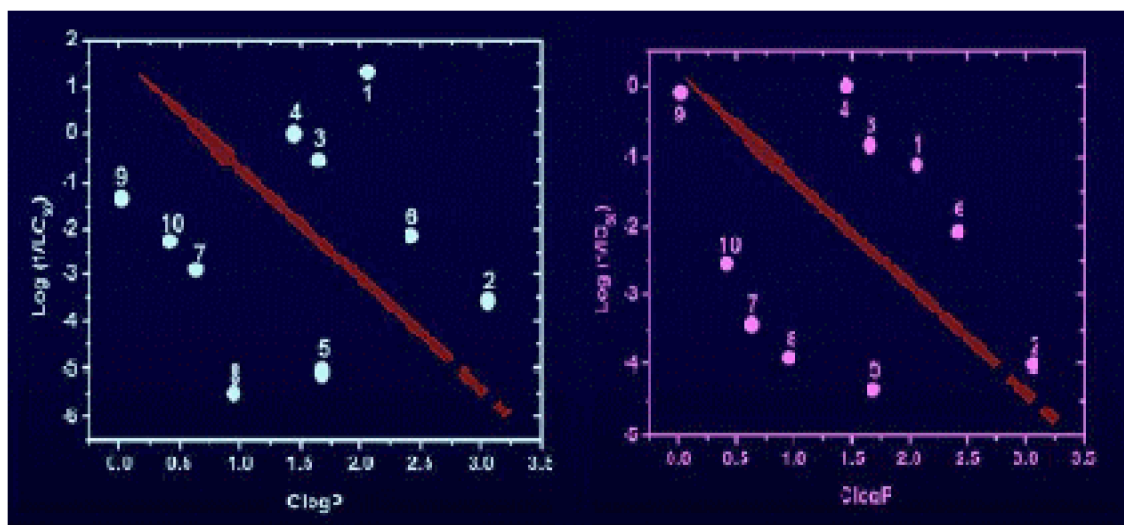


Figura 16. Correlaciones entre  $\text{Log}(1/CL_{50})$  y  $\text{Log}(1/CE_{50})$  vs  $\text{ClogP}$ . Los números se refieren a los compuestos de la Tabla 2.

Es claro que la efectividad y la citotoxicidad se incrementan cuando el valor de  $\text{ClogP}$  decrece. Las withajardinas tienen un  $\text{ClogP}$  mucho menor que las acnistinas, ya que contienen un grupo polar extra correspondiente al C-14OH. No obstante debe observarse que la acnistina F se sale de las características de las acnistinas y se engloba mejor en el de las withajardinas, debido a que contiene un par de grupos hidroxilo que decrecen su contribución al  $\text{ClogP}$ ; es evidente entonces que la bioactividad se incrementa por la hidrofiliidad de la molécula.

De los resultados obtenidos se pueden derivar las siguientes conclusiones:

- El modelo mecánico-cuántico B3LYP/6-31G(d) reproduce bastante bien las geometrías cristalográficas de los compuestos considerados.
- Los datos estadísticos obtenidos muestran que las correlaciones entre descriptores estructurales y actividad leishmanicida son bastante aceptables en su capacidad predictiva, mientras que las correlaciones encontradas en el caso de la citotoxicidad son más deficientes (**Figura 17**).
- Los datos experimentales revelan un gran paralelismo entre la actividad leishmanicida y la citotoxicidad, lo que significa que cualquier modificación estructural que se realice para mejorar o disminuir una de ellas, afectará a ambas simultáneamente.

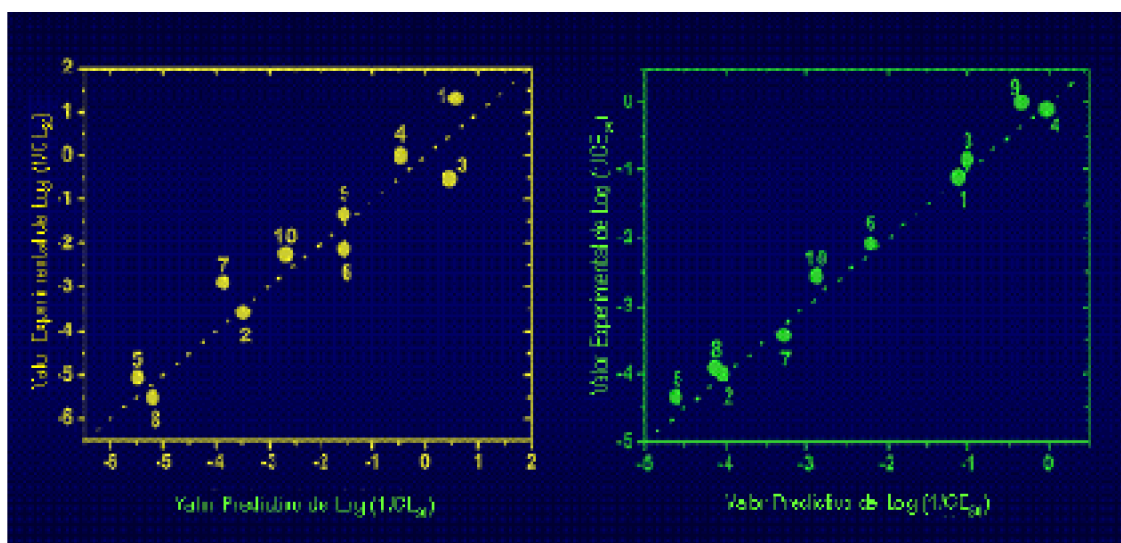


Figura 17. Datos Experimentales vs Predictivos de Log (1/ CL50) y Log (1/ CE50)

### 3.1.5 Conclusiones

Algunas withajardinas y acnistinas exhiben un potente efecto sobre amastigotes intracelulares de *Leishmania panamensis*; no obstante también exhiben una alta citotoxicidad.

Para tratar de diseñar análogos estructurales que mantengan la efectividad y disminuyan la toxicidad se ha realizado un análisis computacional, de tal manera que se generen moléculas que retengan algunas características funcionales de los anillos esteroidales A y B. Para ello se ha desarrollado un estudio preliminar de búsqueda de correlación entre datos experimentales de bioactividad y descriptores de estructura molecular para una serie de acnistinas y withajardinas. En atención a la evidencia experimental, se ha simplificado el análisis computacional teniendo en cuenta solamente el sistema esteroideal y desconociendo la contribución del sistema biciclo en la posición C-17.

Se ha empleado la metodología 3D-QSAR para la realización de dicho trabajo debido a la gran flexibilidad en el tratamiento de la variabilidad conformacional en el conjunto de moléculas a estudiar. Además la relativa rigidez del esqueleto esteroideal permite un alineamiento sencillo de dichas estructuras. En principio se han contemplado los campos estérico y electrostático, que conforman el estándar CoMFA del análisis 3D-QSAR, como responsables de la distinta bioactividad registrada.

Las diferencias observadas en bioactividad se pueden explicar satisfactoriamente por la influencia de los campos estérico y electrostático en el entorno de los anillos A y, en menor grado, B. En particular, determinada disposición del anillo A y de sustituyentes voluminosos adecuados en las posiciones 2,3, favorecen la bioactividad. Así mismo, el modelo muestra que un aumento de carga positiva en torno a las posiciones 2,3,4 del anillo A y un incremento de carga negativa en las proximidades del grupo epóxido implican aumento de la bioactividad. Esta disposición de cargas de distinto signo en el

espacio sugiere la interacción favorable que un dipolo con dimensiones de un esqueleto del tipo naftaleno o análogo pudiera tener con el receptor hipotético.

Adicionalmente se podrían considerar otros campos tridimensionales para ver su efecto sobre la actividad leishmanicida y citotoxicidad tales como enlace de hidrogeno, orbitales moleculares de frontera o funciones de Fukui. Sin embargo, dada la alta correlación existente entre estas dos variables dependientes, es bastante probable que los posibles modelos que se pudieran obtener no discriminaran entre un tipo de bioactividad y otro. **Finalmente y aunque hay un alto nivel de actividad leishmanicida con la mayoría de los compuestos analizados, la alta toxicidad asociada impide llevar a cabo otras transformaciones sintéticas para mejorar su perfil biológico.**

### **3.1.6 Bibliografía**

---

1. Dinan, I., Bourne, P., Meng, Y., Sarker, S., Tolentino, R., Withig, P. Assesmentof natural product in the Drosophila melanogaster BII cell bioassay for ecdysteroid agonist and antagonist activities. *CMLS Cell. Mol. Life Sci.* 2001, 58, 321-342 .
2. Kam T-S.; Sim K-W.; Koyano T.; Toyoshima M.; Hayashi M.; Komiyama K. Cytotoxic and leishmanicidal aminoglycosteroids and aminosteroids from *Holarrhena curtisii*. *J. Nat. Prod.* 1998, 61, 1332-1336.
3. Bravo J.; Sauvain M.; Gimenez A.; Balanza E.; Serani L.; Laprevote G.; Massiot G.; Lavaud C. Trypanocidal withanolides and withanolide glycosides from *Dunalia brachyacantha*. *J. Nat. Prod.* 2001, 64, 720-725.
4. Savchenko T.; Whiting P.; Germade A.; Dinan L. Ecdysteroid agonist and antagonist activities in species of the Solanaceae. *Biochem. Sys. Ecol.* 2000, 28, 403-419.
5. Luis J.G.; Echeverri F.; Rojas M.; García F. The structure of acnistin B and the immunosuppressive effect of acnistins A, B and E. *Planta Med.* 1994a, 60, 348-350.
6. Orenes Lorente S., Gomez R., Jiménez C., Cammerer S., Yardley V., de Luca-Fradley K., Croft S., Ruiz L., Urbina J., Gonzalez D., Gilbert Ian H. Biphenylquinuclidines as inhibitors of squalene synthase and growth of parasitic protozoa. *Bioorg. Med. Chem.* 2005, 13, 3519-3529.
7. Avery M. A.; Muraleedharan K. M.; Desai P. V.; Bandyopadhyaya A. K.; Furtado M. M.; Tekwani B. L. Structure-Activity Relationships of the Antimalarial Agent Artemisinin. 8. Design, Synthesis, and CoMFA Studies toward the Development of Artemisinin-Based Drugs against Leishmaniasis and Malaria. *J. Med. Chem.* 2003, 46, 4244-4258
8. Selleri S.; Gratteri P.; Costagli C.; Bonaccini C. ; Constanzo A.; Melani F. ; Guerrini G.; Ciciani G.; Costa B.; Spinetti F.; Martini C.; Bruni F. Insight into 2-phenylpyrazolo[1,5- a]pyrimidin-3-yl acetamides as peripheral benzodiazepine receptor ligands: Synthesis, biological evaluation and 3D-QSAR investigation. *Bioorg. Med. Chem.* 2005, 13, 4821– 4834.
9. Luis J.G.; Echeverri F.; Quiñones W.; Gonzalez A.; Torres F.; Cardona G.; Archbold R.; Perales A.. Unambiguous <sup>13</sup>C NMR assignment of acnistins and absolute configuration of acnistin A. *Steroids* 1994b, 59, 299-303.

10. Luis J.G.; Echeverri F.; Gonzalez A.G. Acnistins F-H, withanolides from *Dunalia solanacea*. *Phytochemistry* 1994c, 36, 769-772.
11. Luis J.G.; Echeverri F.; Quiñones W.; Gonzalez A.G.; Torres F.; Cardona G.; Archbold R. 1994b. Withajardins, withanolides with a new type of skeleton structure of withajardins A, B, C and D. Absolute configuration of withajardin C. *Tetrahedron* 1994d, 50, 1217-1226.
12. Echeverri F.; Quiñones W.; Torres F.; Cardona G.; Archbold R.; Luis J.G.; Gonzalez A.G. Withajardin E, a withanolide from *Deprea orinocensis*. *Phytochemistry* 1995, 40, 923- 925.
13. Froese R.D.J.; Musaev D.G.; Morokuma K. Theoretical study of substituent effects in the diimine-M(II) catalyzed ethylene polymerization reaction using the IMOMM method. *J. Am. Chem. Soc.* 1998, 120, 1581-1587.
14. Allen F.H. The Cambridge Structural Database: a quarter of a million crystal structures and rising. *Acta Crystallogr* 2002, 380-388.
15. Wold S.; Ruhe A.; Wold H.; Dunn III. The collinearity problem in linear regression. The partial least square approach to generalized inverse. *SIAM J. Sci. Stat. Comput.* 1984, 5, 735-743.
16. Thibaut U.; Folkers G.; Klebe G.; Kubinyi H.; Merz A.; Rognan D. "Recommendations for CoMFA" In 3D QSAR in drug design: theory, methods and applications. Kluwer/ESCOM, D. Ed.; 2000; pp 443-485.

## 3.2 Isósteros (Cromanos) como farmacóforos leishmanicidas *in vitro*

### 3.2.1 Introducción

En el análisis de la actividad leishmanicida de varios withanolidos contra amastigotes de *Leishmania (V.) panamensis* se demostró que existe una íntima relación con la citotoxicidad. Sin embargo, en la búsqueda de moléculas que posean mejores perspectivas farmacológicas se ha realizado una aproximación basada en la búsqueda de bioisósteros de los anillos A y B de las withajardinas y acnistinas. Usualmente el bioisosterismo trata de reemplazar átomos o grupos de átomos por equivalentes que posean una distribución similar de electrones<sup>1,2</sup>, de tal manera que se efectue una interacción similar o mejor con un blanco terapéutico específico. No obstante esta metodología también es válida cuando se encuentra una distribución electrónica en una zona de la molécula involucrada en una actividad determinada. En el caso de los withanolidos, la zona que comprende el carbonilo, el grupo 4-OH y el epóxido pueden hallar su equivalente electrónico en una sistema de benzopirano (Figura 18), en el cual el par de electrones del oxígeno dentro del ciclo participan en una conjugación similar a la contribución del hidroxilo. De otro lado, un sistema aromático adecuadamente funcionalizado por ejemplo con grupo -NO<sub>2</sub> podría suministrar una distribución de cargas y una densidad electrónica en una zona similar a la del epóxido. El sistema benzopirano

se encuentra en algunas sustancias naturales, como por ejemplo varios flavonoides, cumarinas, lignoides y alcaloides, algunas de las cuales también poseen efectos antiparasitarios<sup>3-9</sup>. En esta tesis se han analizado varios benzopiranos y análogos (Figura 19), con el fin de determinar si poseen un mejor perfil biológico que los withanolidos evaluados en la primera fase de este trabajo.

