



BÚSQUEDA DE CABEZAS DE SERIE CON ACTIVIDAD FRENTE A *LEISHMANIA*

Autora

Tamara Marrero Ramos

Tutores

Dr. José Javier Fernández Castro

Dra. Ana R. Díaz Marrero

Curso académico 2019-2020

Índice

Resumen	2
Abstract	2
Abreviaturas	3
1. Introducción.....	4
2. Objetivos	7
3. Material y métodos	8
Procedimientos experimentales generales	8
Experimentos de Resonancia Magnética Nuclear.....	8
Técnicas cromatográficas	8
Estrategias de revisión bibliográfica	9
4. Resultados y discusión	11
Parte 1. Obtención de quinonas con actividad antikinoplastida	11
Obtención de 1,4-dimetoxi-2-metil-5-(<i>tert</i> -pentil)benceno	11
Obtención del compuesto A	13
Purificación del compuesto A.....	13
Elucidación estructural de compuesto A.....	14
Análisis de la actividad antiparasitaria del compuesto A.....	17
Parte 2. Revisión bibliográfica	19
Sesquiterpenos marinos con actividad antileishmania	19
Actividad biológica de quinonas sesquiterpénicas marinas	20
5. Conclusiones.....	26
6. Referencias bibliográficas	27

Resumen

El presente estudio se basa en la síntesis, purificación y evaluación biológica de modelos sintéticos basados en las formas oxidadas de sesquiterpenos marinos identificados en el alga roja *Laurencia johnstonii*.

La estrategia sintética descrita en esta memoria permitió obtener un análogo estructural, compuesto A, que presentó una actividad a escala nanomolar frente a *Leishmania amazonensis*.

Como complemento al trabajo experimental sintético se realizó una búsqueda bibliográfica sobre los sesquiterpenos marinos con actividad antileishmania y las actividades biológicas de quinonas sesquiterpénicas marinas.

Abstract

The present study is based on the synthesis, purification and biological evaluation of synthetic models based on the oxidized forms of marine sesquiterpenes identified in the red algae *Laurencia johnstonii*.

The synthetic strategy described in this report allowed us to obtain the structural analogue, compound A, that showed activity on a nanomolar scale against *Leishmania amazonensis*.

As a complement to the synthetic experimental work, a bibliographic research was carried out on marine sesquiterpenes with antileishmania activity and the biological activities of marine sesquiterpene quinones.

Palabras clave: sesquiterpenos marinos, antileishmania, sesquiterpenquinonas, *Laurencia*, algas rojas.

Abreviaturas

AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
CAS	Chemical Abstracts Service
CC₅₀	Concentración citotóxica media
CMI	Concentración mínima inhibitoria
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
HIF-1	Factor 1 inducible por hipoxia
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Correlation
IC₅₀	Concentración inhibitoria máxima media
IL-6	Interleucina 6
LD₅₀	Dosis letal media
<i>n</i>-Hex	<i>n</i> -Hexano
PTK	Proteína tirosina quinasa
PKC	Proteína quinasa C
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ROESY	Rotating frame Overhause Effect Spectroscopy
ROS	Especies reactivas de oxígeno
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
VEFG	Factor de crecimiento endotelial vascular

1. Introducción

Las enfermedades tropicales desatendidas (EDTs) son prevalentes en áreas tropicales y subtropicales. Estas enfermedades afectan a millones de personas y cuestan miles de millones de euros a las economías en desarrollo, constituyendo un problema de salud pública¹. La leishmaniasis es la enfermedad tropical desatendida más común en países en bajas condiciones socioeconómicas². Aproximadamente 350 millones de personas corren el riesgo de contraerla y se estima que ocurren anualmente 1.6 millones de casos nuevos. La enfermedad afecta sobre todo a la población pobre de países de África, Asia y América Latina, y está asociada con la desnutrición, malas condiciones higiénicas, sistema inmune debilitado y falta de recursos. Es causada por varias especies de protozoos pertenecientes al género *Leishmania* y transmitida a través de la picadura de insectos hembra de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*³.

La quimioterapia actual frente a la leishmaniasis se basa en el uso de compuestos de antimonio pentavalentes como fármacos de primera línea. Otros medicamentos como la anfotericina B liposómica, la pentamidina y la miltefosina son fármacos de segunda alternativa. Estos fármacos se caracterizan por presentar alta toxicidad, efectos secundarios graves y costes elevados lo que dificulta su uso en países donde la leishmaniasis es endémica. Por ello, resulta ideal la búsqueda de nuevas terapias menos tóxicas, de mayor eficacia y más accesibles para poblaciones de bajos ingresos².

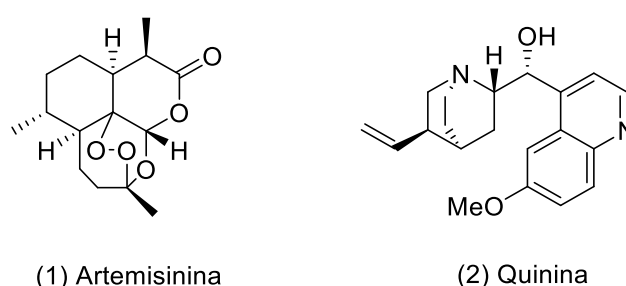


Figura 1. Compuestos de origen natural con potencial antiparasitario, artemisinina y quinina, aislados de *Artemisia annua* y especies del género *Cinchona* sp. respectivamente.

En los últimos años, se han publicado multitud de artículos sobre la actividad antimicrobiana y antiparasitaria de productos derivados de fuentes naturales. La artemisinina (1) o la quinina (2) son un ejemplo de ello, presentando ambos compuestos gran potencial antiparasitario (Figura 1). De hecho, los productos naturales derivados de

plantas como los compuestos de naturaleza fenólica, quinonas, cumarinas, terpenoides y alcaloides han sido ampliamente investigados por su potencial antileishmania, representando una clase prometedora de candidatos a fármacos contra la leishmaniasis⁴.

Entre los productos naturales, las quinonas son sustancias formadas por la oxidación de compuestos aromáticos para dar la correspondiente dicetona. De acuerdo a su grado de complejidad química se clasifican en benzoquinonas; naftoquinonas y antraquinonas⁵. Se trata de compuestos farmacológica y toxicológicamente interesantes que ocupan un lugar importante entre los diferentes tipos de agentes antitumorales⁶. El núcleo de quinona es un elemento estructural común de muchos medicamentos utilizados en la terapia de cánceres, y como ejemplo podemos mencionar mitomicina (3) o mitoxantrona (4) (Figura 2). Las características más notables de los compuestos quinoides son su capacidad para actuar como agentes intercalantes de ADN, alquiladores reductores de biomoléculas y/o generadores de especies reactivas de oxígeno (ROS) a través del ciclo redox, ocasionando daño en las células tumorales lo que permite su explotación con fines terapéuticos⁷.

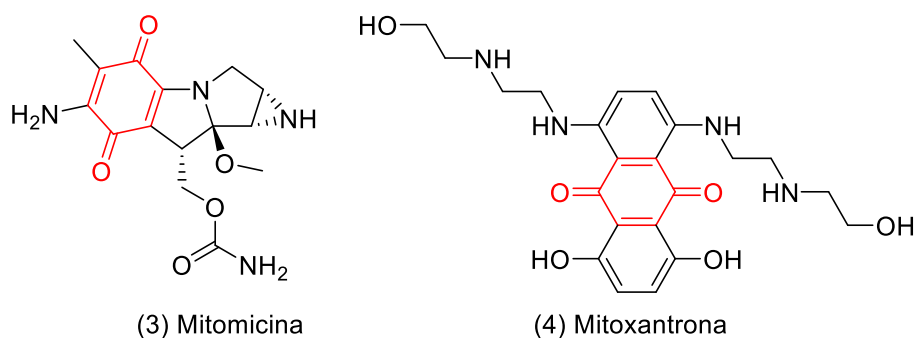


Figura 2. Ejemplos de medicamentos anticancerígenos con núcleo de quinona.

Las algas rojas del género *Laurencia* han sido ampliamente estudiadas por su alta productividad metabólica y diversidad. Estas constituyen una importante fuente de metabolitos secundarios halogenados con actividad citotóxica, antitumoral y bactericida; por lo tanto, son estructuras interesantes para comenzar a evaluar su actividad antiparasitaria. Aunque las especies de *Laurencia* se han estudiado en profundidad, todavía la actividad biológica de muchos de sus metabolitos secundarios no se ha testado de forma sistemática.