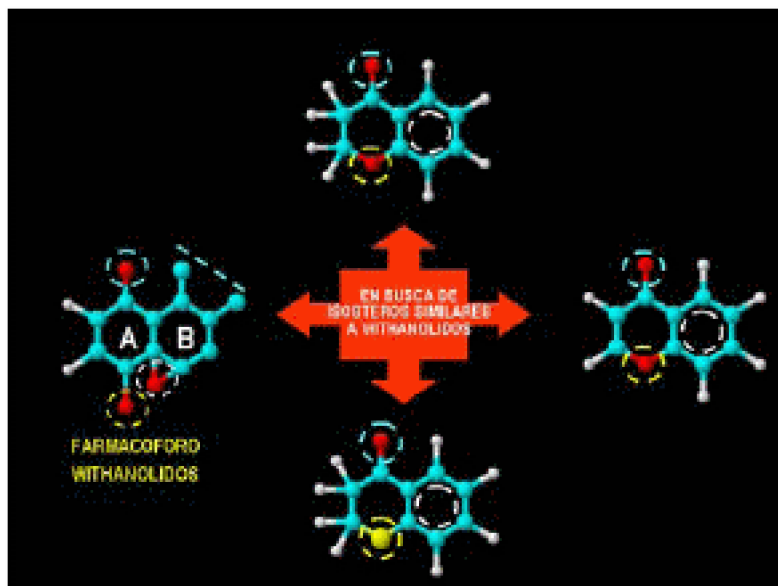


Figura 18. Comparación estructural del farmacóforo de withanolidos con benzopiranos

### 3.2.2 Benzopiranos

---

Las propiedades de los benzopiranos en general son las siguientes:

- Son relativamente pequeñas,
- Presentan un anillo aromático lo cual le confiere características hidrofóbicas a esta parte de la molécula,
- Tiene un anillo heterociclo con dos átomos de oxígeno o en el caso de los tiobenzopiranos un átomo de oxígeno y uno de azufre.

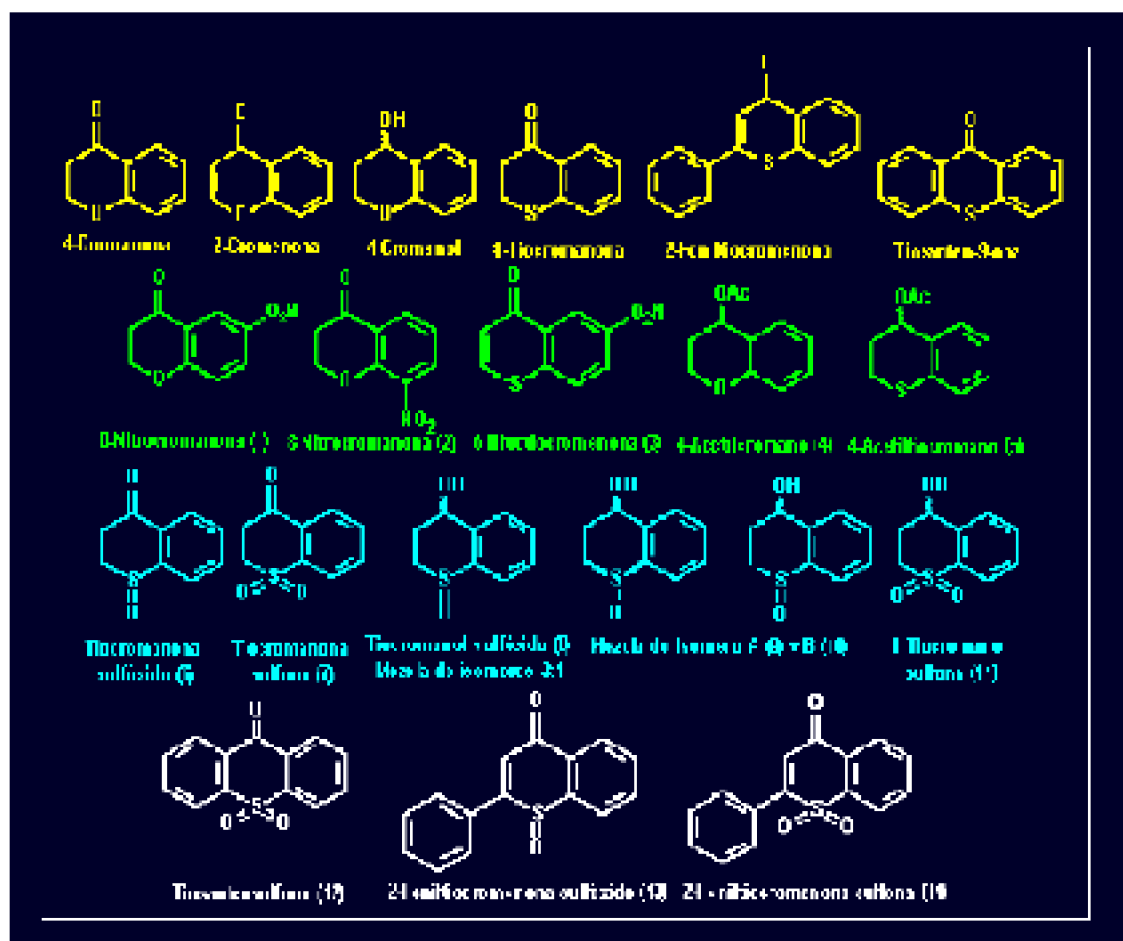
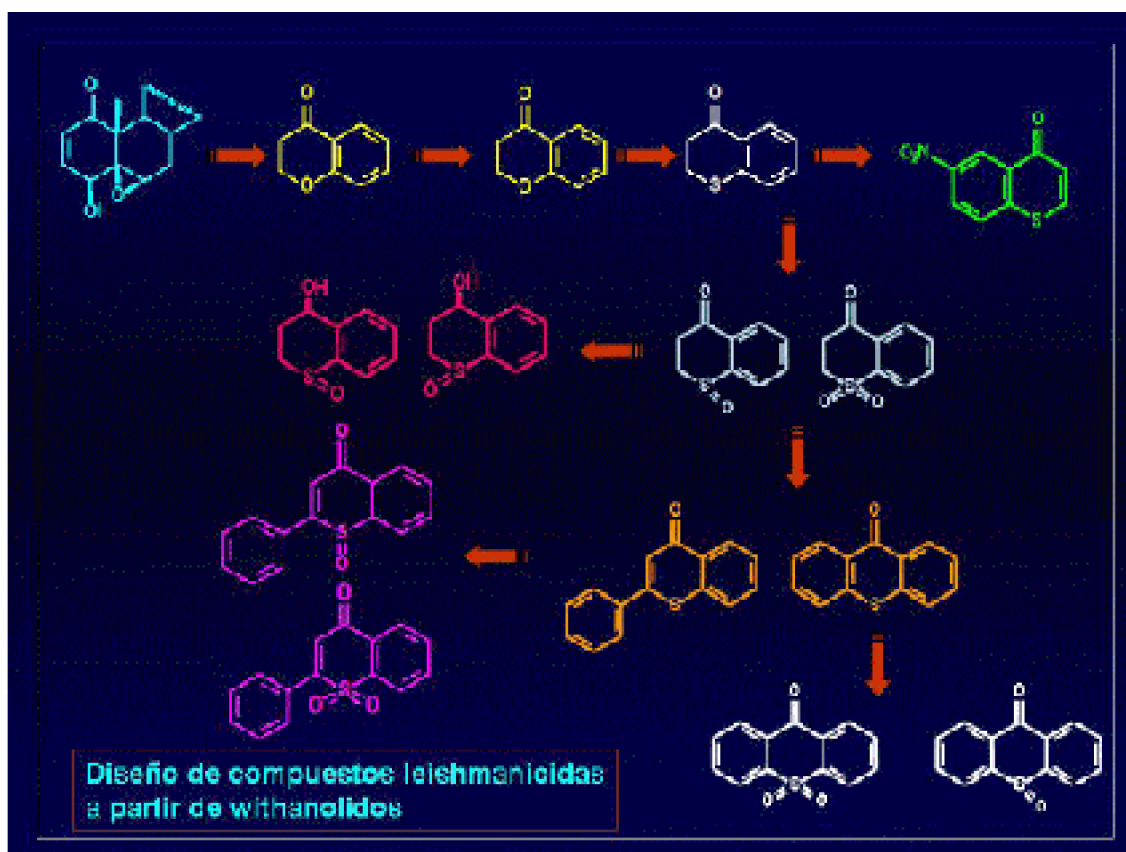


Figura 19. Cromanos y análogos evaluados en esta fase

### 3.2.3 Resultados y Discusion

En el Esquema 1 se ilustra el procedimiento de generación de estas nuevas moléculas bioactivas. Así, en primera instancia los anillos A y B del sistema esteroidal de las withajardinas y acnistinas activas se puede asimilar estructuralmente a una cromenona; su actividad se encuentra cercana al límite de CE50 promisorio (42.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), pero su citotoxicidad es notablemente reducida (292.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Tabla 4), pero se encontraba dentro de los criterios de selección como sustancia con actividad leishmanicida promisoriosa, establecidos y descritos en el numeral 3.1.3 .



Esquema 1. Evaluación hacia nuevos compuestos leishmanicidas (I)

A partir de esta molécula se exploraron entonces otras dos series, un cromano y un tiocromano. Estas nuevas moléculas son heterociclos relativamente pequeños, tienen un anillo aromático que les confiere características hidrofóbicas y son susceptibles de modificaciones adicionales. Inicialmente el cromano fue sometido a una serie de transformaciones que involucraban la reducción, acetilación y nitración, con resultados prometedores (**Esquema 2**), a pesar de que estas moléculas no parecen tener una amplia gama de posibilidades para transformarlas en otros derivados con mejor actividad leishmanicida.



COMPUESTO	CL <sub>50</sub> (µg/mL, µM)	CE <sub>50</sub> (µg/mL, µM)	IS
Acnistina A	0.27 (0.6)	3.0 (6.4)	0.1
Acnistina B	35.5 (78.4)	54.8 (121.2)	0.6
Acnistina C	1.7 (3.2)	2.3 (4.9)	0.7
Acnistina E	1.0 (2.1)	1.0 (2.1)	1.0
Acnistina F	158.5 (324.4)	76.0 (155.5)	2.1
Acnistina G	0.5 (10.0)	7.9 (16.7)	1.1
Withajardina A	22.0 (45.2)	23.1 (47.5)	1.0
3-OMe-withajardina A	248.0 (495.4)	>50.0 (	
Withajardina B	3.8 (7.6)	1.1 (2.2)	3.5
Withajardina C	9.5 (17.4)	12.8 (23.5)	0.7
<b>2-Cromonona</b>	<b>292.2 (1999.4)</b>	<b>42.4 (290.1)</b>	<b>6.9</b>
<b>4-Cromanona</b>	<b>&gt;500 (3374.7)</b>	<b>30.2 (203.8)</b>	<b>---</b>
<b>4-Tiocromanona</b>	<b>&gt;625.9 (&gt;3202.4)</b>	<b>66.4 (343.4)</b>	<b>---</b>
Glucantime	444.4	5.4	82.3

--- No se puede calcular el IS porque el valor de CE<sub>50</sub> y/o CL<sub>50</sub> según el caso correspondía a un valor no determinado con exactitud y perteneciente a un intervalo abierto.

*Tabla 4. Actividad Leishmanicida de Withajardinas y Acnistinas vs Cromeno*

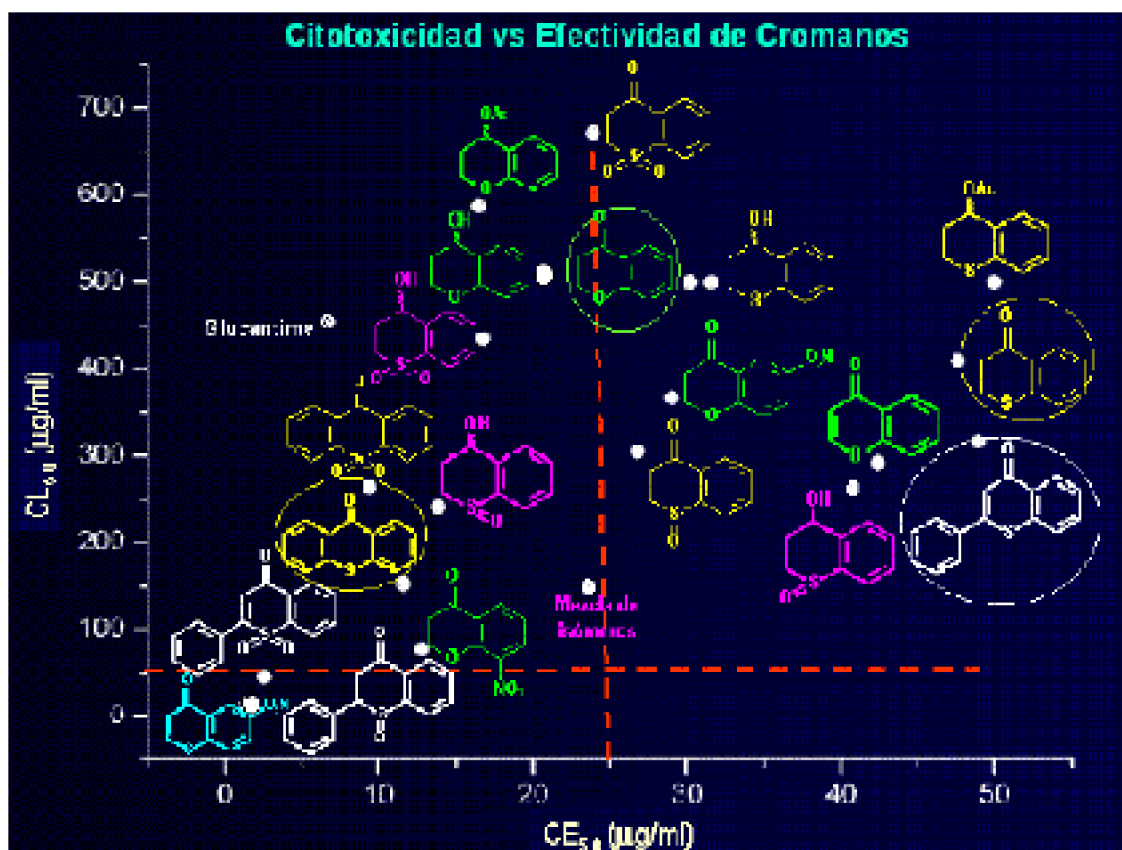
La acetilación del cromanol y tiocromanol procede de manera relativamente versátil y con rendimientos apreciables, mientras que la nitración de la 4-cromanona genera con relativa facilidad los productos **1** y **2**. Sin embargo, la reacción de nitración de la tiocromanona produce el compuesto inesperado **3**, mediante una secuencia de reacciones que involucran la nitración misma así como la dehidrogenación. La nitración del tiocromanol genera productos que se descomponen con gran facilidad y difíciles de separar. De otro lado, la preparación de sulfóxidos y sulfonas a partir de tiocromanona, tiocromanol y tioxanten-9-ona utilizando peróxido de hidrogeno en ácido acético o ácido trifluoroacético permitió obtener los productos **6–14**. En el caso de la nitración de los sulfóxidos y sulfonas la reacción no procedió debido a que estas funciones tienen un efecto desactivante en la reactividad del anillo.

COMPUESTO	CL <sub>50</sub> (µg/mL, µM)	CE <sub>50</sub> (µg/mL, µM)	IS
4-cromanona	>500 (>3374.7)	30.2 (203.8)	---
2-cromanona	292.2 (1999.5)	>42.4 (>290.1)	---
4-cromanol	>500 (>3329.6)	20.85 (138.8)	---
4-tiocromanona	>525.9 (>3202.4)	56.4 (343.4)	---
4-tiocromanol	>500 (>2728.5)	31.6 (172.4)	---
2-feniltiocromanona	316.3 (1027.3)	>48.9 (>205.2)	---
bioxanten-9-ona	152.1 (716.54)	11.6 (54.6)	13.1
<b>1</b>	366.7 (1898.4)	29.05 (150.4)	12.6
<b>2</b>	76.8 (397.6)	12.8 (66.3)	6.0
<b>3</b>	15.9 (105.9)	1.4 (9.3)	11.4
<b>4</b>	588.9 (3053.4)	16.5 (85.8)	35.6
<b>5</b>	>500 (2400.6)	>50 (>240.1)	---
<b>6</b>	304.4 (1889.0)	>26.8 (148.7)	---
<b>7</b>	>671.0 (>3419.6)	23.9 (121.8)	---
<b>8 (Mezcla de isómeros)</b>	>142.2 (>728.3)	26.0 (133.2)	---
<b>9 (Isómero A)</b>	241.3 (1235.8)	13.9 (71.2)	17.3
<b>10 (Isómero B)</b>	>250 (>1280.34)	40.7 (209.4)	---
<b>11</b>	>435.0 (>2194.31)	16.8 (84.7)	---
<b>12</b>	283.6 (1079.13)	9.4 (38.5)	28.0
<b>13</b>	15.8 (62.13)	1.4 (5.5)	11.2
<b>14</b>	21.5 (79.5)	4.9 (18.1)	4.3
Glucantime	444.4	5.4	82.3

--- No se puede calcular el IS porque el valor de CE<sub>50</sub> y/o CL<sub>50</sub> según el caso corresponde a un valor no determinado con exactitud y perteneciente a un intervalo abierto.

Tabla 5. Actividad Leishmanicida y Citotoxicidad de Cromanos y Derivados Hemisintéticos

Resultados más promisorios respecto a los cabeza de serie (cromeno, cromano y tiocromanona) se obtuvieron con los derivados de la tiocromanona (**Esquema 2**), aunque este compuesto de por sí es medianamente activo (CE<sub>50</sub> = 56.4 µg/mL), se encuentra por encima del límite superior del rango establecido; así, el compuesto **3** muestra una CE<sub>50</sub> = 1.4 y CL<sub>50</sub> = 15.9 µg/ml; es decir se ha modificado la efectividad en 34 veces, pero no se ha mejorado la citotoxicidad con respecto a los withanolidos.



Esquema 2. Efectividad vs Citotoxicidad de Cromanos y Análogos

Otros hechos biológicos dependientes de la estructura son los siguientes:

- La reducción del carbonilo de manera no estereoespecífica genera una mezcla de enantiómeros con mayor actividad que el compuesto original, muy posiblemente por la capacidad de formar puentes de hidrógeno. No obstante hay que resaltar que los alcoholes comparados con las cetonas son menos tóxicos.
- La oxidación del tiocromanol origina a su vez una mezcla de sulfóxidos (**8**), con una actividad  $CL_{50} > 142.2 \mu\text{g/mL}$  y  $CE_{50}$  de 26.0. La separación cromatográfica de esta mezcla permitió obtener los isómeros A (**9**) y B (**10**), de los cuales el primero es más activo que la mezcla y que el isómero B. Respecto a la citotoxicidad ambos isómeros retienen el mismo nivel, pero este es menor que el de la mezcla.
- Por su parte, en general las sulfonas son más activas que los sulfóxidos y que los tiocromanos de partida, pero su toxicidad se reduce de forma notoria.
- Es de anotar que otros análogos de cromanos y tiocromanos como las quinolinas y quinolonas se usan actualmente como antibióticos<sup>10,13</sup>; este núcleo también hace parte de sustancias antiparasitarias como la quinina. Más aun, recientemente se aislaron varias quinolonas de la especie Boliviana, *Galipea longiflora*, la cual fue patentada como leishmanicida.
- Otros compuestos con un anillo fenilo lateral o fusionado como el 2-feniltiocromeno y la tioxantenona, también tienen un buen perfil de actividad, que se incrementa a través de las oxidaciones subsecuentes del átomo de azufre a sulfóxido y sulfona.

En este orden de ideas, las sulfonas son más activas que los sulfóxidos con una citotoxicidad levemente mayor respecto a las cabezas de serie: cromano y tiocromano, pero notablemente menor que los withanolidos de origen.

### **3.2.4. Conclusiones**

---

La efectividad de todas las moléculas analizadas (cromanos y análogos) se encuentra dentro de los límites establecidos anteriormente para un compuesto promisorio (CE50 < 50.0 µg/mL); no obstante la bioactividad se mejora cuando se reducen los carbonilos a los respectivos alcoholes, sobre todo en la serie de los tioderivados. La adición de un fenilo, bien sea lateral o fusionado al sistema de tiocromano y la oxidación del átomo de azufre a una sulfona tienen un gran impacto en la mejora de acción leishmanicida. Ahora bien, en los compuestos **2**, **3**, **13** y **14** hubo una dramática mejora en la actividad pero también exhiben una alta toxicidad. El elevado índice de efectividad amerita otras transformaciones para tratar de disminuir esta citotoxicidad.

En términos generales los productos **tioxanten 9-ona**, **tioxanten sulfona** y **tiocromanol sulfona** son los mejores, debido a su alta efectividad y reducida citotoxicidad.

### **3.2.5 Bibliografía**

---

1. Moreira L.; Barreiro E. Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design. *Curr. Med. Chem.* 2005, 12, 23 -49.
2. Patani G.A.; Lavoie E.J. Bioisosterism : a rational approach in drug design. *Chem Rev.* 1996, 96, 3147- 3176.
3. Van Miert S.; Van Dyck S.; Schmidt T.; Brun R.; Vlietinck A.; Lemiére G.; Pieters L. Antileishmanial activity, cytotoxicity and QSAR analysis of synthetic dihydrobenzofuran lignans and related benzofurans. *Bioorg. Med. Chem.* 2005, 13, 661-669.
4. Larsen M.; Kromann H.; Kharazmi A.; Nielsen S. F. Conformationally restricted antiplasmodial chalcones. *Bioorg. Med. Chem. Letters* 2005, in press
5. Yenesew A.; Induli M.; Derese S.; Midiwo J. O.; Heydenreich M.; Peter M. G.; Akala H.; Wangui J.; Liyala P.; Waters N. C. Anti-plasmodial flavonoids from the stem bark of *Erythrina abyssinica*. *Phytochemistry* 2004, 65, 3029-3032.
6. Camacho M. del R.; Phillipson J. D.; Croft S. L.; Yardley V.; Solis P. N. *In vitro* antiprotozoal and cytotoxic activities of some alkaloids, quinones, flavonoids and coumarins. *Planta Med.* 2004, 70, 70-72.
7. Yenesew A.; Derese S.; Midiwo J. O.; Oketch-Rabah H. A.; Lisgarten J.; Palmer R.; Heydenreich M.; Peter M. G.; Akala H.; Wangui J.; Liyala P.; Waters N. C. Antiplasmodial activities and X-ray crystal structures of rotenoids from *Millettia usaramensis* subspecies *usaramensis*. *Phytochemistry* 2003, 64, 773-779.
8. Ramírez I.; Carabot A.; Meléndez P.; Carmona J.; Jimenez M.; Patel A. V.; Crabb

---

T. A.; Blunden G.; Cary P. D.; Croft S. L.; Costa M. Cissampeloflavone, a chalcone-flavone dimer from *Cissampelos pareira*. *Phytochemistry* 2003, 64, 645-647.

9. Ahmed M. S.; Galal A. M.; Ross S. A.; Ferreira D.; ElSohly M. A.; Rahim S. A.; Mossa J. S.; El-Ferally F. S. A weakly antimalarial biflavanone from *Rhus retinorrhoea*. *Phytochemistry* 2001, 58, 599-602.

10. Drewes S. E.; Khan F.; van Vuuren S. F.; Viljoen A. M. Simple 1,4-benzoquinones with antibacterial activity from stems and leaves of *Gunnera perperna*. *Phytochemistry* 2005, 66, 1812-1816.

11. Göker H.; Boykin D. W.; Yildiz S. Synthesis and potent antimicrobial activity of some novel 2-phenyl or methyl-4H-1-benzopyran-4-ones carrying amidinobenzimidazoles. *Bioorg. Med. Chem.* 2005, 13, 1707-1714

12. Herczegh P.; Buxton, T. B.; McPherson J. C.; Kovacs-Kulyassa A.; Brewer P. D.; Sztaricskai F.; Stroebel G. G.; Plowman K. M.; Farcasiu D.; Hartmann J. F. Osteoadsorbative Bisphosphonate Derivatives of Fluoroquinolone Antibacterials. *J. Med. Chem.*; (Brief Article) **2002**, 45, 2338-2341.

13. Gallo S. ; Chevalier J. ; Mahamoud A. ; Eyraud A. ; Pagès J. M. ; Barbe J. 4-alkoxy and 4- thioalkoxyquinoline derivatives as chemosensitizers for the chloramphenicol-resistant clinical *Enterobacter aerogenes* 27 strain. *Int. J. Antimicrob. Ag.* **2003** , 22, 270-273.

### 3.3 Evaluación preliminar de la actividad leishmanicida de varias especies de la familia Solanaceae

#### 3.3.1 Introducción.

---

Los resultados de la primera parte de esta tesis indicaron que algunas clases de withanolidos poseen una importante acción leishmanicida pero a la vez una alta citotoxicidad; además diversas modificaciones estructurales originan usualmente la pérdida de la citotoxicidad, pero también de la actividad. Se ha establecido que reacciones de oxidación de withajardinas ocasionan muchos productos colaterales, inidentificables y su rendimiento no es el óptimo para realizar los bioensayos. Por esta razón se emprendió un estudio alterno para tratar de detectar actividad leishmanicida en algunas solanaceas colombianas usadas en la etnomedicina para combatir la leishmaniosis; dicha actividad podría estar mediada por farmacóforos análogos a los que están presentes en *Dunalia* y *Deprea*. En esta fase se describen estos resultados.

El panorama anterior y considerando que Colombia es el segundo país con mayor biodiversidad, con hondas tradiciones etnomédicas, específicamente en lo relacionado

con el uso de plantas para curar enfermedades. Representa una alternativa farmacológica pero también es fuente de materiales valiosos para la industrias farmoquímica, alimenticia y cosmética; por razones políticas y sociales en las dos últimas décadas estas industrias han estado alejada de esta fuente de sustancias bioactivas, pero recientemente han renovado su interés en ella<sup>1-10</sup>. En este caso se tomaron especies de la familia Solanaceae ya que por quimiotaxonomía podrían tener moléculas afines y con características similares a los anillos A y B de los withanolidos evaluados en la primera fase de esta tesis. Además se colectaron dentro del proyecto de Colciencias: “búsqueda de antiparasitarios de la flora colombiana. 1. Leishmaniosis y Chagas” que pretende analizar especies con actividad antiparasitaria a partir del conocimiento etnobotánico.

### **3.3.2 Actividad Leishmanicida**

---

En la Tabla 6 se encuentran consignados los resultados de la evaluación de ocho especies pertenecientes a los géneros *Acnistus*, *Solanum* y *Larnax*, los cuales se ubican taxonómicamente en la familia Solanaceae<sup>11</sup>.

Nombre científico	Parte utilizada	Tipo de Extracto	CL <sub>50</sub> (µg/mL)	% Inh
<i>Solanum aphyodendron</i> S. Knapp	Hojas	Extracto etanol (Fracción soluble en Mezcla triple <sup>**</sup> )	260.5	56.2
<i>Solanum leptorhachis</i> Bitter	hojas	Extracto etanol (Fracción soluble en Mezcla triple <sup>**</sup> )	44.8	73 <sup>a</sup>
		Fracción soluble en metanol	14.8	54 <sup>a</sup>
<i>Acnistus arborescens</i> (L.) Schtbl	hojas	Extracto etanol	<7.8	43.3 <sup>a</sup>
	Tallo	Extracto etanol	18.1	89.9 <sup>a</sup>
<i>Lamax sachapapa</i> Hunz.	Hojas	Extracto etanol	23.7	91.1 <sup>a</sup>
<i>Lamax glabra</i> (Standl.) Sawyer	Hojas	Extracto etanol (Fracción soluble en Mezcla triple <sup>**</sup> )	41.8	60.4
		Extracto etanol	58.6	50.4
	Tallo	Extracto etanol	14.9	77.4 <sup>a</sup>
<i>Solanum</i> sp. <sup>*</sup>	Hojas	Extracto etanol partición en Hexano	15.2	24.8 <sup>b</sup>
		Extracto etanol partición en CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	<7.8	49.1 <sup>a</sup>
<i>Solanum</i> sp. [Sección Geminata <sup>**</sup> ]	Hojas	Extracto etanol (Fracción soluble en Mezcla triple <sup>**</sup> )	20.1	63.4 <sup>a</sup>
		Fracción soluble en metanol	10.0	97.2 <sup>a</sup>
<i>Schultesiaanthus coriaceus</i> (Kuntze) Hunz	Hojas	Acuosolificizado	24.0	75.5 <sup>a</sup>

\* Sin identificación completa, \*\* Mezcla triple: n-hexano: Diclorometano: Metanol (2:1:1)

\*\* Los valores que se indican en rojo, se consideran extractos promisorios

Concentraciones máximas evaluadas: \*10µg/mL, \*20µg/mL, \*15µg/mL, \*32.5µg/mL, \*40µg/mL, \*3.75µg/mL, \*3.125µg/mL, \*5µg/mL, \*1.25µg/mL, \*12.5µg/mL, \*2.5µg/mL

Tabla 6. Citotoxicidad (U937) y Actividad Leishmanicida in vitro en amastigotes intracelulares de *Leishmania (V.) panamensis* de especies de la familia Solanaceae

En la evaluación de la efectividad de estos extractos se reporta el porcentaje de inhibición de amastigotes intracelulares a una concentración de 50 µg/mL en lugar de la CE50 utilizada para los diferentes compuestos, dada la gran cantidad de componentes presentes y con el fin de optimizar la metodología, de esta manera solo determinar la CE50 cuando se tienen fracciones refinadas o compuestos puros. Sin embargo en los casos cuya CL50 era inferior a 50 µg/mL se realizaba la determinación del porcentaje de inhibición a una concentración inferior a la CL50 como se indica en cada subíndice para cada caso en particular.

Tres especies exhiben altos índices de actividad leishmanicida en un rango del 89.9% a 97.2% a dosis tan bajas como 15.0, 5.0 y 2.5 µg/mL; otro grupo posee niveles de inhibición entre el 73.0%-77.4% pero a dosis superiores a las descritas anteriormente; las toxicidades de estos extractos brutos son relativamente bajas. Es de anotar que ninguna de las especies evaluadas de manera preliminar en este trabajo ha sido analizada como

fuerza de antiparasitarios ni explorada en sus aspectos químicos, excepto *Acnistus arborescens* en la cual se reporta la presencia de varios withanolidos citotóxicos<sup>12</sup> análogos a las acnistinas (en especial A, B y E), compuestos típicos de este género y de *Dunalia*<sup>13</sup>, lo cual a su vez está de acuerdo con la alta actividad y elevada citotoxicidad encontrada en el desarrollo de esta fase

(Tabla 6).