El proyecto en el que está enmarcado este trabajo parte de un estudio fitoquímico del alga roja *Laurencia johnstonii*, endémica del Golfo de California, México. A través del fraccionamiento bioguiado, se aislaron e identificaron varios sesquiterpenos como laurinterol (5), isoaurinterol (6), aplysin (7), α -bromocuparano (8) y α -isobromocuparano (9) (Figura 3) y las formas oxidadas de algunos de ellos*. Todos ellos mostraron potencial antiparasitario, con actividad moderada frente a *Acanthamoeba castellanii* Neff, y buena actividad frente a dos especies de *Leishmania* con un índice terapéutico aceptable, abriendo una ventana al desarrollo de fármacos antileishmania con esqueletos carbonados diferentes a los comercializados actualmente⁸. Estos precedentes condujeron a plantear la síntesis química de modelos simplificados como una opción para la obtención de nuevas cabezas de serie en el tratamiento de esta parasitosis.

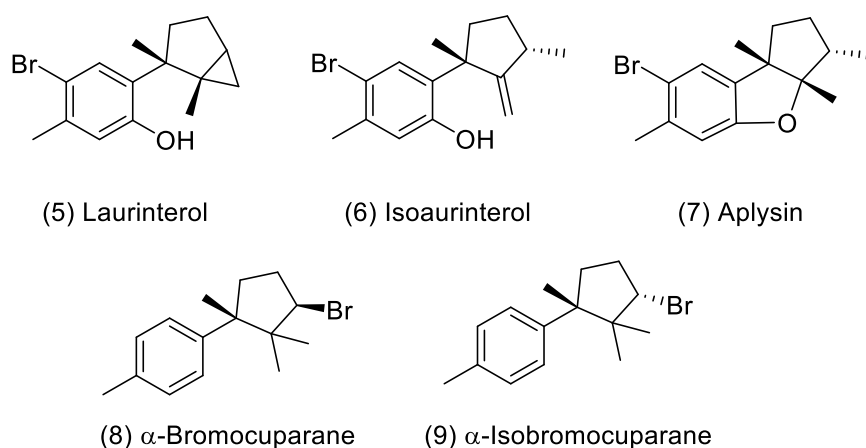


Figura 3. Sesquiterpenos aislados de *Laurencia johnstonii*.

* No se muestran las estructuras de las formas oxidadas ya que están en proceso de patente.

2. Objetivos

En base a estos antecedentes, nos planteamos el siguiente objetivo,

- La obtención de nuevas moléculas sintéticas con actividad antikineto-plástica usando como modelo la estructura de las formas oxidadas de sesquiterpenos naturales del género *Laurencia*.

Debido a las circunstancias desencadenadas por la alerta sanitaria Covid19 y la imposibilidad de completar la experimentación química se plantea como objetivo secundario una revisión bibliográfica sobre los siguientes temas:

- Sesquiterpenos marinos con actividad antileishmania.
- Actividad biológica de quinonas sesquiterpénicas marinas.

3. Material y métodos

Procedimientos experimentales generales

De manera general, todos los reactivos químicos y disolventes empleados en el desarrollo de este trabajo fueron obtenidos del almacén del grupo de investigación. Los reactivos utilizados en las diferentes reacciones fueron adquiridos de la empresa Sigma-Aldrich. Asimismo, se ha hecho uso del equipamiento estándar de un laboratorio de química orgánica. Las técnicas experimentales utilizadas se describen a continuación.

Experimentos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los experimentos de 1D (^1H , ^{13}C) y 2D (HSQC, HMBC, ROESY) RMN se adquirieron en espectrómetros BRUKER® AVANCE 500 MHz y 600 MHz equipado con criosonda. Las muestras se disolvieron en cloroformo deuterado (CDCl_3), empleado como patrón de referencia interno (δ_{H} 7.26 ppm, δ_{C} 77.0 ppm). Los resultados se procesaron haciendo uso del programa informático MestRenova 9.1.0-14011 y TopSpin 3.5 p17.

Técnicas cromatográficas

Cromatografía en columna abierta

La separación y purificación de los productos de reacción se realizó mediante cromatografía en columna abierta, utilizando mezclas de *n*-Hex y AcOEt como fase móvil y gel de SiO_2 60 G de la casa Merck® como fase estacionaria.

Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Las purificaciones finales se realizaron en el sistema de HPLC de la marca Agilent 1260 Infinity Quaternary LC. A su vez, se empleó una columna preparativa de fase normal μ -PorasilTM sílica (125 Å, 10 μm , 19x150mm Ø). Las reacciones se recogieron en un colector automático GIBSON® FC203B, a un flujo constante de 2 mL/min.

Cromatografía en capa fina (TLC)

La monitorización de las reacciones y de las purificaciones se realizó mediante cromatografía en capa fina con cromatofolios de gel de sílice (20 x 20 cm, Analytical Chromatography). Se visualizó mediante luz UV (254 nm) con una lámpara de la marca

Spretoline® Model CM-10 y se revelaron por pulverización con una solución de cloruro de cobalto (2% en ácido sulfúrico) y calentamiento.

Programa de edición de estructuras

Para dibujar las estructuras químicas se hace uso del programa informático ChemDraw Ultra 14.0.

Estrategias de revisión bibliográfica

Se realizó un análisis de la literatura científica del área de las ciencias químicas y biomédicas mediante el empleo de bases de datos especializadas, en concreto, *Scifinder Scholar*, herramienta que contiene toda la información bibliográfica de Chemical Abstract Services (CAS) y Medline®. Esta plataforma incluye publicaciones periódicas y patentes internacionales.

Sesquiterpenos marinos con actividad antileishmania

Para esta revisión se seleccionan tres palabras clave: “sesquiterpene”, “marine” y “*Leishmania*”. La Figura 4 muestra la estrategia de búsqueda y cómo se refinan los resultados de manera consecutiva.

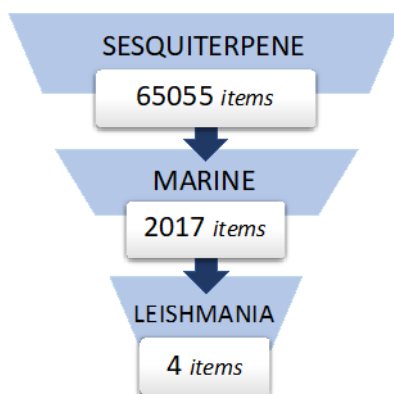


Figura 4. Estrategia de búsqueda: Sesquiterpenos marinos con actividad antileishmania.

Actividad biológica de quinonas sesquiterpénicas marinas.

Igualmente, para la revisión bibliográfica de quinonas sesquiterpénicas bioactivas de origen marino se sigue el esquema representado en la Figura 5.

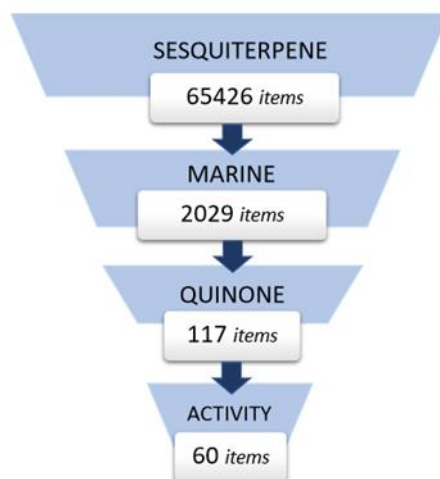


Figura 5. Estrategia de búsqueda: Quinonas sesquiterpénicas bioactivas de origen marino.

4. Resultados y discusión

Parte 1. Obtención de quinonas con actividad antikineto-plástica

Basados en la estructura de las formas quinónicas de los sesquiterpenos marinos con actividad antiparasitaria aislados de *Laurencia johnstonii*, se planteó la síntesis de metilbenzoquinonas sustituidas en dos pasos de reacción, partiendo de moléculas comerciales sencillas según el esquema de la Figura 6.