Para las dos especies del género *Larnax* se evidencia que sus extractos no son tan citotóxicos como el extracto de *Acnistus arborescens*, pero su porcentaje de inhibición es superior. Sin embargo, de estas dos especies el extracto de *Larnax glabra* es el más interesante para la búsqueda de nuevos sistemas farmacofóricos activos contra amastigotes de *Leishmania* debido a que su toxicidad es aproximadamente 6 veces menor que la de *Acnistus*, mientras que para *Larnax sachapapa* es de una relación de 1: 3. Por esta razón se continuó con el estudio fitoquímico del extracto de *Larnax glabra*, aislando mediante combinación de técnicas cromatográficas el compuesto (1) y (2). La asignación de sus estructuras por <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C RMN en 1D y 2D se desarrolló como se describe a continuación.

Los experimentos JMOD/DEPT (Tabla 7) del compuesto (1) denominado Larnaxolida A, mostró la presencia de las siguientes señales: cinco grupos metilos en  $\delta$  11.9, 12.0, 14.0, 2 x 14.6, ppm; seis grupos metileno en  $\delta$  21.9, 23.5, 27.2, 35.7, 36.8, 39.9 ppm; once grupos metino en  $\delta$  35.7, 35.9, 39.2, 51.5, 52.5, 56.4, 57.4, 65.4, 92.2, 129.5, 140.0 ppm; y seis carbonos cuaternarios en  $\delta$  43.3, 51.2, 2x73.6, 73.8, 205.0 ppm. Esto incluye la presencia de dos carbonos metínicos de un epóxido en 56.0 y 56.7 ppm; dos metinos oxigenados en 73.2 y 96.4 ppm; dos carbonos cuaternarios 43.3 y 51.2; tres carbonos cuaternarios oxigenados en  $\delta$  2 x 73.6, 73.8 y en 205.0 un carbonilo  $\alpha,\beta$  insaturado por las señales en <sup>1</sup>H a 5.46 (dd,  $J = 2.4$  y 10.0 Hz) y 6.32 (dq,  $J = 2.8, 5.1$  y 9.9 Hz). El espectro de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C RMN de este compuesto tiene varios puntos que lo diferencian de los withanolidos normales. Así, no se aprecia la señal típica de la  $\delta$ -lactona en aproximadamente 177.0 ppm y la señal para H-22 se encuentra desplazada ahora en 3.30 según se deduce del experimento HMQC; adicionalmente se encuentra un metino oxigenado en 96.4 ppm el cual se asigna a un hemicetal y su presencia se explica por la reducción de la lactona<sup>14</sup>. De otro lado el desplazamiento químico de 27-Me y 28-Me a campos más bajos en el espectro de <sup>1</sup>H RMN indican la presencia de sendos hidroxilos geminales, lo cual explica los dos carbonos cuaternarios equivalentes en 73.6 ppm. Adicionalmente, el efecto  $\gamma$  sobre el C-26, el cual aparece a 96.4 ppm en <sup>13</sup>C RMN <sup>14</sup>. La funcionalización de los anillos A y B del núcleo del withanolido se deduce por el espectro de <sup>1</sup>H RMN, ya que se encuentra un sistema del tipo 2-en-1-ona en 5.46 (dd,  $J = 2.4$  y 10.0 Hz) y 6.32 (dq,  $J = 2.8, 5.1$  y 10.1 Hz), el cual según el espectro COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H se encuentra acoplado con los protones de un metileno en 2.19 (dd,  $J = 5.1, 18.7$  Hz) H4ax y en 2.38 m, H4ec.

Ahora bien, por HMBC (Figura 20) se deduce la presencia de un grupo hidroxilo en el C-5 por las correlaciones a larga distancia que se observan con los protones de Me-19, con un carbonilo en 205.0 ppm, así como con un carbono cuaternario en 73.8 ppm. La configuración 5 $\alpha$ -hydroxy fue asignada dado que los cambios químicos del Me-19 no cambiaron cuando el espectro fue tomado en CDCl<sub>3</sub> y Pyr-*d*<sub>5</sub>. La presencia de un grupo



epóxido se asigna por las señales de dos grupos metinos en 2.72 (d,  $J = 3.9$ ) y 3.00 (m) ppm  $^1\text{H}$  RMN y en 56.0 y 56.7 ppm en  $^{13}\text{C}$  RMN; esta última correlaciona a larga distancia con C-5. La configuración C6 $\alpha$ , C7 $\alpha$ -epoxido ha sido asignada porque sus desplazamientos y multiplicidades corresponden a los reportados en la literatura<sup>15</sup>.

Esta es la primera vez que se reporta esta sustancia en la literatura a la cual se le asignó el nombre de Larnaxolida A. Adicionalmente, es la primera especie estudiada en el género, y por este tipo de compuestos se sitúa biogenéticamente más cercano al género *Acnistus* que a *Solanum*., debido principalmente a que en el primero género se han encontrado acnistinas en vez de withanolidos normales, mas propios del segundo género.

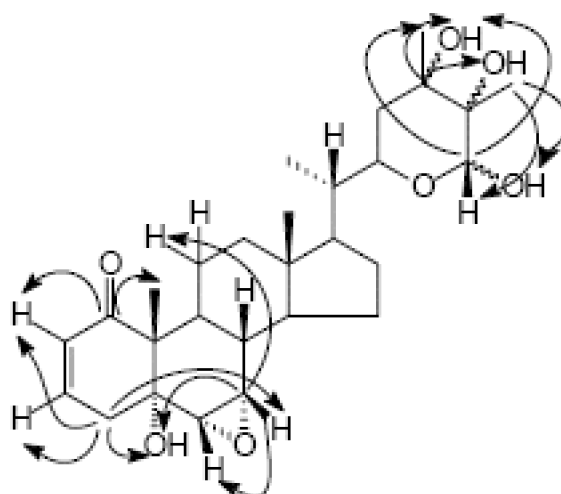


Figura 20. Correlaciones a larga distancia de Larnaxolida A

El compuesto (**2**) posee hechos estructurales muy similares a los de Larnaxolida A (**Tabla 7**). Sin embargo se observaron algunas diferencias en el espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN como se describen a continuación: las señales asignadas anteriormente a los átomos de carbono C-24 y C-25 aparecen a  $\delta$  64.2 and  $\delta$  64.5, respectivamente, en lugar de  $\delta$  73.6; y C26 se desplaza a campos más altos ( $\delta$  92.2 en larnaxolida B vs  $\delta$  96.4 larnaxolida A).

Estas características y los desplazamientos químicos de los protones del Me- 27 y Me-28 a  $\delta$  1.41 en el espectro de  $^1\text{H}$  RMN como singlete, fueron indicativos de otro grupo epoxido en la molécula. Todos estos datos concuerdan con los reportados previamente para el compuesto denominado Hiosciamilactol, el cual posee un C24 $\alpha$ , C25 $\alpha$ -epoxido<sup>16</sup> (**Figura 21**).

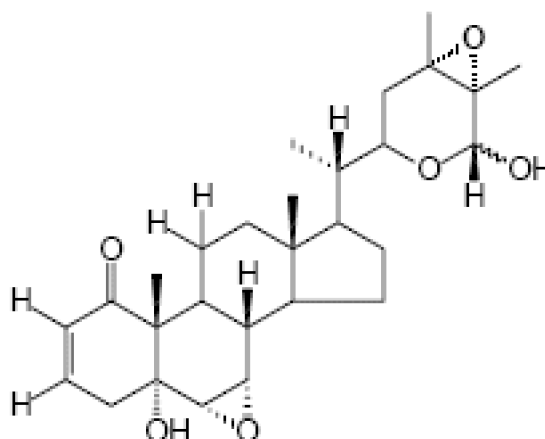


Figura 21. Estructura de Hiosciamilactol

Átomo	Larnaxolida A (1) CDCl <sub>3</sub> , CD <sub>3</sub> OD			Hiosciamilactol (2) CDCl <sub>3</sub>			
	δ <sub>a</sub>	δ <sub>n</sub>	Correlación HMRC	δ <sub>a</sub>	δ <sub>n</sub>	Correlación HMRC	
1	C=O	205.0		203.7			
2	C-H	5.16 dd(2.4,10.0)	128.6	C1, C10	5.35 dd(2.4,10.0)	129.6	C1, C10
3	C-H	6.37 dq(? 84,5.0e y 10.1)	140.8	C=O, C4, C7	6.58 dq(? 84,5.0e y 10.1)	140.0	C=O, C4, C7
4	CH <sub>2</sub>	2.19 dd(5.1,18.7)	36.3	C2, C3, C5, C10	2.51 dd(5.1,18.7)	36.9	C2, C3, C5, C10
		2.38 m		C3	2.08 m		C3
5	C		73.0		73.7		
6	C-H	3.00 m	56.7	C7, C8, C9	3.30 m	57.4	C7, C8, C9
7	C-H	2.72 e (8.9)	56.0	C4, C5, C6, C10	3.05 e (8.9)	56.4	C4, C5, C6, C10
8	C-H	1.65-1.85 m	35.3	C11	1.65-1.85 m	35.7	C11
9	C-H	1.55 m	35.7		1.55 m	35.9	
10	C		51.2		51.4		
11	CH <sub>2</sub>	1.20-1.32 m	21.9		1.20-1.32 m	22.0	
		>7 m		C7, C13	>7 m		C7, C13
12	CH <sub>2</sub>	1.65-1.85 m	27.2	C18	1.65-1.85 m	27.6	C18
13	C		43.3		44.0		
14	C-H	1.35 m	31.2		1.35 m	31.5	
15	CH <sub>2</sub>	1.20-1.32 m	23.5		1.20-1.32 m	23.7	
16	CH <sub>2</sub>	1.20-1.32 m	39.9	C14, C18	1.20-1.32 m	40.3	C14, C18
		1.95 m		C8, C13, C18	1.95 m		C8, C13, C18
17	C-H	1.1 m	52.7	C21	1.1 m	52.5	C21
18	CH <sub>3</sub>	0.44 s	11.9	C12, C13, C17	0.72 s	12.5	C12, C13, C17
19	CH <sub>3</sub>	1.15 s	14.0	C=O, C5, C9, C10, C12	1.15 s	15.2	C=O, C5, C9, C10, C12
20	C-1	1.65-1.05 m	39.4		1.65-1.05 m	39.2	
21	CH <sub>3</sub>	0.64 d (6.8)	12.4	C17, C20, C22, C25	0.80 d (6.8)	13.1	C17, C20, C22, C25
22	C-1	3.3 m	73.2	C21	3.72 m	65.4	C21
23	CH <sub>2</sub>	1.65-1.85 m	35.7	C22	1.65-1.85 m	29.7	C22
24	C		13.5		14.2		
25	C		n		65.5		
26	C-H	4.98, d	96.1	C27	4.98, d	92.2	C27
27	CH <sub>3</sub>	1.10 s	14.6	C23, C26	1.41 s	17.0	C23, C26
28	CH <sub>3</sub>	1.13 s	n	C22, C23, C25	1.41 s	19.5	C22, C23, C25
5-O-1		C4, C5, C7			3.15 ss		C4, C5, C7

Tabla 7. Desplazamientos químicos <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C RMN para Larnaxolida A (1) y Hiosciamilactol (2) (δ: ppm; J = Hz)

Los compuestos **1** y **2** tienen una alta actividad contra amastigotes intracelulares de *L. (V.) panamensis* (Larnaxolida A, CE50 = 34.9 y Hiosciamilactol, CE50 = 23.7 µg /mL) pero también una reducida citotoxicidad (>500 µg /mL en ambos casos) en células humanas; esta citotoxicidad difiere mucho de la exhibida por la withajardina A y la acnistina E que tienen CE50 = 30.8 y 1.0 µg /mL respectivamente y CL50 = 18.4 y 1.0 µg /mL. El sistema farmacofórico de las larnaxolidos es diferente al de las acnistinas y withajardinas y en estas últimas parece que la lactona en la cadena lateral tiene una alta contribución a la citotoxicidad.

Adicionalmente, el extracto de *Solanum aphyodendron* S. Knapp, amerita continuar un estudio exhaustivo ya que tiene un buen nivel de inhibición (56.2%) a una concentración de 50 µg/mL y una citotoxicidad mínima (CL50 = 260.5 µg/mL) comparada con las otras tres especies de *Solanum* que se describen en la **Tabla 6**; el perfil cromatográfico en capa fina y el espectro de 1H RMN del crudo indican la presencia de alcaloides esteroidales.

De igual manera la especie nueva del género *Schultesia* es de interés valioso, dada su novedad botánica, porcentaje de inhibición (75.5%) a solo una concentración de 32.5 µg/mL y grado de citotoxicidad intermedia entre las especies de los géneros *Acnistus* y *Larnax*.

### 3.3.3 Conclusiones

En esta tercera fase de la tesis se ha encontrado una serie de extractos promisorios como los de *Solanum aphyodendron* S. Knapp y *Schultesia coriaceous*, dado su nivel de citotoxicidad y grado de inhibición. Adicionalmente se ha encontrado un nuevo farmacóforo con un grado de efectividad apreciable y lo más importante, con un grado de citotoxicidad 500 veces menor que los withanolidos evaluados en la primera fase de esta tesis.

#### 3.3.4 Bibliografía

1. Scholes R. J.; Biggs R. A biodiversity intactness index. *Nature* 2005, 434, 45-49.
2. Trommetter M. Biodiversity and international stakes: A question of access. *Ecol. Econom.* 2005, 53, 573–583.
3. Rahman A.; Choudhary M. I. Bioactive natural products as a potential source of new pharmacophores. A theory of memory. *Pure Appl. Chem.* 2001, 73, 555–560.
4. Rahman A.; Choudhary M. I. Biodiversity—a wonderful source of exciting new pharmacophores. Further to a new theory of memory. *Pure Appl. Chem.* 2002, 74, 511–517.
5. Rahman A.; Choudhary M. I. Biodiversity as a source of new pharmacophores: A new theory of memory. Part 3. *Pure Appl. Chem.* 2005, 77, 75–81.
6. Cragg G. M.; Newman D. J. Biodiversity: a continuing source of novel drug leads. *Pure Appl. Chem.* 2005, 77, 7-24.

7. Overwalle G. V. Protecting and sharing biodiversity and traditional knowledge: Holder and user tools. *Ecol. Econom.* 2005, 53, 585-607.
8. Delbaere B. European policy review Biodiversity research to support European policy. *J. Nat. Conserv.* 2005, 13, 213—214
9. Prasad A. K.; Kumar V.; Arya P.; Kumar S.; Dabur R.; Singh N.; Chhillar A. K.; Sharma G. L.; Ghosh B.; Wengel J.; Olsen C. E. Parmar V. S. Investigations toward new lead compounds from medicinally important plants. *Pure Appl. Chem.* 2005, 77, 25-40
10. Wagner H. Natural products chemistry and phytomedicine in the 21st century: New developments and challenges. *Pure Appl. Chem.* 2005, 77, 1-6
11. Ning Su B.; Park E. J.; Nikolic D.; Santarsiero B. D.; Mesecar A. D.; Vigo J. S.; Gram. J. G.; Cabieses F.; van Breemen R. B.; Fong H. H. S.; Farnsworth N. R.; Pezzuto J. M.; Kinghorn A. D. Activity-Guided Isolation of Novel Norwithanolides from *Deprea subtriflora* with Potential Cancer Chemopreventive Activity. *J. Org. Chem.* 2003, 68, 2350-2361
12. Minguzzi S.; Barata L. E. S.; Geun Shin Y.; Jonas P. F.; Chai H-B.; Park E. J.; Pezzuto J. M.; Cordell G. A. Cytotoxic withanolides from *Acnistus arborescens*. *Phytochemistry* 2002, 59, 635-641.
13. Luis J. G.; Echeverri F.; Gonzalez A. G. Acnistins C and D, withanolides from *Dunalia Solanacea*. *Phytochemistry* 1994, 36, 1297-1301.
14. Zhu X.H.; Takagi M.; Ikeda T.; Midzuki K.; Nohara T. Withanolide-type steroids from *Solanum cilistum*. *Phytochemistry* 2001, 56, 741-745.
15. Cirigliano A.; Veleiro A.S.; Oberti J. C.; Burton G. A 15 $\beta$ -Hydroxywithanolide from *Datura ferox*. *Phytochemistry* 1995, 40, 611-613.
16. Ma Cui-Ying, Williams I. D.; Che Ch-T. Withanolides from *Hyosциamus niger* seeds. *J. Nat. Prod.* 1999, 62, 1445-1447.

## 4. CONCLUSIONES

De esta tesis se generaron una serie de conclusiones las cuales se describen a continuación:

Se determinó la relación estructura actividad de una serie de withajardinas y acnistinas, indicando la importancia de un carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado en el anillo A, un epóxido  $\beta$  en el anillo B y ocasionalmente un hidroxilo  $\beta$  en el C-4.

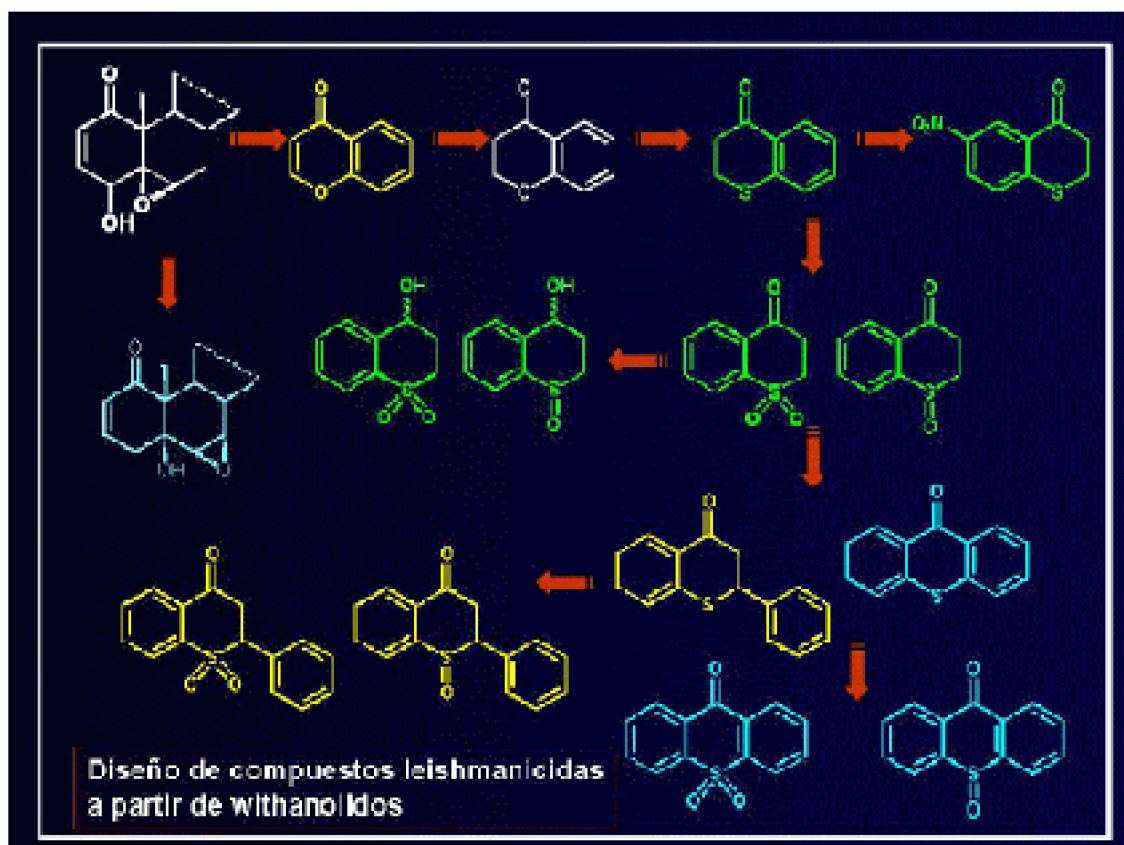
Por medio de modelación molecular se demostró que la citotoxicidad y la efectividad de los withanolidos anteriormente mencionados son mutuamente dependientes y que cualquier modificación estructural afectaría ambas actividades.

Simultáneamente se demuestra que el grupo epóxido en posición 5-6 contribuye a la citotoxicidad aunque parece que la lactona en C-17 ocasiona un efecto marginal sobre esta.

A partir de una serie de moléculas muy activas contra amastigotes de *Leishmania (V.) panamensis* y de compleja estructura se han obtenido una serie de moléculas isostéricamente emparentadas con una excelente proyección farmacológica en el campo de sustancias con acción leishmanicida.

Por métodos semisintéticos y análisis biodirigido se optimizaron los isosteros tipo (cromano y tiocromano), obteniendo varias moléculas relativamente sencillas, que retienen la alta actividad biológica con relación a los compuestos originales y a su vez exhiben una citotoxicidad en los rangos permisibles El Esquema 1 muestra la secuencia del desarrollo de estas moléculas que pertenecen a una serie de derivados oxidados del

tiocromanol, un compuesto comercial de fácil acceso por métodos sintéticos. Estas nuevas moléculas deberán ser evaluadas en un modelo animal para definir sus posibilidades de uso y aplicación a través de otras reoptimizaciones que mejoren la estructura y la actividad del farmacóforo. Adicionalmente estudios relacionados con parámetros farmacocinéticos, farmacodinámicos y farmacotécnicos.



*Esquema 3. Evaluación hacia nuevos compuestos leishmanicidas (II)*

Igualmente, se ha encontrado otro farmacóforo natural en una nueva molécula, el cual conserva buena parte de los hechos estructurales de los anillos A y B de los withanolidos tipo withajardinas y acnistinas evaluados en la primera fase de esta tesis, con una efectividad dentro del rango de concentraciones considerados como promisorios y lo más importante con una citotoxicidad 500 veces inferior a la Acnistina E, el compuesto más activo y a la vez más citotóxico.

## 5. MATERIALES

### 5.1 MATERIAL VEGETAL

Las especies colectadas para este trabajo pertenecen a la familia Solanaceae y un ejemplar de cada una de ellas se encuentra en los herbarios de la Universidad de Antioquia y el Instituto de Ciencias Naturales. Como se describe en la Tabla 9.

Solanaceae	Voucher	Herbario
<i>Deprea orinocensis</i> (H. & B.) Rafineski	38861	Universidad de Antioquia
<i>Dunalia solanacea</i> Kunth	48296	
<i>Solanum aphyodendron</i> S. Knapp	CIO 3723	Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá
<i>Solanum leptorhachis</i> Bitter	JCG 716	
<i>Solanum</i> sp <sup>*</sup> .	JCG 384	
<i>Solanum</i> sección Geminata <sup>*</sup>	JCG 761	
<i>Lamax sachapapa</i> Hunz.	JGV 190L	
<i>Lamax glabra</i> (Standl.) Sawyer	JGV 175	
<i>Acristus arborescens</i> (L.) Schildt	JGV 133	
<i>Schultesiaanthus coriaceous</i> (Kuntze)	JGV 127	
Hunz.		

\* Clasificación taxonómica en proceso (especies nuevas).

Tabla 9. Especies de la familia Solanaceae evaluadas

## 5.2 MATERIAL BIOLÓGICO

- Células U-937 No CRL1593.
  - Promastigotes de *L. (V.) panamensis*, cepa MHOM/CO/87/UA140.
  - Amastigotes intracelulares de *L. (V.) panamensis* obtenidos según el protocolo previamente descrito en la parte experimental.

## 5.3 SOLVENTES Y REACTIVOS

- Solventes deuterados: CDCl<sub>3</sub> Merck®
  - Los solventes (metanol, acetato de etilo, diclorometano y n-hexano) para procesos de extracción y cromatografía, se destilaron previamente.
  - Solventes grado reactivo: Piridina, diclorometano y metanol, se almacenaron en presencia de tamiz molecular 4 Å.
- Colorante Giemsa Merck®



- RPMI 1640, No 4130 Sigma®

## 5.4 MATERIALES CROMATOGRÁFICOS.

- Sílica Gel 60 G, Merck®
  - Sephadex LH-20, Pharmacia®
  - Cromatoplasmas de sílica gel para cromatografía preparativa de 20 x 20 cm y 0.5 mm de espesor. Merck®
  - Cromatoplasmas de sílica gel, soportadas sobre lámina de aluminio, de 20 x 20 cm y 0.25 mm de espesor. Merck®
  - Reveladores para uso en cromatografía: universal (ácido sulfúrico 4 % + agua 16 % + ácido acético 80 %), y Dragendorff .

## 5.5 OTROS EQUIPOS

- RMN Bruker AMX 300 MHz
  - IR Perkin-Elmer Spectrum RXL1 FTIR
  - Espectrometro de Masas, JEOL JMS-AX505HA, 70 eV, Universidad Autónoma de México
- Destiladores
- Rota evaporador, Heidolph®
- Planchas de agitación y calentamiento Heidolph®
- Lámparas de luz ultravioleta modelo UVGL-58, Multiband UV-254 / 366 nm.
- Bomba para vacío
- Estufa de secado WTB Binder®
- Lector de ELISA (Bio Rad®)
- Percolador, soxhlet, embudos de separación y material de vidrio en general.
- Frascos de cultivo celular 25 y 75 cm<sup>3</sup>, Corning®
- Platos de 24 y 96 pozos, Corning®
- Tubos de centrifuga 15mL, Fisherbrand®

## 5.6 SOFTWARE

- Paquete Gaussian 98®
  - Software Sybyl®
  - Programa estadístico Probit
  - Programa WinMDI (J Trotter, <http://facs.scripps.edu/software.html>)

## 6. PARTE EXPERIMENTAL

### 6.1 ASPECTOS GENERALES

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear ( $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN) se realizaron en  $\text{CDCl}_3$ , utilizando un equipo Bruker AMX 300 MHz; se reportan los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) en ppm con base al solvente de referencia y las constantes de acoplamiento ( $J$ ) en Hz. La determinación de los tipos de carbono presentes en la molécula se realizó por medio de los experimentos desacoplados DEPT 135 y JMOD.

Los espectros de masas (EM) se realizaron en un equipo JEOL JMS-AX505HA, 70 eV, Universidad Autónoma de México. Los fragmentos significativos se indican como  $m/z$  (intensidad relativa al pico base = 100), con masa determinada por el ión molecular ( $M^+$ ) o fragmento iónico apropiado.

Los espectros de infrarrojo (IR) fueron realizados en un Perkin-Elmer Spectrum RXL1 FTIR en KBr; solo se incluyen las absorciones características.

### 6.2 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE SUSTANCIAS

## DE ORIGEN NATURAL

### 6.2.1 Withajardinas y Acnistinas

---

Las withajardinas se obtuvieron según los procedimientos descritos anteriormente<sup>1-5</sup>; su identificación se hizo comparando los espectros de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C RMN con sustancias auténticas.

### 6.2.2 Hiosciamilactol y Larnaxolida A

---

200 g de hojas secas de la planta fueron trituradas con etanol (2x 0.5L) y luego evaporados al vacío hasta sequedad. El residuo (2g) fue disuelto en C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH mixture (2:1:1) y se realizó una columna de sephadex-LH 20 utilizando el eluyente antes mencionado, colectando alrededor de 37 fracciones. De las cuales las primeras 5 correspondían a clorofilas y 6-10 se encontraba el compuesto denominado Hiosciamilactol como componente mayoritario. El cual fue repurificado mediante una columna de sílica gel utilizando C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>-EtOAc (4:1). Posteriormente de las fracciones 11-15 mediante cromatografía preparativa se obtuvo el compuesto denominado Larnaxolida A.

## 6.3 TRANSFORMACIONES HEMISINTÉTICAS DE LOS CROMANOS

### 6.3.1 Obtención de 6-nitro y 8-nitro-cromanona (Compuestos 1 y 2 respectivamente)

---

A una solución en anhídrido acético de 4-cromanona (500 mg, 3.37 mmol), colocada sobre un baño de hielo en agitación continua se adicionó HNO<sub>3</sub> concentrado (1600 µl, 9.06 mmol) gota a gota. Finalizado el proceso anterior, se permitió reaccionar con agitación continua y a temperatura ambiente por un período de 24 horas; transcurrido este tiempo se vertió el contenido de la reacción sobre hielo y se realizó el proceso de extracción 3 x 30 mL con diclorometano. La fase orgánica se lavó con una solución saturada de bicarbonato de potasio y luego se secó con sulfato de sodio anhidro. El solvente se evaporó bajo presión reducida purificándose dos compuestos por cromatografía en columna (sílica gel, *n*-hexano 100, *n*-hexano: AcOEt 90: 10 ~ 80: 20). El primer compuesto en aislarse fue 2 (0.56 mmol, 16.6%) y luego el 1 (0.86 mmol, 25.5%).

### 6.3.2 Obtención de 6-nitrotiocromeno (3)

---

---

A una solución de 4-tiocromanona (500 mg, 3.04 mmol), colocada sobre un baño de hielo en agitación continua se adicionó HNO<sub>3</sub> concentrado (800 µl, 4.53 mmol) gota a gota. Finalizado el proceso anterior, se permitió reaccionar con agitación continua y a temperatura ambiente por un período de 30 minutos; transcurrido este tiempo se vertió el contenido de la reacción sobre hielo y se realizó el proceso de extracción 3 x 30 mL con diclorometano. La fase orgánica se lavó con una solución saturada de bicarbonato de potasio y luego se secó con sulfato de sodio anhidro. Posteriormente, el solvente se evaporó bajo presión reducida y por cromatografía en columna (silica gel, *n*-hexano ~ *n*-hexano: AcOEt 90: 10) se obtuvo el compuesto **3** (0.48 mmol, 15.8%) como un sólido amarillo.