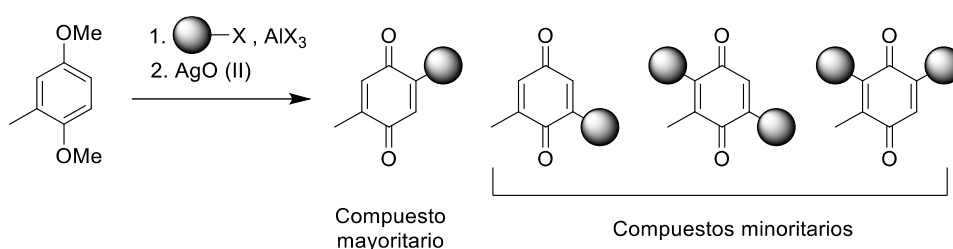


Figura 6. Esquema general de la estrategia sintética.

La primera etapa consiste en una alquilación de Friedel-Crafts. Esta reacción implica la formación de un enlace C-C entre el anillo aromático y un grupo alquilo en presencia de un ácido de Lewis usado como catalizador⁹. En este caso se realiza la alquilación sobre 2,5-dimetoxitolueno empleando 2-cloro-2-metilbutano como haluro sustituido en presencia de $AlCl_3$. El siguiente paso de reacción propuesto es la desprotección de -OMe mediante oxidación con AgO (II).

Obtención de 1,4-dimetoxi-2-metil-5-(*tert*-pentil)benceno

En condiciones anhidras con una atmósfera de argón y una temperatura de 0 °C se añade de forma secuencial 876 mg de $AlCl_3$ (6.57 mmol), 1 mL de nitrometano, 476 μ L de 2,5-dimetoxitolueno (3.285 mmol) (Figura 7) y 808 μ L de 2-cloro-2-metilbutano (6.57 mmol) (Figura 8), manteniendo agitación magnética durante 1.5 horas. Para detener la reacción se añadió agua hasta observar decoloración. A continuación, se realizó una extracción líquido-líquido con éter etílico y la fase orgánica se secó con $MgSO_4$ anhidro y se filtró por gravedad. El éter etílico se evaporó a presión reducida con un rotavapor Buchi R-200®. Los productos de reacción se purificaron mediante cromatografía en columna de gel de sílice (120 x 30 mm Ø) usando como eluyente *n*-Hex/AcOEt (99:1) resultando 3 fracciones principales en base al comportamiento en TLC.

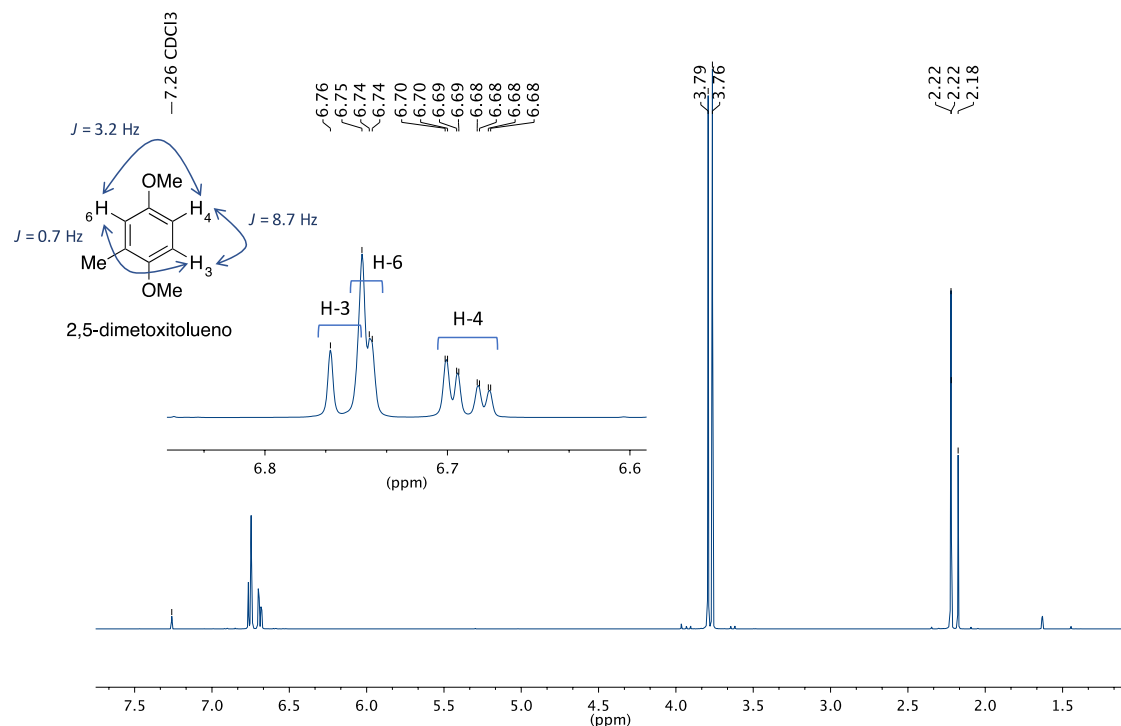


Figura 7. Espectro de RMN de ^1H de 2,5-dimetoxitolueno (CDCl_3 , 500 MHz, 295 K). Ampliación de la región aromática entre 6.6 y 6.8 ppm donde se observan las señales de los protones aromáticos. Se indica su asignación y las correspondientes constantes de acoplamiento (J) en Hz.

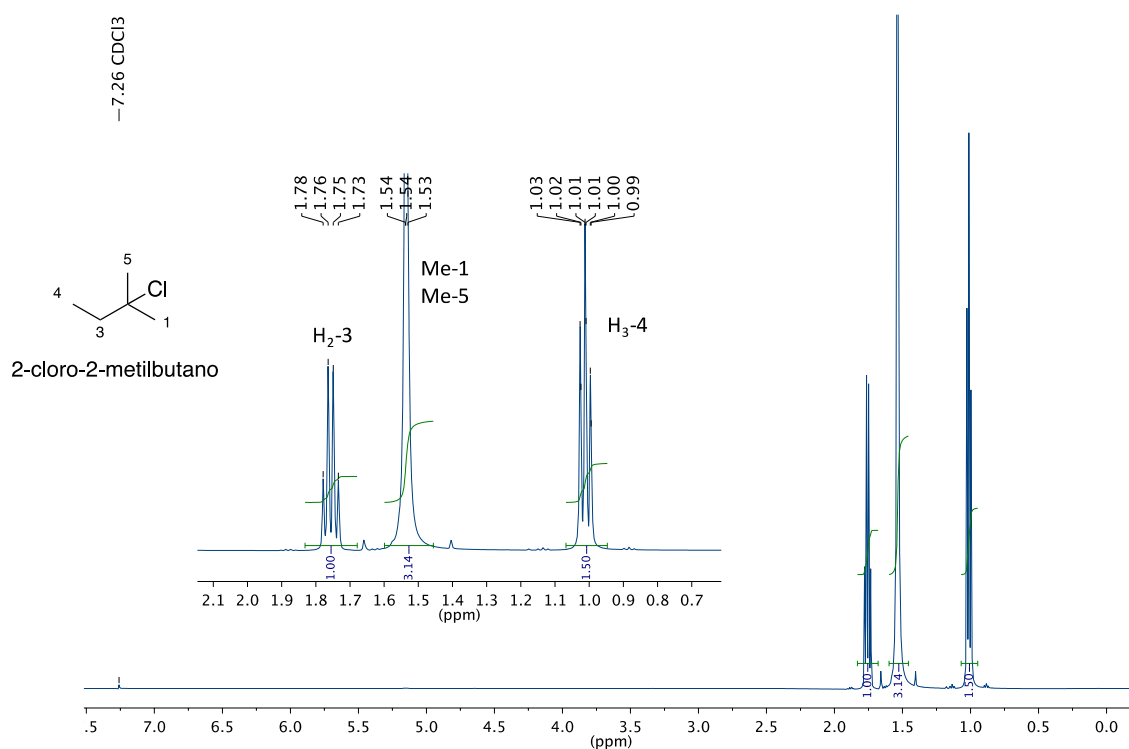


Figura 8. Espectro de RMN de ^1H de 2-cloro-2-metilbutano (CDCl_3 , 500 MHz, 295 K). Ampliación de la región entre 0.5 y 2.0 ppm y asignación de las señales.

El análisis de los espectros de RMN de ^1H de las fracciones resultantes confirmó que la fracción 1 (F1) contenía señales que indicaban la presencia de 1,4-dimetoxi-2-metil-5-(*tert*-pentil)benceno (espectro no mostrado). Siguiendo la estrategia sintética se utiliza para la obtención del compuesto A (2-metil-5-(*tert*-pentil)ciclohexa-2,5-diene-1,4-diona).

Obtención del compuesto A (2-metil-5-(*tert*-pentil)ciclohexa-2,5-diene-1,4-diona)

A partir de la fracción anterior (294 mg, 1.34 mmol) se añadió en el siguiente orden 4 mL de dioxano, 1.2 g de óxido de plata (AgO (II)) (5.34 mmol), y 2 mL de HNO_3 7N, todo ello en agitación continua y a una temperatura de 0°C . Después de 1.5 horas se detuvo mediante adición de agua hasta observar un cambio de color de rojo ladrillo a amarillo. Tras extraer con diclorometano (CH_2Cl_2) se eliminó el disolvente con la ayuda del rotavapor y se analizó el espectro de RMN- ^1H . La mezcla de reacción se purificó haciendo mediante cromatografía en columna (120 x 30 mm \varnothing), usando gel de sílice como fase estacionaria en condiciones isocráticas (*n*-hex/AcOEt (99:1)). Las fracciones se agruparon de acuerdo a su similitud en TLC. Los resultados de RMN revelaron la presencia de compuestos con señales características de benzoquinonas, con lo que se procedió a realizar la purificación final por HPLC.

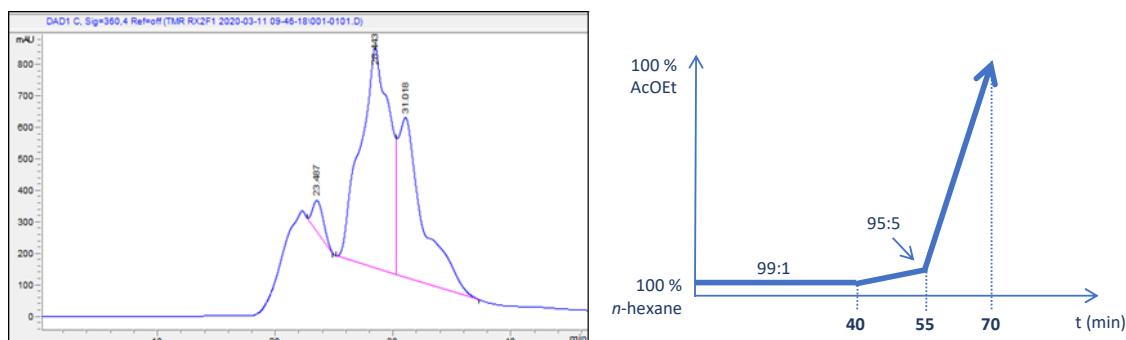


Figura 9. Cromatograma resultante de la purificación en HPLC (Absorbancia/tiempo de retención) del compuesto A ($t_R = 31$ min). Gráfico del sistema de elución.

Purificación del compuesto A (2-metil-5-(*tert*-pentil)ciclohexa-2,5-diene-1,4-diona)

El producto de reacción se purificó mediante HPLC. Se empleó una columna μ -Porasil siguiendo el gráfico de elución representado en la Figura 9. Se mantuvo un flujo constante de 2 mL/min. Del análisis de TLC y RMN- ^1H de las 30 subfracciones obtenidas

se obtuvo un compuesto puro que se identificó como compuesto A (2-metil-5-(*tert*-pentil)ciclohexa-2,5-diene-1,4-diona).

Elucidación estructural del compuesto A (2-metil-5-(*tert*-pentil)ciclohexa-2,5-diene-1,4-diona)

La estructura química del compuesto A se determinó mediante experimentos de RMN (600 MHz) monodimensionales y bidimensionales. El análisis del espectro de RMN-¹H (Figura 10) indicó la presencia de un singlete a δ_H 6.52 ppm (H-6) y un doblete a δ_H 6.50 (J=1.6 Hz, H-3), correspondientes a dos protones olefínicos respectivamente. Este último está acoplado con la señal de un metilo desapantallado a δ_H 2.01 ppm (J=1.6 Hz, Me-7) lo que confirma que H-3 y el metilo se encuentran del mismo lado del anillo y que el compuesto A es el resultante de la reacción de monoalquilación sobre el anillo. En el rango comprendido entre 0.5 y 1.8 ppm se encuentran las señales de la cadena alquílica.

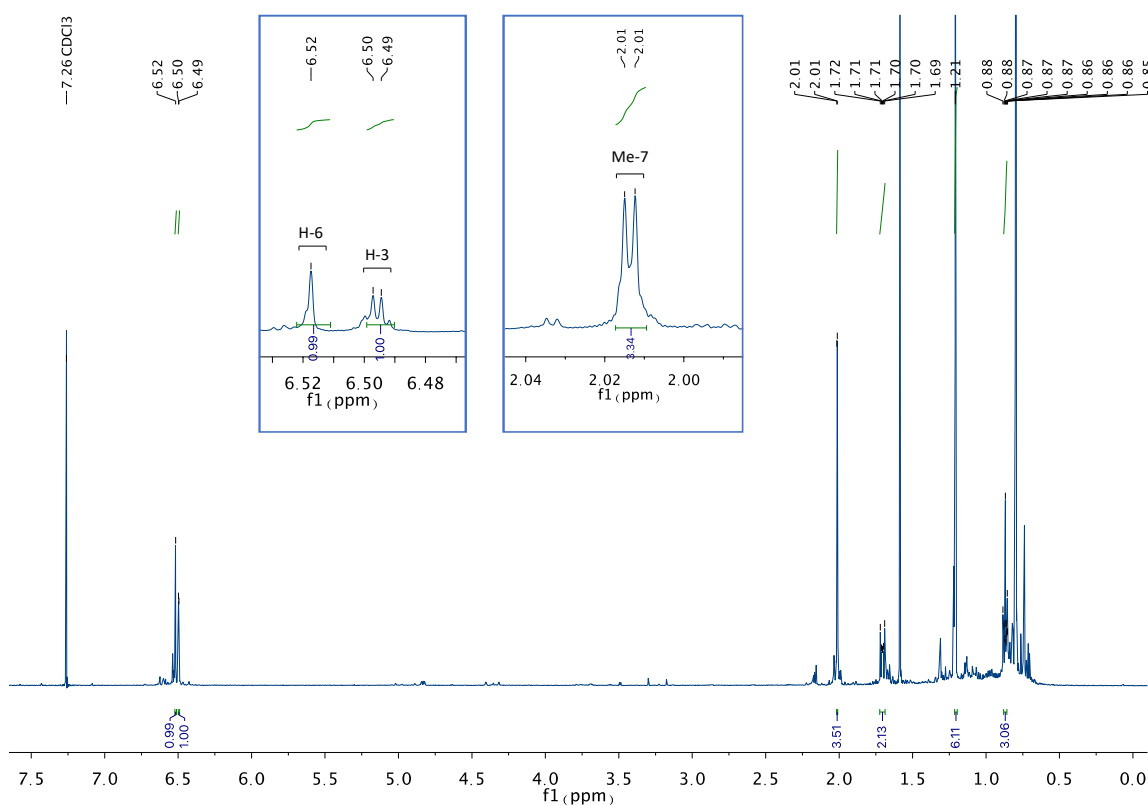


Figura 10. Espectro de RMN de ¹H de A (CDCl₃, 600 MHz, 298 K). Ampliación de las regiones entre 6.48-6.53 ppm y 1.99-2.04 ppm.

Del análisis del espectro de RMN de ¹³C se deducen los principales grupos funcionales de la molécula confirmando la presencia de dos carbonos carbonílicos a δ_C 188.9 y 187.9 ppm y cuatro carbonos de dobles enlaces (Figura 11, Tabla 1).