### 6.3.3 Obtención de 4-acetilcromano (4)

---

A 200 mg de 4-cromanol (1.33 mmol) disueltos en piridina se adicionó anhídrido acético en exceso; la reacción se dejó con agitación continua y a temperatura ambiente por un periodo de 12h. Después de este tiempo, se adicionó una solución de HCl 1.0 N y se extrajo con 3 x 30 mL de diclorometano. La fase orgánica se lavó con una solución saturada de bicarbonato de potasio y se realizó de nuevo una extracción con diclorometano. La fase orgánica fue separada y secada sobre sulfato de sodio anhidro. Posteriormente, el solvente se evaporó bajo presión reducida y por cromatografía en columna (silica gel, *n*-hexano ~ *n*-hexano: AcOEt 90: 10) se obtuvo el compuesto **4** (0.602 mmol, 45.3%) como un aceite incoloro.

### 6.3.4 Obtención de 4-acetiltiocromano (5)

---

A 200 mg de 4-tiocromanol (1.21 mmol) disueltos en piridina se adicionó anhídrido acético en exceso; la reacción se dejó con agitación continua y a temperatura ambiente por un periodo de 12h. Después de este tiempo, se adicionó una solución de HCl 1.0 N y se extrajo con 3 x 30 mL de diclorometano. La fase orgánica se lavó con una solución saturada de bicarbonato de potasio y se realizó de nuevo una extracción con diclorometano. La fase orgánica fue separada y secada sobre sulfato de sodio anhidro. Posteriormente, el solvente se evaporó bajo presión reducida y por cromatografía en columna (silica gel, *n*-hexano ~ *n*-hexano: AcOEt 95: 5) se obtuvo el compuesto **5** (0.72 mmol, 59.5%) como un aceite de color amarillo.

### 6.3.5 Obtención de 1- tiocromanona - sulfóxido (mezcla enantiomérica 6)

---

A una solución de tiocromanona (350 mg, 2.13 mmol) en diclorometano colocada sobre un baño de hielo en agitación, se adicionó gota a gota una mezcla a 0 °C de 300 µl de CF<sub>3</sub>COOH y 300 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35% (relación de volúmenes 1 a 1); se permitió reaccionar mediante agitación continua a 0 °C durante 4 horas. Posteriormente se vertió el contenido de la reacción sobre hielo y se realizó el proceso de extracción con 3 x 30 mL de AcOEt. La fase orgánica se lavó con una solución saturada de bicarbonato de potasio y luego

secada sobre sulfato de sodio anhidro. El solvente se evaporó bajo presión reducida y se purificó a través de cromatografía en columna (silica gel, *n*-hexano ~ AcOEt) un aceite correspondiente al compuesto **6** (1.51 mmol, 70.8 %).

### **6.3.6 Obtención de tiocromanona sulfona (7)**

---

A 200 mg de tiocromanona (1.22 mmol), se adicionó ácido acético glacial (800  $\mu$ l) seguido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35% (800  $\mu$ l) gota a gota. Finalizado el proceso anterior, se permitió reaccionar mediante agitación continua y a temperatura ambiente por 2 horas más; posteriormente se vertió el contenido de la reacción sobre hielo y se realizó el proceso de extracción con 3 x 30 mL de diclorometano. La fase orgánica se lavó con una solución saturada de bicarbonato de potasio y luego secada sobre sulfato de sodio anhidro. El solvente se evaporó bajo presión reducida y se purificó a través de cromatografía en columna (silica gel, *n*-hexano: AcOEt 80: 20) el compuesto **7**, que cristaliza en diclorometano ( 0.85 mmol, 69.7%).

### **6.3.7 Obtención de 4-tiocromanol-sulfóxido (8), (9) y (10)**

---

A una solución de tiocromanol (200 mg, 1.21 mmol) en diclorometano y colocada sobre un baño de hielo en agitación se le adicionó gota a gota una mezcla a 0 °C de 800  $\mu$ l de ácido acético glacial y 800  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35% (relación de volúmenes 1 a 1) . Finalizado el proceso anterior, se permitió reaccionar mediante agitación continua a 0 °C durante 1 hora más; posteriormente se trabajó de manera usual y a través cromatografía en columna (sílica gel, *n*hexano ~ AcOEt) se obtuvo una mezcla de isómeros en una relación 3:1 (**8**) y que fue separada por ccf preparativa en *n*-hexano: AcOEt 30:70 (6 recorridos) se aislaron los isómeros **A (9)**, (0.495 mmol, 40.8%) y **B (10)** (0.154 mmol, 12.7%) como aceites incoloros.

### **6.3.8 Obtención de 4-tiocromanol sulfona (11)**

---

A 200 mg de tiocromanol (1.21 mmol) disuelto en ácido acético glacial (800  $\mu$ l) se adicionó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35% (800  $\mu$ l) gota a gota; manteniéndose a reflujo a 60 °C con agitación constante durante 2 horas; luego se vertió el contenido de la reacción sobre hielo, se trabajó del modo usual, purificándose por cromatografía en columna (silica gel, *n*-hexano ~ *n*-hexano: AcOEt 70: 30) el compuesto **11** como un aceite incoloro (0.51 mmol, 42.1%).

### **6.3.9 Obtención de tioxanten- 9-ona sulfona (12)**

---

A 200 mg de tioxanten-9-ona ( 0.94 mmol), se adicionó ácido acético glacial (1600  $\mu$ l) seguido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35% (1600  $\mu$ l) gota a gota. Finalizado el proceso anterior, se permitió reaccionar mediante agitación continua y a temperatura ambiente por 2 horas más; posteriormente se vertió el contenido de la reacción sobre hielo y se realizó el proceso de extracción con 3 x 30 mL de diclorometano. La fase orgánica se lavó con una solución

saturada de bicarbonato de potasio y luego secada sobre sulfato de sodio anhidro. El solvente se evaporó bajo presión reducida y se purificó a través de cromatografía en columna (silica gel, *n*-hexano: AcOEt 80: 20) el compuesto **12**, que cristaliza en diclorometano (0.49 mmol, 52.13%).

### 6.3.10 Obtención de 2-fenil-1-tiocromeno-sulfóxido (13)

A 200 mg de 2-feniltiocromenona (0.84 mmol), sumergido en un baño de hielo se adicionó ácido trifluoroacético (1000  $\mu$ l) gota a gota y bajo agitación continua seguido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35% (1000  $\mu$ l). Finalizado el proceso anterior, se permitió reaccionar por 2 horas más; luego se trabajó de la manera ya descrita y por cromatografía preparativa en *n*-hexano: AcOEt 4:1 se purificó el compuesto **13** (0.55 mmol, 65.5 %).

### 6.3.11 Obtención de 2-fenil-1-tiocromeno sulfona (14)

A 200 mg de 2-feniltiocromenona (0.84 mmol) se adicionó ácido trifluoroacético (800  $\mu$ l) seguido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35% (800  $\mu$ l) gota a gota, siguiendo el procedimiento anteriormente descrito. De la solución clorofórmica se aislaron cristales de color amarillo que se repurificaron por cromatografía en capa fina utilizando *n*-hexano: AcOEt 4:1 obteniéndose el compuesto **14** (0.59 mmol, 70.2 %).

## 6.4 BÚSQUEDA DE ESPECIES CON ACTIVIDAD LEISHMANICIDA

### 6.4.1 Colección y Selección del material.

Las plantas fueron colectadas teniendo en cuenta su uso etnobotánico y su clasificación taxonómica en la familia solanaceae. Adicionalmente, un testigo de cada una de ellas se encuentra en el ICN como se describe en la sección número cinco de materiales.

### 6.4.2 Obtención de extractos

El material vegetal seco se picó con etanol al 90% y después de eliminar el solvente bajo presión reducida se redisolvió el extracto en la mezcla triple (*n*-hexano: diclorometano: metanol 2:1:1); la parte insoluble se solubilizó en metanol. Posteriormente, se sometieron a ensayos de bioactividad.

## 6.5 ENSAYOS BIOLÓGICOS

Los ensayos de actividad leishmanicida y de citotoxicidad *in vitro* se realizaron en cooperación con el Grupo de la Universidad de Antioquia: Programa de Estudio y Control de Enfermedades tropicales (PECET), de acuerdo a protocolos previamente 6,7 como se resumen a continuación.

- Citotoxicidad

Para cada una de las concentraciones de los diferentes extractos o compuestos, según el caso y por duplicado, se registró la absorbancia neta, es decir, después de restar la de los blancos. El porcentaje de células muertas se determina luego de calcular el porcentaje de viabilidad con la fórmula:

D.O células expuestas a compuesto o extracto

% viabilidad = ----- X 100

D.O células control

% mortalidad = 100 - % viabilidad

Los resultados se expresaron como CL50 calculada por medio del programa estadístico Probit.

- *Actividad Leishmanicida in vitro*

Los compuestos se solubilizaron en una solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) con 0.5% de Dimetil sulfóxido (DMSO). Se utilizó la cepa de *L. (V) panamensis* MHOM/87/UA140 mantenida en hámster con el fin de recuperar la virulencia de los parásitos y lograr una buena infección de los macrófagos *in vitro*. Se realizan aspirados de las lesiones y se cultivan en medio NNN (Novy, Nicolle y McNeal) a 27°C hasta obtener promastigotes en fase estacionaria que se utilizan posteriormente para la infección de células U937 y de esta forma obtener amastigotes intracelulares.

Para evaluar la efectividad inicialmente se infectan las células *in vitro* y luego las células conteniendo amastigotes intracelulares que se exponen a diferentes concentraciones de los compuestos y por duplicado a fin de determinar la capacidad de los mismos para disminuir el porcentaje de células infectadas y el número de amastigotes por célula.

Luego de 48 horas de crecimiento como células en suspensión, las células U937 se lavan dos veces con solución salina amortiguada con fosfatos (DPBS), se cuentan y resuspenden en medio RPMI 1640 con 10% de SFB inactivado por calor y mitomicina C (0.25 µg/mL) a una concentración de 250.000 células/mL. En cada pozo de un plato de 24 pozos se dispensan 1 mL de las células y se incuban en presencia de promastigotes en fase estacionaria de *L. (V.) panamensis* en proporción 25:1: célula, respectivamente durante 2 horas a 34°C en presencia de 5% de CO<sub>2</sub>. Los parásitos libres se eliminan por medio de dos lavados con DPBS, centrifugando cada vez a 400 x g y a 4°C durante 10



min. Luego de 24 horas de infección, se adicionan los diferentes compuestos o extractos (varias concentraciones en un rango no superior a la CL50) con cambio de medio a las 48 horas. Células cultivadas en ausencia del compuesto o extracto pero mantenidas en las mismas condiciones se utilizan como control de infección. Algunas células se exponen a Glucantime®, para así comparar el efecto de los compuestos o extractos con este.

Los resultados se expresan como Concentración Efectiva 50 (CE50) calculada por el método Probit. El efecto del compuesto o extracto en los amastigotes de *L. panamensis* se evidencia como una disminución en el porcentaje de células infectadas. Dado que el número de células infectadas en ausencia de tratamiento corresponde al 100% de infección, el % de células infectadas para cada concentración de sustancia se calcula con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ células infectadas} = \frac{\# \text{ Células infectadas en presencia de compuesto}}{\# \text{ células infectadas en el control}} \times 100$$

A su vez, el efecto del medicamento, es decir, el porcentaje de disminución de la infección (%E) se calculará con la siguiente fórmula:  $\%E = 100 - \% \text{ células infectadas}$

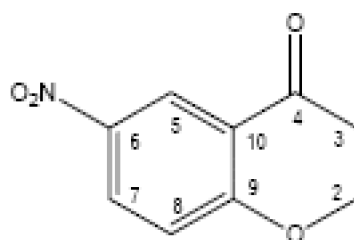
**Los experimentos se realizaron por triplicado y ocasionalmente por quintuplicado; usualmente se repitieron 2-6 veces para corroborar el perfil de actividad, pues hay que tener en cuenta que tratándose de organismos vivos los valores numéricos no son siempre exactamente iguales entre experimento y experimento.**

## 6.6 MÉTODOS COMPUTACIONALES

Las geometrías moleculares fueron optimizadas utilizando el paquete Gaussian 98 al nivel de B3LYP/6-31G(d). El análisis 3D-QSAR se realizó utilizando el protocolo CoMFA9 implementado en el software Sybyl10. El campo de fuerza de Tripos11 fue considerado para la descripción del campo estérico.

Las cargas atómicas derivadas del potencial electrostático fueron calculadas siguiendo la metodología CHELPG12 implementada en Gaussian 98. Diferentes mallas espaciales y valores de salida para las energías de interacción fueron consideradas como se describió en la sección de resultados. El átomo de prueba utilizado en los cálculos CoMFA fue el carbono con hibridación sp<sup>3</sup> con carga +1.

## 6.7 CARACTERÍSTICAS ESPECTROSCÓPICAS

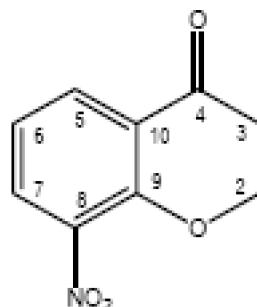


• 6-nitro-cromanona (1)

**1 H-RMN**  $\delta$  2.90 (seudo t,  $J = 6.6$  Hz, 2H, **H - 3ax,ec**), 4.67 (seudo t,  $J = 6.5$  Hz, 2H, **H - 2ax,ec**), 7.11 (d,  $J = 9.2$  Hz, 1H, **H-8**), 8.32 (dd,  $J = 9.2, 2.8$  Hz, 1H, **H-7**), 8.77 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H, **H-5**)

**13 C-RMN**  $\delta$  37.6 (-CH 2 -C=O), 68.0 (-CH 2 -O-), 119.8 (**C8**), 121.2 (**C10**), 124.2 (**C7**), 130.7 (**C5**), 142.4 (**C6**), 166.2 (**C9**), 189.9 (**C=O**)

**IR** (KBr)  $\nu$  3081(-CH-Ar), 1699 (-C=O), 1614 (C-NO<sub>2</sub>), 1336 (C-NO<sub>2</sub>), 1255 (Ar-O-C-) cm<sup>-1</sup>

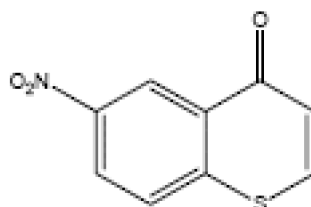


• 8-nitro-cromanona (2)

**1 H-RMN**  $\delta$  2.93 (seudo t,  $J = 6.5$  Hz, 2H, **H -3ax,ec**), 4.72 (seudo t,  $J = 6.5$  Hz, 2H, **H - 2ax,ec**), 7.12 (seudo t,  $J = 7.9$  Hz, 1H, **H-6**), 8.10 (dd,  $J = 7.9, 1.6$  Hz, 1H, **H-5**), 8.12 (dd,  $J = 8.0, 1.6$  Hz, 1H, **H-7**)

**13 C-RMN**  $\delta$  37.6 (-CH 2 -C=O), 68.7 (-CH 2 -O-), 120.9 (**C6**), 123.9 (**C10**), 131.9 (**C5**), 132.9 (**C7**), 140.0 (**C8**), 155.4 (**C9**), 189.8 (-C=O)

**IR** (KBr)  $\nu$  3073 (-CH-Ar), 1680 (-C=O), 1607 (C-NO<sub>2</sub>), 1286 (C-NO<sub>2</sub>), 1250 (Ar-O-C-)



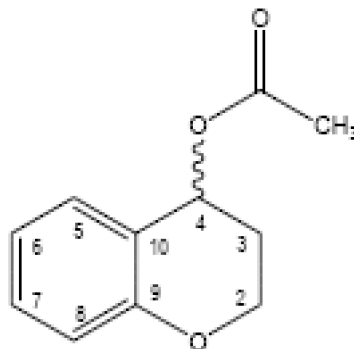
• 6-nitro-tiocromenona (3)

**1 H-RMN**  $\delta$  7.71 (m, 3H, **H -2, 3, 8**), 8.63 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H, **H-7**), 8.89 (s, 1H, **H-5**)

**13 C-RMN**  $\delta$  127.5 (-CH-C=O), 133.3 (-CH-S-), 130.4 (**C7**), 134.4 (**C10**), 129.8 (**C8**),

140.9 (C5), 144.0 (C6), 134.8 (C9), 170.6 (C=O)

IR (KBr)  $\nu$  3013 (-CH-Ar), 1636 (-C=O), 1590 (C-NO<sub>2</sub>), 1343 (C-NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup> MS m/z 223.4 (M<sup>+</sup>), 207.4(base), 89 (57.9%) C<sub>9</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>3</sub>S

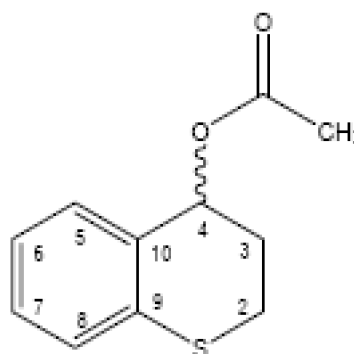


• 4-acetil-cromano (4)

**1 H-RMN**  $\delta$  2.02 (s, 3H, CH 3 -CO), 2.28 (m, 2H, -H<sub>3ax,ec</sub>), 4.18-4.31 (m, 2H, -CH 2 -O-), 5.94 (pseudo t,  $J = 3.8$ , 1H, CH-O-); 6.87(d,  $J = 8.2$ , 1H, H-8) y (d,  $J = 7.5$ , 1H, H-5); 7.18-7.30 (m, 1H, H-6) y (dd,  $J = 7.6, 1.6$ , 1H, H-7)

**13 C-RMN**  $\delta$  21.8 (-CH 3 -C=O), 28.8 (-CH 2 -CH-O), 62.5 (-CH 2 -O-), 65.7 (-CH-O), 117.5 (C8), 120.7 (C10), 120.9 (C6), 130.6 (C5), 131.1 (C7), 155.7 (C9), 170.9 (-C=O)

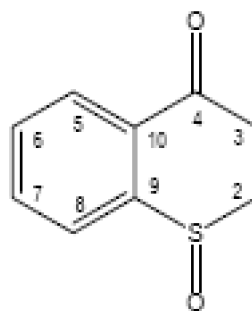
IR (KBr)  $\nu$  2980 (-CH-Ar), 1724 (-COOR), 1232 (Ar-O-C-) cm<sup>-1</sup>



• 4-acetil-tiocromano (5)

**1 H-RMN**  $\delta$  2.07 (s, 3H, CH 3 -CO), 2.15(m, 1H, -H<sub>3ax</sub>), 2.41 (m, 1H, -H<sub>3ec</sub>), 2.86 (td, 1H,  $J = 4.6, 12.6$ , -H<sub>2ax</sub>), 3.29 (td,  $J = 2.6, 12.6$ , 1H, -H<sub>2ec</sub>), 6.00 (sa, 1H, CH-O-), 6.9-7.5 (m, 4H, H- 5,6,7,8)

**13 C-RMN**  $\delta$  21.8 (-CH 3 -C=O), 22.2 (-CH 2 -S-), 28.31(-CH 2 -CH-O), 68.4(-CH-O), 124.1(C6), 131.0 (C10), 124.6 (C8), 126.6 (C5), 131.9(C7), 134.5 (C9), 170.5 (-C=O)



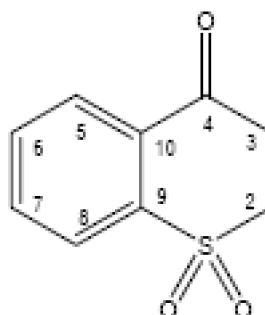
• *tiocromanona sulfóxido* ( 6)

Fue parcialmente caracterizado en una mezcla inseparable de isómeros ópticos por cromatografía de columna.

**1 H-RMN**  $\delta$  2.02 - 2.95 (m, 1H, -H3ax), 3.41 - 3.50 (m, 3H, -H3ec y -H2ax,ec), 7.65 (td,  $J = 7.6, 1.2$ , 1H, H -6), 7.75 (td,  $J = 7.5, 1.3$ , 1H, H -7), 7.86 (dd,  $J = 7.7, 1.0$ , 1H, H-8), 8.14 (dd,  $J = 7.7, 1.0$ , 1H, H-5)

**13 C-RMN**  $\delta$  30.8 (-CH 2 -C=O), 47.2 (-CH 2 -S-), 129.0 (-C8), 129.4 (-C5), 129.7 (-C10), 132.6 (- C6), , 135.1 (-C7), 146.0 (-C9), 192.5 (-C=O) C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>S

**IR** (KBr)  $\nu$  3053 (-CH-Ar), 1695 (-C=O), 1286 y 1035.7 (-S=O) cm<sup>-1</sup> **MS m/z** 180.7(M<sup>+</sup>), 152.6 (base), 39.7 (%) C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>2</sub>S



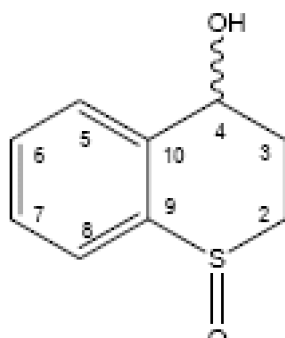
• *tiocromanona sulfona* (7)

**1 H-RMN**  $\delta$  3.40 (dd,  $J = 7.6, 3.4$ , 2H, -H3ax,ec), 3.69 (dd,  $J = 7.5, 6.8$ , 2H, -H2ax,ec), 7.73 (td,  $J = 7.6, 1.2$ , 1H, - H6), 7.82 (td,  $J = 7.5, 1.3$ , 1H, -H7), 8.01 (dd,  $J = 7.8, 1.2$ , 1H, -H8), 8.11 (dd,  $J = 7.7, 1.2$  1H, H5)

**13 C-RMN**  $\delta$  37.1 (-CH 2 -C=O), 49.7 (-CH 2 -S-), 124.1 (-C8), 129.2 (-C5), 130.68 (-C10), 133.8 (-C6), 135.4 (-C7), 141.8 (-C9), 190.6 (-C=O) **IR** (KBr)  $\nu$  3075 (-CH-Ar), 1681 (-C=O), 1304 - 1232 (RSO<sub>2</sub>R) cm<sup>-1</sup> **MS m/z** 196 (M<sup>+</sup>), 168 (37%), 104 (base), 76 (40%) C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>S

• **4-tiocromanol sulfóxidos** (8)

A partir de una mezcla de reacción donde la proporción de isómeros estaba en una relación 3:1 se separaron parcialmente el isómero A (9) y el isómero B (10)

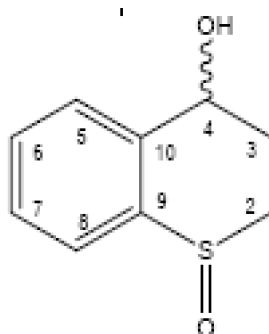


• 4-tiocromanol sulfóxido isómero A (9)

**1 H-RMN**  $\delta$  2.08 - 2.22 (m, 1H, -H3ax), 2.40 - 2.54 (m, 1H, -H3ec), 2.90 (ddd,  $J = 13.8$ ,

9.2, 4.6, 1H, -H2ax), 3.23 (ddd,  $J = 13.7, 4.2, 7.1$ , 1H, -H2ec), 4.02 (-OH), 4.67 (seudo t,  $J = 5.7$ , 1H, CH-O), 7.37 (td,  $J = 7.5, 1.1$ , 1H, -H6), 7.47 (td,  $J = 7.5, 1.2$ , 1H, -H7), 7.61 (dd,  $J = 7.6, 1.0$  -H8 y dd,  $J = 7.6, 1.1$ , 1H, -H5)

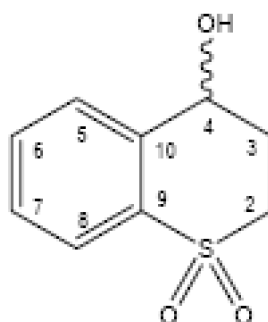
**13 C-RMN**  $\delta$  25.0 (-CH 2 -C=O), 44.4 (-CH 2 -S-), 67.3 (-CH-O), 129.3 (-C8), 129.7 (-C5), 129.9 (-C6), 132.9 (-C7), 138.9 (-C10), 139.7 (-C9) C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>S MS m/z 182.5 (M+), 165.5 (pico base), 147.35 (78%), 137.3 (88.7%), 109.5 (45.5%), 97.2 (46.2%), 57.05 (44.3%), 28.0 (54.2%)



• 4-tiocromanol sulfóxido isómero B (10)

**1 H-RMN**  $\delta$  2.12 - 2.23 (m, 1H, -H3ax), 2.65 (ddt,  $J = 14.8, 11.2, 3.6$ , 1H, -H3ec), 2.85 (-OH), 2.91 (ddd,  $J = 13.6, 6.2, 3.5$ , 1H, -H2ax), 3.31 (ddd,  $J = 13.7, 11.2, 3.4$ , 1H, -H2ec), 4.86 (seudo t,  $J = 3.7$ , 1H, CH-O), 7.37 - 7.68 (m, 4H, -HAr)

**13 C-RMN**  $\delta$  23.2 (-CH 2 -C=O), 42.4 (-CH 2 -S-), 66.0 (-CH-O), 129.9 (-C8), 130.7 (-C5), 131.0 (-C6), 132.7 (-C7), 137.4 (-C10), 138.2 (-C9) C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>S



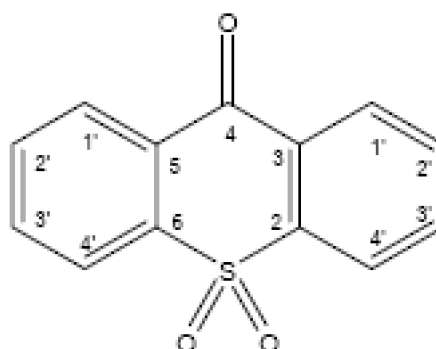
• 4-tiocromanol sulfona (11)

Fue parcialmente caracterizado en una mezcla inseparable de isómeros ópticos por cromatografía de columna.

**1 H-RMN**  $\delta$  2.26 - 2.38 (m, 1H, -H3ax), 2.50 (ddt,  $J = 14.4, 6.9, 3.8$ , 1H, -H3ec), 3.11(ddd,  $J = 14.0, 7.9, 3.0$ , 1H, -H2ax), 3.51 (ddd,  $J = 13.9, 7.0, 3.1$ , 1H, -H2ec), 4.71 (dd,  $J = 5.9, 3.9$ , 1H, CH-O), 7.32 - 7.48 (m, 3H, -H6,7,8), 7.69 (d,  $J = 7.6$ , -H5)

**13 C-RMN**  $\delta$  29.8 (-CH 2 -C=O), 47.1 (-CH 2 -S-), 65.7 (-CH-O), 123.6 (-C8), 129.88 (-C5), 129.9 (-C6), 133.5 (-C7), 137.8 (-C10), 138.4 (-C9) C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>S

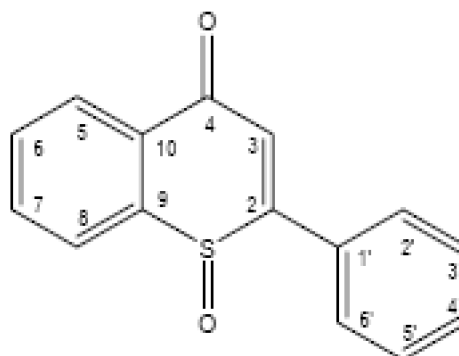
IR (KBr)  $\nu$  3487 (-OH), 2976 (-CH-Ar), 1283 - 1137(RSO<sub>2</sub>R) cm<sup>-1</sup>



• Tioxanten-9-ona sulfona(12)

**1 H-RMN**  $\delta$  7.7-8.4 (m, 4H, -HAr)

**13 C-RMN**  $\delta$  123.9 (-C4'), 129.6 (-C1'), 131.0 (-C3 y 5), 133.6 (-C2'), 135.1 (-C3'), 144.0 (-C2 y 6), 175.0 (C=O)

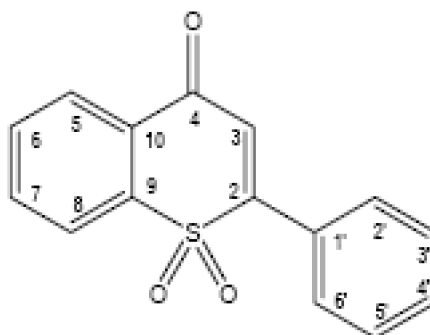


• 2-fenil-1-tiocromeno sulfóxido(13)

Fue caracterizado en una mezcla inseparable de isómeros ópticos.

**1 H-RMN**  $\delta$  7.16 (s, -CH=C-), 7.38 - 7.61 (m, 8H, -HAr), 8.46 (d,  $J = 7.5$ , 1H, -H-Ar)

**13 C-RMN**  $\delta$  123.8 (-C2' y -C6'), 126.9 (-C3' y -C5'), 127.4 (-C4'), 128.2 (-C3), 129.0 (-C8), 129.7 (-C5), 131.3 (-C6), 131.3 (-C1'), 132.0 (-C7), 136.9 (-C10), 138.1 (-C9), 153.5 (-C=CH, -C2), 181.3(C=O)



• 2-fenil-1-tiocromeno sulfona (14)

**1 H-RMN**  $\delta$  6.76 (s, -CH=C-), 7.42 - 7.54 (m, 3H, H -Ar), 7.66 - 7.74 (m, 1H, H -Ar), 7.77- 7.85 (m, 3H, H -Ar), 8.04 (d,  $J = 7.9$ , 1H, H -Ar), 8.15 (d,  $J = 7.8$ , 1H, H -Ar),

**13 C-RMN**  $\delta$  124.1(-C2' y -C6'), 128.5 (-C3' y -C5'), 129.3 (-C4'), 129.7 (-C3), 132.3 (-C8), 133.4 (-C5), 135.3 (-C6), 140.0 (-C1'), 142.0 (-C10), 153.6 (-C=CH), 178.8 (C=O)  
**MS m/z** 270.35 (M+), 178.55 (18.6%), 102.20 (base), 76.15 (90.8%), 50.05 (16.5 %)  
 C15H10O3S

## 6.8 BIBLIOGRAFÍA

1. Echeverri F.; Quiñones W.; Torres F.; Cardona G. y Luis J.G. Withajardin E, a new withanolide from *Deprea orinocensis*. *Phytochemistry* 1995, 40, 923-925.