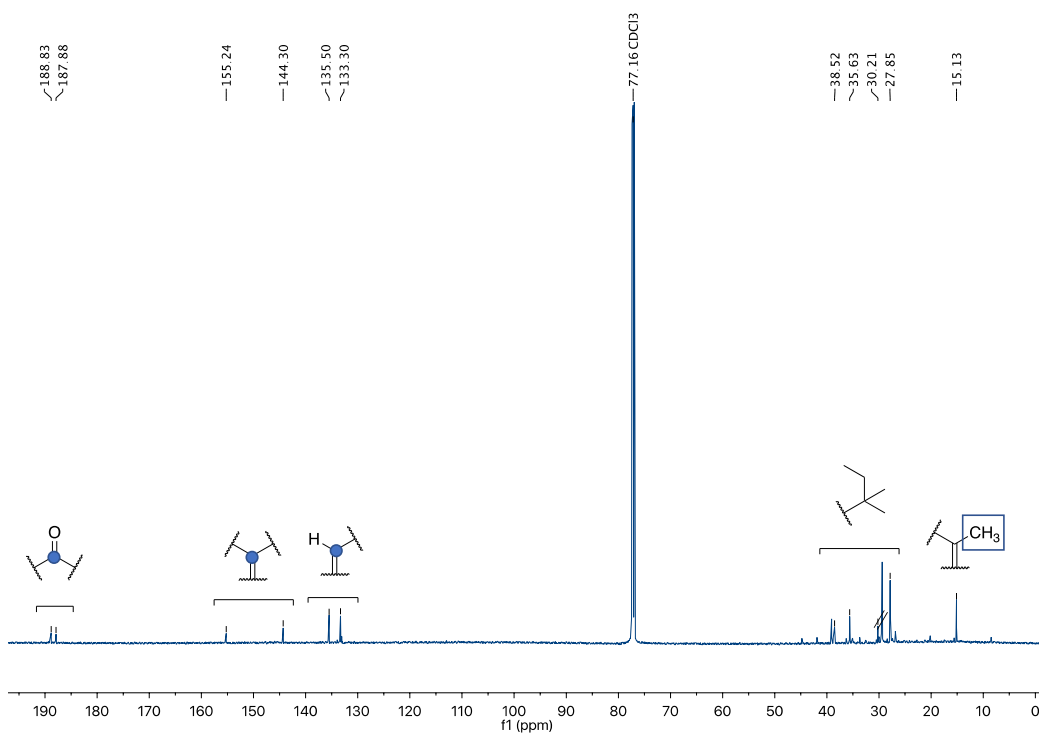


Figura 11. Espectro de RMN de ^{13}C de A (CDCl_3 , 150 MHz, 298 K) en el que se indican los grupos funcionales presentes en la molécula.

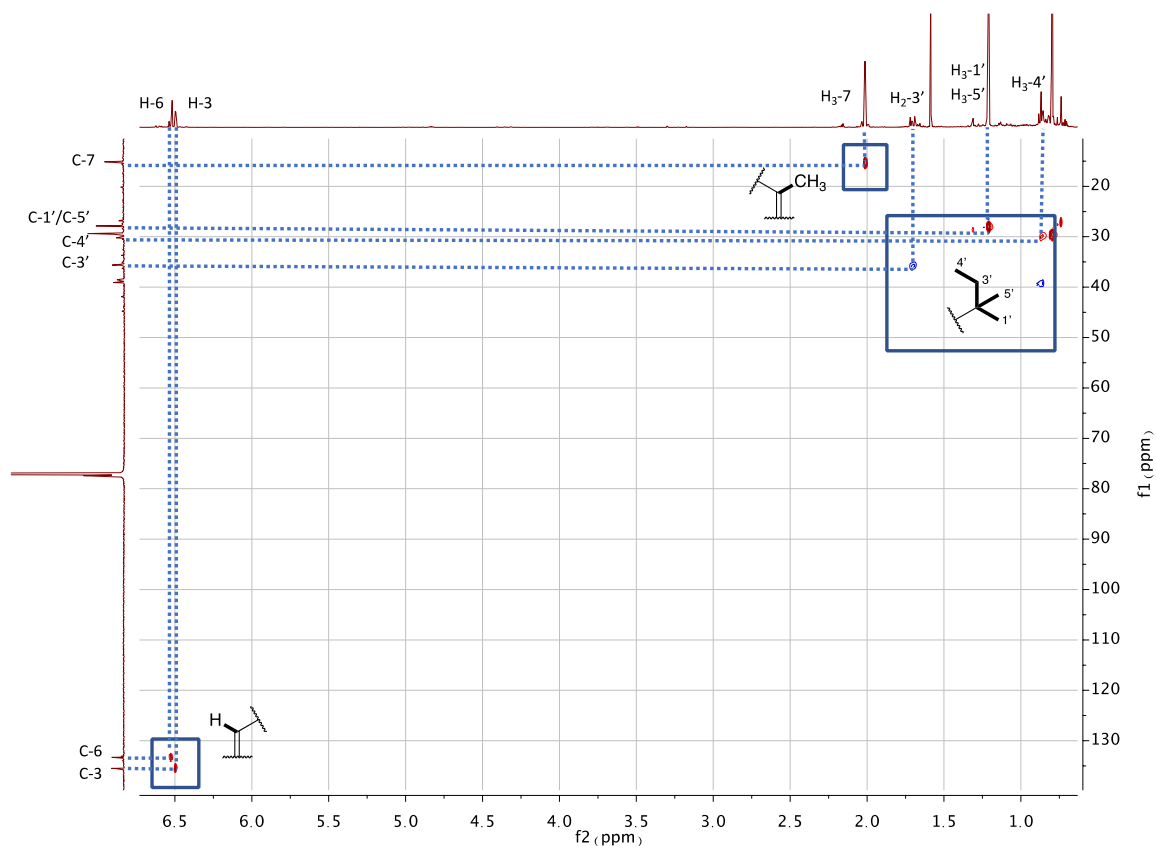


Figura 12. Experimento HSQC de A (CDCl_3 , 600 MHz, 298 K). Este experimento permite establecer las correlaciones de cada protón con su respectivo átomo de C. En la figura se han señalado las correlaciones observadas para A.

Estos datos, combinados con las correlaciones observadas en el experimento HSQC permitieron establecer las correlaciones directas ^1H - ^{13}C , incluyendo las señales correspondientes al fragmento *tert*-pentilo, tal y como se indica en la Figura 12.

Una vez se ha confirmado la formación del núcleo 2-metil-1,4-quinona, el estudio de las correlaciones observadas en el experimento HMBC nos permitió confirmar la posición en la que se encuentra sustituido el radical *tert*-pentilo (Figuras 13 y 14).

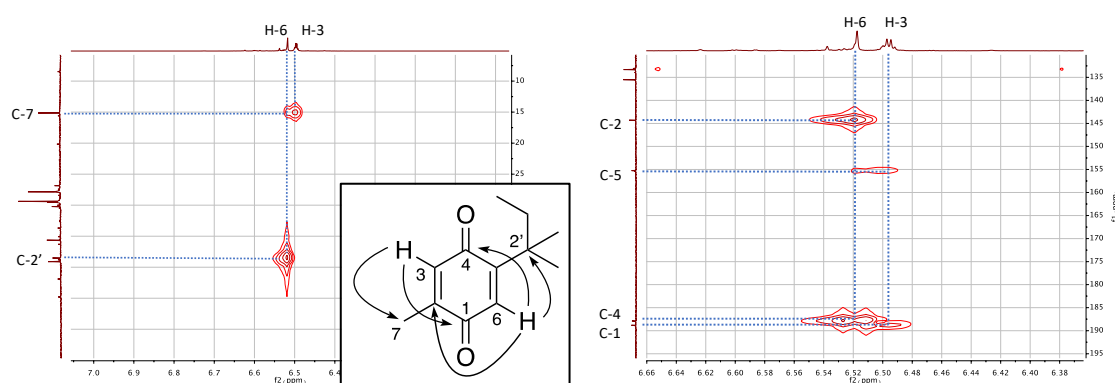


Figura 13. Experimento HMBC de A (CDCl_3 , 600 MHz, 298 K). Este experimento permite establecer las correlaciones ^1H - ^{13}C a dos y tres distancias de enlace. En la imagen se muestran las ampliaciones del experimento HMBC donde se aprecian las correlaciones que muestran H-6 y H-3. Los más representativos son los indicados con flechas en la figura.

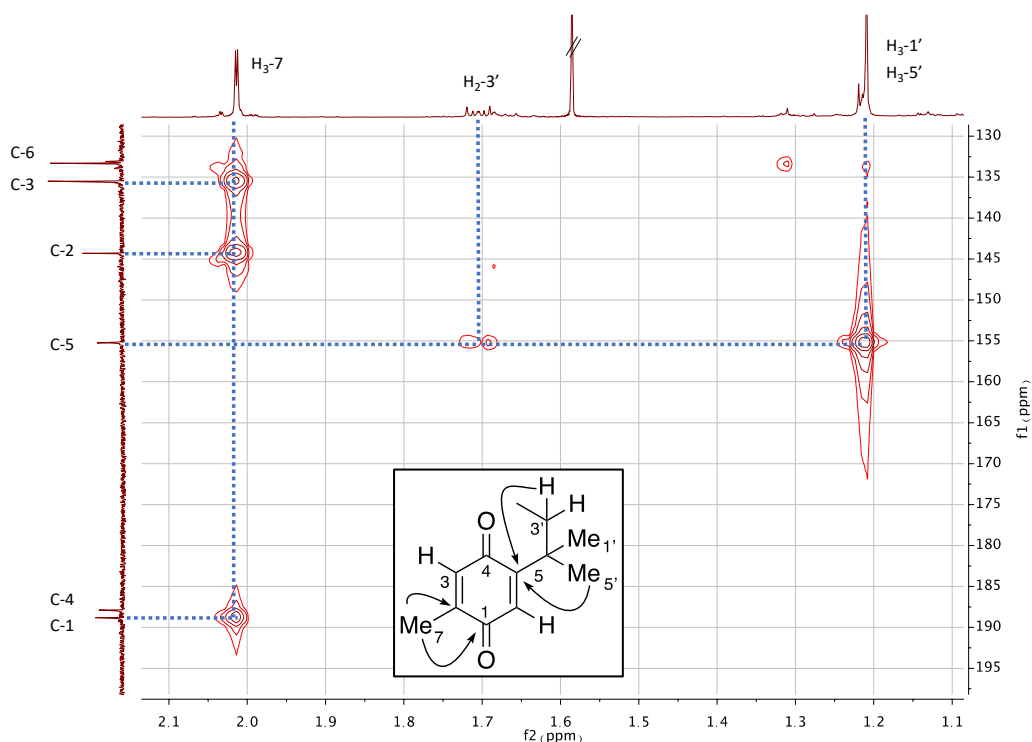


Figura 14. Ampliación del experimento HMBC de A (CDCl_3 , 600 MHz, 298 K). Las correlaciones más representativas están indicadas con flechas en la figura.

Las correlaciones de H-3 con C-1 y C-7, y de H-6 con C4 y C-2' confirmaron que H-6 se encuentra sobre el mismo doble enlace que el fragmento *tert*-pentilo, y que el Me-7 es vecinal a H-3, y permiten situar cada grupo carbonilo en el anillo quinona. Por otra parte, para confirmar que la posición relativa de los protones H-3 y H-6 en el anillo es para- son determinantes las correlaciones que se observan entre H-6 con C-2, H-3 con C-5 y las del metileno H₂-3' y de los Me-1' y Me-5' con C5.

De este modo queda completamente definida la estructura del compuesto A, confirmándose la obtención del compuesto mayoritario de la reacción, cuyos datos espectroscópicos están recogidos en la Tabla 1.

Tabla 1. Datos de RMN-¹H y ¹³C del compuesto A (CDCl₃, 600 MHz, 298 K).

Posición	δ _H (ppm, J)	δ _C (ppm)
1		188.8, C
2		144.3, C
3	6.50, d (1.6)	135.5, CH
4		187.9, C
5		155.2, C
6	6.52, s	133.3, CH
7	2.01, d (1.6)	15.2, CH ₃
1', 5'	1.20, s	27.8, CH ₃
2'		38.5, C
3'	1.70, dd (5.0, 3.6)	35.7, CH ₂
4'	0.87, t	30.2, CH ₃

Análisis de la actividad antiparasitaria del compuesto A

El compuesto A fue analizado en el Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias por el grupo de Amebas de Vida Libre con el fin de determinar su actividad antikineto-plástica frente a dos especies de *Leishmania* y *Trypanosoma cruzi* y su toxicidad frente a macrófagos murinos J774A.1 (Tablas 2 y 3).

Tabla 2. Actividad antiparasitaria (IC_{50}) y toxicidad (CC_{50}) del compuesto A y de los fármacos de referencia.

Compuestos	<i>L. amazonensis</i> IC_{50} (μM)	<i>L. donovani</i> IC_{50} (μM)	<i>T. cruzi</i> IC_{50} (μM)	Macrófagos J774A.1 CC_{50} (μM)
Compuesto A	0.625 \pm 0.104	112.11 \pm 22.02	4.37 \pm 0.26	23.47 \pm 2.45
Miltefosina	6.48 \pm 0.24	3.32 \pm 0.27	--	72.19 \pm 3.06
Benznidazole	--	--	6.94 \pm 1.94	400.00 \pm 4.00

IC_{50} : concentración inhibitoria máxima media; CC_{50} : concentración requerida para reducir la viabilidad de macrófagos murinos J774A.1 en un 50%.

Tabla 3. Índice de selectividad (SI)= CC_{50}/IC_{50} del compuesto A comparado con los fármacos de referencia.

Compuestos	<i>L. amazonensis</i> SI (CC_{50}/IC_{50})	<i>L. donovani</i> SI (CC_{50}/IC_{50})	<i>T. cruzi</i> SI (CC_{50}/IC_{50})
Compuesto A	37.6	0.21	5.37
Miltefosina	11.1	21.74	--
Benznidazol	--	--	57.64

El compuesto A resulta especialmente activo contra *L. amazonensis* con un IC_{50} de 625 nM y un SI de 37.6, que supera el mostrado por miltefosina.

Parte 2. Revisión de sesquiterpenos y sesquiterpenquinonas marinas bioactivos

Sesquiterpenos marinos con actividad antileishmania

Del análisis bibliográfico se deduce que son escasos los sesquiterpenos de origen marino descritos hasta el momento que poseen actividad frente a leishmania.

El sesquiterpeno (S)-(+)-curcufenol (10), aislado de las esponjas marinas *Didiscus axeata*, *D. flavus*, *Myrmekioderma styx* y *Epipolasis sp.*, resulta activo frente a *L. donovani* con un IC_{50} de 11 μM , próximo al de la pentamidina y anfotericina B. Mientras que, el derivado esterificado del ácido nicotínico (11) posee una actividad incluso mayor que la propia pentamidina (IC_{50} 0.6 μM)¹⁰.

Euplotina C (12), aislado del ciliado *Euplotes crassu*, destaca por presentar actividad leishmanicida con un IC_{50} 4.6-8.1 $\mu g/mL$ ¹¹. Asimismo, shagene A (13), aislado de un octocoral no identificado, posee efecto citotóxico frente a amastigotes de *L. donovani* (IC_{50} 5 μM) con un índice de selectividad (SI) 70 veces superior que el de miltefosina¹².

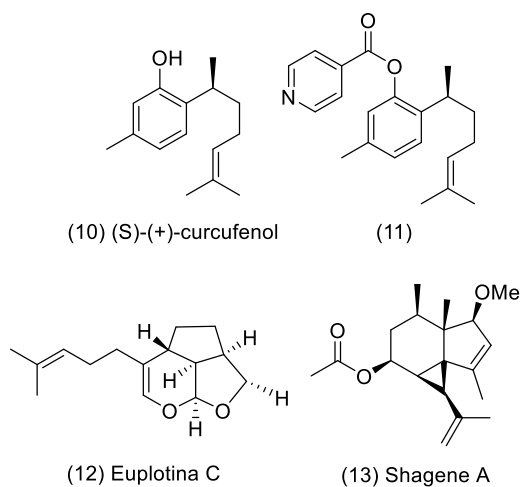


Figura 15. Compuestos sesquiterpénicos con actividad antileishmania.

Actividad biológica de quinonas sesquiterpénicas marinas.

Las únicas quinonas sesquiterpénicas con actividad antileishmania que han sido descritas son la forma oxidada del avarol (14), avarona (15), aislados de la esponja *Dysidea avara*, y la forma semisintética tiazooavarona (16). Todos ellos presentan buena actividad frente a *L. infantum* y *L. tropica* (Tabla 4)¹³.

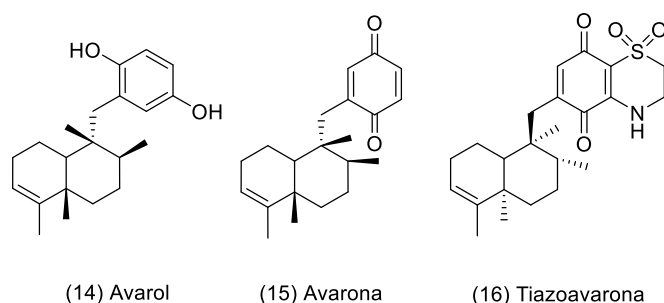


Figura 16. Par redox avarol/avarona y su análogo semisintético tiazooavarona.