2. Luis J.G.; Echeverri F. y Gonzalez A. Acnistins C and D, withanolides from *Dunalia solanacea*. *Phytochemistry* 1994, 36, 1297-1301.

3. Luis J.G.; Echeverri F.; Rojas M. y García F. The structure of acnistin B and the immunosuppressive effect of acnistins A, B and E. *Planta Med.* 1994, 60, 348-350.

4. Luis J.G.; Echeverri F.; Quiñones W.; Gonzalez A.; Cardona G.; Archbold R. y Rojas M.

Unambiguous assignment of acnistins and absolute configuration of acnistin A. *Steroids*

1994, 59, 299-304.

5. Luis J.G.; Echeverri F. y Gonzalez A. Acnistins F-H, withanolides from *Dunalia*

*solanacea. Phytochemistry* 1994, 36, 769-772.

6. Weniger B.; Robledo S.M.; Arango G.J.; Deharo E.; Aragón R.; Muñoz V.; Callapa J.; Lobstein A. y Anton R. Antiprotozoal activities of Colombian plants. *J. Ethnopharm.* 2001,78, 193-200.

7. Robledo S.M.; Valencia A.Z. y Saravia N.G. Sensitivity to Glucantime of *Leishmania*

*Viannia* isolates from patients prior to treatment. *J. Parasitol.* 1999, 85, 360-366.

8. Gaussian 03, Revision B.05, Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, J. A. Jr.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C. and Pople, J. A. Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 20039. Cramer III R.D.; DePriest S.A.; Patterson D.E. y Hecht P. The developing practice of Comparative Molecular Field Analysis. In *3D QSAR in Drug Design: Theory, Methods and Applications*. Kluwer/ESCOM, Dordrecht, 2000; pp 443-485.

10. SYBYL, Molecular Modeling System, Tripos Inc., 1699 S. Hanley Rd., St. Louis, MO 63144. 2000.

11. Clark M.; Cramer III R.D. y Van Opdenbosch N. Validation of the General Purpose Tripose 5.2 Force Field. *J. Comp. Chem.* **1989**, 10, 982-1012.

12. Breneman C.M. y Wiberg K.B. Determining Atom-Centered Monopoles from Molecular Electrostatic Potentials. The Need for High Sampling Density in Formamide Conformational Analysis. *J. Comp. Chem.* **1990**, 11, 361.



## 7. PERSPECTIVAS

En primera instancia se deben separar los componentes de las mezclas enantioméricas (alcoholes y sulfóxidos) para definir cual es el responsable de la actividad o si ésta es mediada por la misma mezcla. Además es necesario evaluar los compuestos más activos en un modelo animal para definir su actividad leishmanicida *in vivo*, con el fin de optimizar su perfil farmacológico y su **drogueabilidad**, es decir, el potencial que tienen de poder convertirse en un medicamento. Esto puede lograrse teniendo en cuenta las reglas de Lipinski 1, tales como:

- Incrementar el número de átomos o sistemas donadores y aceptores de puentes de hidrógeno.
- Adicionar al menos un par de anillos más, en lo posible heterociclos.
- Obtener un compuesto con un LogP cercano a 5.0.

Es de especial consideración para conocer este perfil y su interacción con un posible receptor, la separación e identificación inambigua de cada producto generado en mezclas isoméricas, como es el caso de alcoholes y sulfóxidos.

Adicionalmente cabe la posibilidad de estudiar los nitro-derivados para determinar el mecanismo bioquímico por el cual este grupo, en general, incrementa notablemente la citotoxicidad de las moléculas.



---

## 8. PUBLICACIONES

Alrededor de esta tesis se han generado otras acciones que permitieron difundir sus resultados y generar otras actividades anexas, no solo en el campo de las withajardinas y los cromanos, sino también en el de las passifloricinas, así como también en hongos superiores. Igualmente su proceso metodológico y la rica experiencia allegada posibilitaron la presentación a COLCIENCIAS (y posterior aprobación) de otros dos proyectos que estudian el papel de los productos naturales como **Antiparasitarios** y **Antituberculosos**.

Los resultados específicos se enuncian a continuación.

### PONENCIAS INTERNACIONALES

1. F. Torres, F. Echeverri, W. Quiñones, **D. Cardona**, S. Robledo, I. Velez, V. Cruz, R. Notario. Moléculas Bioactivas contra *Leishmania panamensis*. Optimización Molecular. V Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Fitoquímica. I Congreso de Fitoterápicos del Mercosur. Montevideo. 20/11/2005.

2. **Diana Cardona**, F. Echeverri, W. Quiñones, F. Torres, I. Velez, S. Robledo, O. Triana, C. Orozco, R. Torrenegra. "Busqueda de antiparasitarios de la flora colombiana". Simposio internacional: Desarrollo de productos para diagnóstico y control de enfermedades tropicales. Universidad de Antioquia. Sede de Investigaciones Universitaria. 23/9/2005.

3. Lina Carrillo, **Diana Cardona**, F. Echeverri, W. Quiñones, F. Torres, I. Velez, S. Robledo. "Busqueda de antiparasitarios de la flora colombiana". 14<sup>th</sup> International

Scientific Congress CNIC 2005. Cuba, 27-30/6/2005.

4. **Diana Cardona**, F. Echeverri, W. Quiñones, F. Torres, I. Velez, S. Robledo, V. Cruz, R. Notario. "Efectos de withanolidos sobre *Leishmania (Viannia) panamensis*". XIII Congreso Italo-Latino Americano Di Etnomedicina. Roma, 22- 25/9/2004

#### **PONENCIAS NACIONALES**

1. Diana Cardona, Winston Quiñones, Fernando Torres, Iván D. Vélez, Clara I. Orozco-P, Javier Garzón, Fernando Echeverri. "Actividad leishmanicida de algunas especies pertenecientes a la familia Solanaceae". VIII Congreso Colombiano de Fitoquímica, Sincelejo-Sucre, 8-11/11/2005. Actualidades Biológicas 2005, 27, S1, 139 (ISSN 0304-3584).

2. Diana Cardona, Fernando Torres, Winston Quiñones, Sara Robledo, Iván Dario Velez, Victor Cruz, Rafael Notario, Fernando Echeverri. "Moléculas bioactivas contra *Leishmania (V.) panamensis*. Optimización molecular". VIII Congreso Colombiano de Fitoquímica, Sincelejo-Sucre, 8-11/11/2005. Actualidades Biológicas 2005, 27, S1, 154 (ISSN 0304-3584).

3. Edwin Correa, Winston Quiñones, Fernando Torres, Diana Cardona, Ana E. Franco, I. D. Velez, Sara Robledo, Fernando Echeverri. "Actividad Leishmanicida de *Pycnopus sanguineus*". VIII Congreso Colombiano de Fitoquímica, Sincelejo-Sucre, 8-11/11/2005.

4. Lina M. Carrillo, Luz M. Jaramillo, Luis F. Torres, Winston Quiñones, Diana Cardona, Ramiro Fonnegra, Luis F. Echeverri, Iván D. Vélez, Sara M. Robledo. "Busqueda de antiparasitarios de la flora colombiana". XII Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical, Bogotá, 3-6/11/2005. Biomédica, Revista del instituto Nacional de Salud 2005, 25, S1, 213-214 (ISSN 0120-4157)

5. Lorena Andrea Valencia, Luis Fernando Echeverri, Diana Patricia Cardona, Gabriel Jaime Arango, Nora Jimenez, Omar Triana. "Estudio de la actividad de algunas plantas colombianas contra epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*". XII Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical, Bogotá, 3-6/11/2005. Biomédica, Revista del instituto Nacional de Salud 2005, 25, S1, 215 (ISSN 0120- 4157)

6. D. Cardona, F. Echeverri, F. Torres, W. Quiñones, S. Robledo, I. Velez, V. Cruz, R. Notario. "Moléculas bioactivas contra *Leishmania (V.) panamensis*. Optimización molecular". PECET V SIMPOSIO. Universidad de Antioquia. Sede de Investigaciones Universitaria. 14-15/2/2005.

7. **D. Cardona**, F. Echeverri, F. Torres, W. Quiñones. "Estudio fitoquímico de los metabolitos secundarios de *Drymaria cordata*". VII Congreso Nacional de Fitoquímica. "La busqueda de moléculas bioactivas, su transformación y los fitoterapéuticos". Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 03/05/2002

#### **POSTER NACIONAL**

1. Natalia Herrera, Ana E. Franco, Fernando Torres, Winston Quiñones, **Diana Cardona**, Fernando Echeverri. Cultivo y extracción de antiparasitarios a partir de Macromycetes colombianos". VIII Congreso Colombiano de

Sincelejo-Sucre, 8-11/11/2005. Actualidades Biológicas 2005, 27, S1, 144 (ISSN0304-3584). Primer puesto como mejor Trabajo en poster.

2. Diana Muñoz, Iván Dario Velez, **Diana Cardona**, Winston Quiñones, Sara Robledo. "Inhibidores de proteinasas de cisteina como potenciales compuestos quimioterapéuticos en leishmaniosis". XII Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical, Bogotá, 3-6/11/2005. Biomedica, Revista del instituto Nacional de Salud 25, 1, 147 (ISSN 0120 4157).

#### PROYECTOS DE INVESTIGACION

1. F. Echeverri, F. Torres, W. Quiñones, **D. Cardona**, S. Robledo, I. Velez, V. Cruz, R. Notario. Moléculas Bioactivas contra *Leishmania (V.) panamensis*. Optimización Molecular. Financiado por COLCIENCIAS (código 1115-05-12431). Fecha de finalizacion: Agosto/2005

2. Echeverri F.; Quiñones W.; Torres F.; **Cardona D.**; Velez I.; Robledo S.; Upegui L.; Triana O.; Fonnegra R.; Torrenegra R.; Orozco C. "Búsqueda de antiparasitarios de la flora colombiana. 1. Leishmaniosis y Chagas", financiado por COLCIENCIAS (código 1115-04-14409). Fecha de finalizacion: Marzo/2006

3. **Proyecto aprobado por COLCIENCIAS** en la convocatoria Valoración y Uso Sostenible de la Biodiversidad que permite establecer convenio con la comunidad académica internacional para realizar en el 2006: Fernando Echeverri, Winston Quiñones, Fernando Torres, Tatiana Lobo, **Diana Cardona**, Luis Enrique Cuca, Scott Franzblau (Universidad de Antioquia, University of Illinois at Chicago y Universidad Nacional de Colombia). "Búsqueda de moléculas antituberculosas de la Flora colombiana"

4. **Proyecto aprobado por COLCIENCIAS** en la convocatoria Valoración y Uso Sostenible de la Biodiversidad para para realizar en el 2006: Maria Teresa Rugeles López, Fernando Echeverri; Albeiro López Herrera; Fernando Torres; Winston Quiñones; Tatiana Lobo; **Diana Cardona**; Pablo Javier Patiño; Juan Carlos Gallego, Jorge Forero Duarte, Jorge Emilio Osorio. "Actividad antiviral, antitumoral, e inmunomoduladora de extractos de 10 plantas de la familia *Euphorbiaceae* y determinación de los compuestos activos responsables de la actividad biológica".

#### ARTICULOS INTERNACIONALES

1. Wilson Cardona, Winston Quiñones, Sara Robledo, Ivan Darío Vélez, Juan Murga, Jorge García-Fortanet, Miguel Carda, **Diana Cardona** and Fernando Echeverri. Antiparasite and antimycobacterial activity of passifloricin analogues. *Tetrahedron* . 2006, 62,1-8.

2. Edwin Correa, **Diana Cardona**, Winston Quiñones, Fernando Torres, Ana E. Franco, I. D. Velez, Sara Robledo, Fernando Echeverri. Leishmanicidal activity of *Pycnoporus sanguineus*. *Phytotherapy Research* . Aceptado.

3. **Cardona D.**; Cruz V.; Notario R.; Quiñones W.; Torres F.; Velez I.; Robledo S.; Echeverri F. Leishmanicidal activity of withajardins and acnistins. An experimental and computational study. *Tetrahedron* (Sometido).

#### ARTICULOS NACIONALES

1. Diana Cardona, Winston Quiñones, Fernando Torres, Iván D. Vélez, Sara Robledo, Ramiro Fonnegra, Omar Triana, Lia C. Upegui-Gonzalez, Clara I. Orozco-P, Ruben D. Torrenegra, Fernando Echeverri. 2005. "Búsqueda de sustancias antiparasitarias de la flora colombiana". Actualidades Biológicas, 27, S1, 65-69 (ISSN 0304-3584).

2. Diana Cardona, Winston Quiñones, Fernando Torres, Iván D. Vélez, Clara I. Orozco-P, Javier Garzón, Fernando Echeverri. 2005. "Estructura y actividad leishmanicida de Larnaxolida A y B. Nuevos withanolidos de *Larnax glabra* (Standl.) Sawyer". Actualidades Biológicas, 27, S1, 81-86 (ISSN 0304-3584).

# Anexos

## ANEXO 1

DE REPETICIONES DE BIOENSAYOS REALIZADOS A CADA COMPUESTO

CONVENCIONES TABLAS:

**X1:** Es el valor promedio de dos repeticiones en un mismo ensayo, determinado a través del método Probit

**S:** Es la desviación estándar determinada por el mismo método

**X:** Es el valor promedio de varios experimentos independientes para un compuesto determinado

**LC:** Limite de confianza de acuerdo al número de experimentos independientes realizados para el compuesto con un nivel de confianza del 95%

\* : No calculada porque la concentración máxima establecida para la evaluación de los compuestos en este trabajo en el caso de citotoxicidad y efectividad es de 500 µg/mL y 50 µg/mL, respectivamente. Por lo tanto, cuando el dato de CL50 y CE50 se encuentran por encima de este valor no es posible determinar el valor exacto y no se puede saber realmente cual es la desviación estándar.

\*\* : Índice de selectividad no calculado porque el valor de citotoxicidad y/o de efectividad estaba expresado como superior a un valor determinado.

\*\*\* : Para los compuestos que aparece reportado un único ensayo, corresponde a la evaluación realizada después de estar estandarizada la técnica. Sin embargo el reporte de cada ensayo independiente corresponde al promedio de una evaluación por triplicado dentro del mismo experimento.

La desviación estandar y el limite de confianza de experimentos independientes se calcula así:

$$S = ( S_1^2 + S_2^2 + \dots + S_n^2 )^{1/2}$$

$$LC\ 95\% = (1.96 * S) / (N)^{1/2}$$

N: es el número de repeticiones dentro de un experimento o número de series del experimento según el caso.