Tabla 4. Actividad antileishmania de sesquiterpenos aislados de la esponja *Dysidea avara* en comparación con control.

Compuestos	<i>L. infantum</i> IC ₅₀ (μM) ^P	SI	<i>L. infantum</i> IC ₅₀ (μM) ^A	SI	<i>L. tropica</i> IC ₅₀ (μM) ^P	SI
14	7.42 ± 0.27	5.0	3.19	11.6	7.08 ± 1.91	11.6
15	28.21 ± 0.32	2.2	7.64	8.1	20.28 ± 3.56	8.1
16	8.78 ± 0.26	0.38	4.99	0.67	9.52 ± 0.32	0.67
Anfotericina B	0.20 ± 0.03	-	0.189	-	0.17 ± 0.04	-

^P Forma parasitaria promastigote. ^A Forma parasitaria amastigote. SI= HMEC-1/IC₅₀ *Leishmania* sp. HMCE-1: actividad sobre células del endotelio microvascular humano.

Extendemos por tanto la búsqueda a sesquiterpenquinonas bioactivas de origen marino, compuestos de biogénesis mixta, que incluyen un fragmento sesquiterpénico y un núcleo de quinona en su estructura. Para racionalizar la presentación de resultados se agrupan, en la medida de lo posible, atendiendo a la sustitución sobre el anillo quinónico.

a. Sustitución en 4'

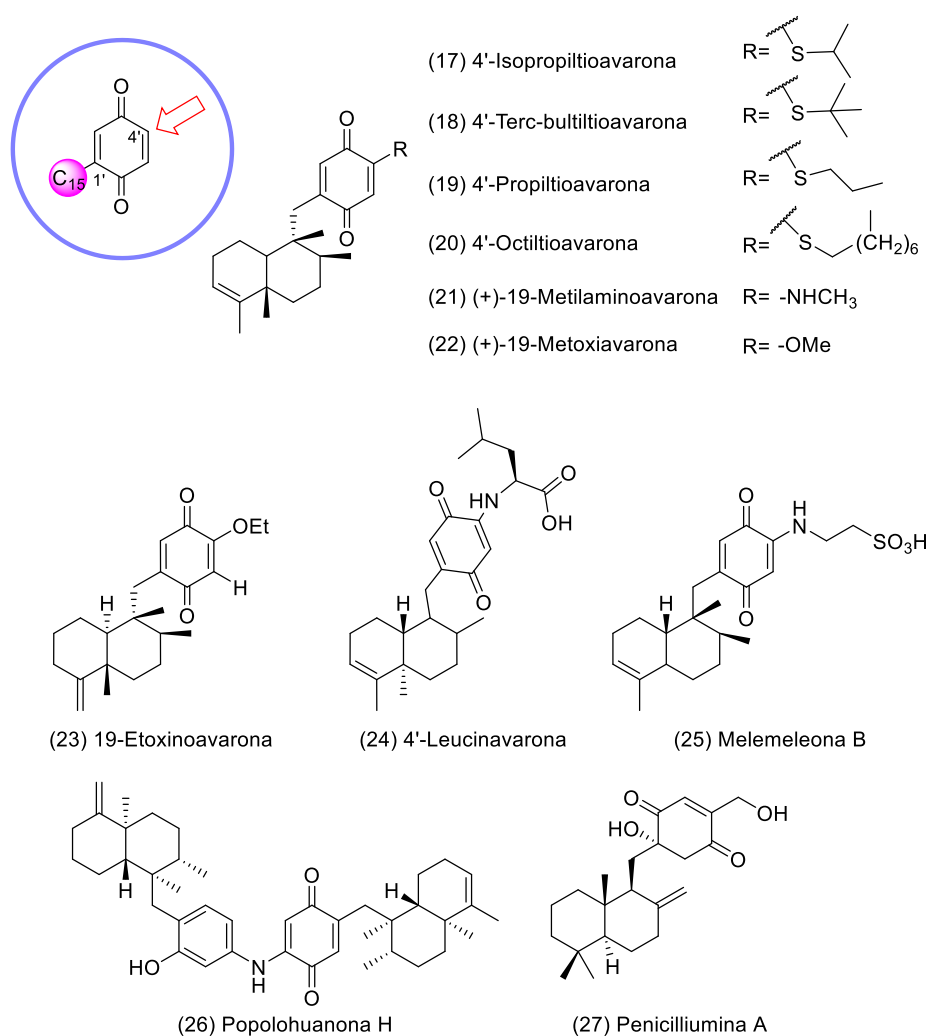


Figura 17. Sesquiterpenquinonas marinas sustituidas en la posición 4'.

Tabla 5. Actividad de sesquiterpenquinonas sustituidas en la posición 4'.

Compuesto	Organismo	Actividad	Ref
15, 17-20	<i>Dysidea avara</i> y análogos sintéticos de 15	Antiincrustante e inhibitoria frente bacterias y hongos marinos. Destaca 17 y 18 con IMC < 1 µg/mL y LC ₅₀ /EC ₅₀ > 4	[14]
21	<i>Dysidea sp.</i>	Citotoxicidad frente a A-549, HELA, K562, HCT-116 y BEL-7402. Destaca 21 con valores IC ₅₀	[15]
22	Análogo sintético de 15	0.93-4.61 µM e IC ₅₀ 2.4 µM sobre FemX	[16]
23	Análogo sintético de 15	Citotoxicidad frente a NCI-H29 con IC ₅₀ 2.77 µM	[17]
24	<i>Dysidea avara</i>	Citotoxicidad frente a A-549 y HT-29 con IC ₅₀ 7.40 µM y 9.62 µM respectivamente	[18]
25	<i>Dysidea avara</i>	Citotoxicidad frente a PTK con IC ₅₀ 28 µM	[19]
26	<i>Dactylospongia elegans</i>	Actividad inhibitoria frente IL-6 y TNF-α	[20]
27	<i>Penicillium sp</i>	Citotoxicidad frente a A-549, HepG2 y HELA	[21]

b. Sustitución en 3'

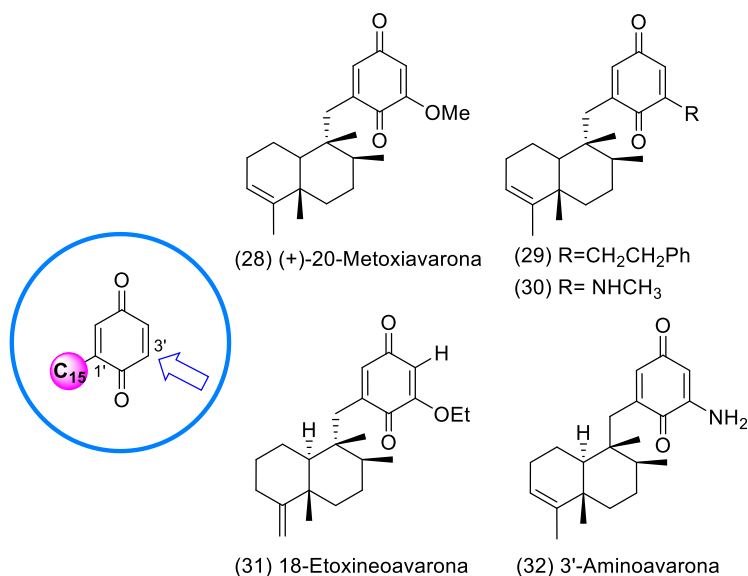


Figura 18. Sesquiterpenos sustituidos en la posición 3'.

Tabla 6. Actividad de sesquiterpenos sustituidos en la posición 3'.

Compuesto	Organismo	Actividad	Ref
28-30	Análogos sintéticos de 15	Citotoxicidad frente a A-549, HELA, K562, HCT-116 y BEL-7402	[16]
31	<i>Dysidea avara</i>	Citotoxicidad frente a NCI-H29 con IC ₅₀ de 5.45 μM	[17]
32	<i>Dysidea sp.</i>	Citotoxicidad frente a MDA-MB-231 con IC ₅₀ ≈ 2 μg/mL y LS174T, de menor importancia (IC ₅₀ = 20 μg/mL)	[22]

c. Sustitución en 3' y 6'

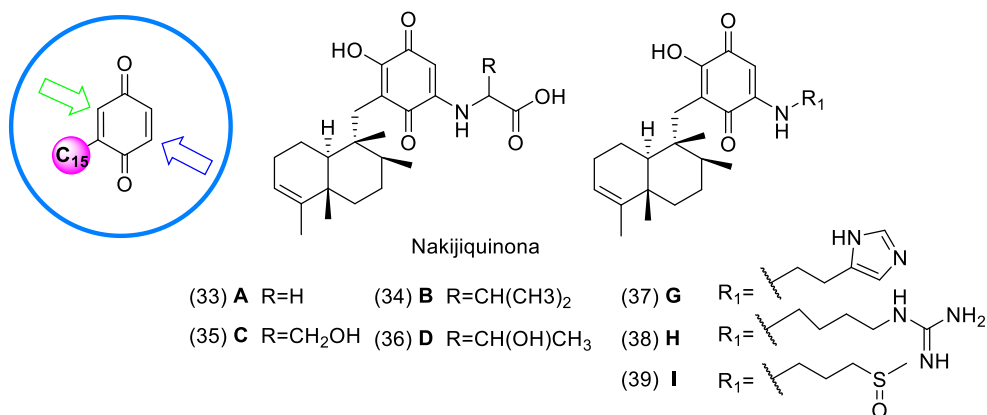


Figura 19. Sesquiterpenos sustituidos en la posición 3' y 6'.

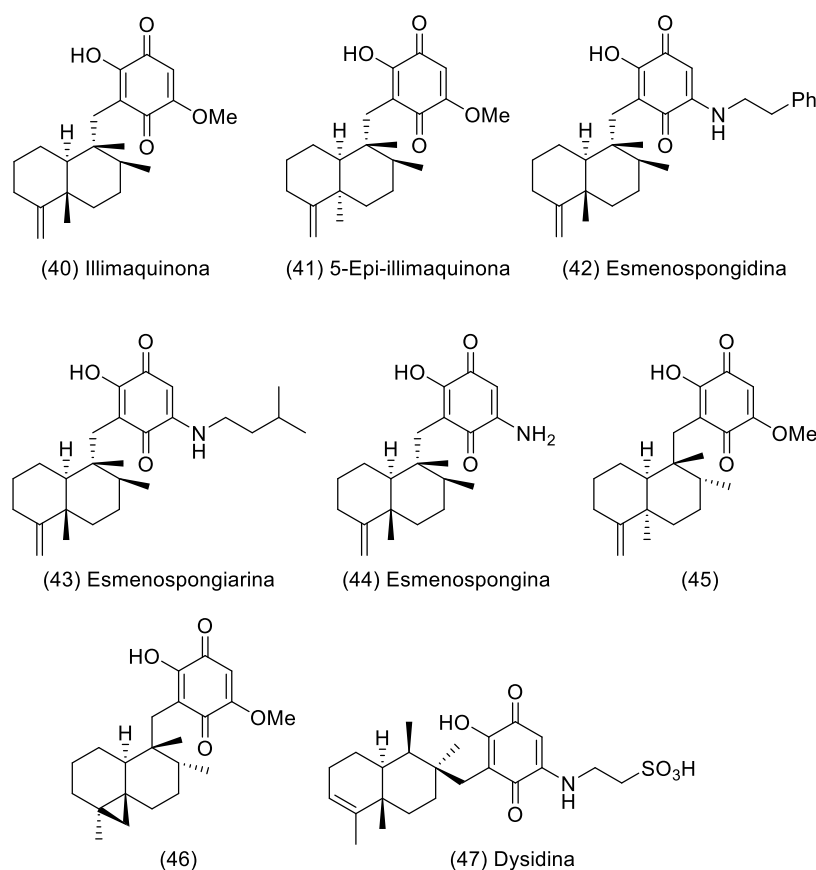


Figura 19 (cont.). Sesquiterperquinonas sustituidos en la posición 3' y 6'.

Tabla 7. Actividad de sesquiterpenoides sustituidos en la posición 3' y 6' sobre el anillo de quinona.

Compuesto	Organismo	Actividad	Ref
33, 34		Citotoxicidad frente a L1210 y KB y actividad antifúngica contra <i>Candida albicans</i> y <i>Aspergillus niger</i>	[23]
35, 36	<i>Spongiidae sp.</i>	Citotoxicidad frente a L1210 con IC ₅₀ de 5.8 µg/mL y 8.1 µg/mL respectivamente Citotoxicidad frente a KB con IC ₅₀ de 6.2 y 1.2 µg/mL respectivamente	[24]
37, 38		Citotoxicidad frente a L1210, KB y HER2	[25]
39		Citotoxicidad frente a <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Candida albicans</i> y <i>Aspergillus niger</i> con CMI 8.35, 8.35 y 16.7 µg/mL respectivamente	[26]
40	<i>Hippospongia sp</i>	Citotoxicidad frente a V79 (IC ₅₀ 0.6 µmol/L), Cdc25B (IC ₅₀ 92 µM), P-388, KB-16, A549 y A2780 (IC ₅₀ 10.9 µM). Actividad inhibitoria sobre la DNA polimerasa β (IC ₅₀ 45.2 µM), activación del factor HIF-1 y aumento de la expresión de VEGF	[27] [29]

Tabla 7 (Cont.) Actividad de sesquiterpenquinonas sustituidos en la posición 3' y 6'.

Compuesto	Organismo	Actividad	Ref
41-44	<i>Hippospongia sp.</i>	- Citotoxicidad frente a V79 con IC ₅₀ de 2.8, 0.6, 1.7 y 0.8 µmol/L respectivamente - 41 presenta actividad citotóxica frente a crustáceos del género <i>Artemia</i> (LD ₅₀ 18 ppm), antibiótica sobre <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>S. aureus</i> resistente a meticilina y <i>Enterococcus faecium</i> resistente a la vancomicina (LD ₅₀ 31.3, 62.5 y 15.6 µg/mL respectivamente) y antifúngica sobre <i>Candida albicans</i> resistente a la anfotericina (LD ₅₀ 125 µg/mL)	[28]
45-46	<i>Dactylospongia elegans</i>	Activación del factor HIF-1 y aumento de la expresión de VEGF	[29]
47	<i>Dysidea villosa</i>	- Activación de la vía de señalización de la insulina, aumento de la captación de glucosa y disminución de la resistencia a la insulina - Antiinflamatoria por inhibición de fosfolipasa A2 y 5-lipoxigenasa - Antitumoral por inducción del daño en ADN, bloqueo de tubulina e inhibición de proteínas quinasas	[30]

d. Sesquiterpenquinonas resultantes de la fusión del esqueleto sesquiterpénico con el anillo de quinona

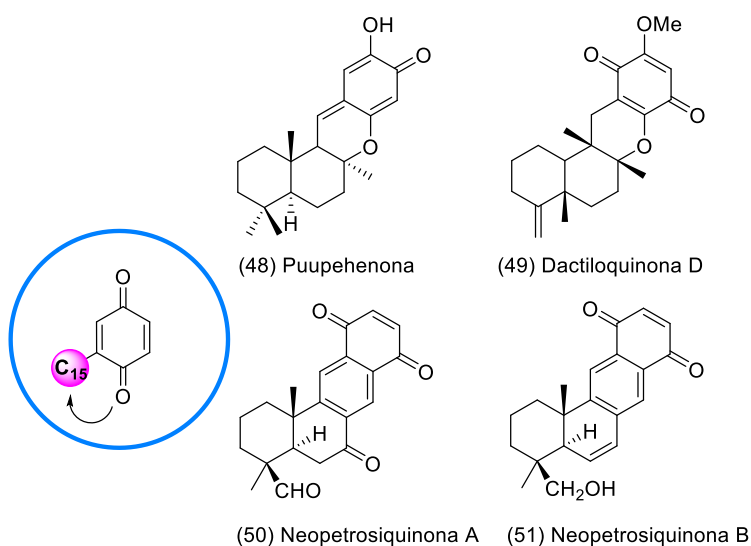
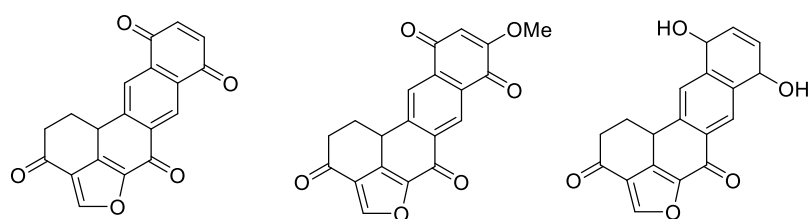


Figura 20. Sesquiterpenquinonas con anillo quinónico fusionado.



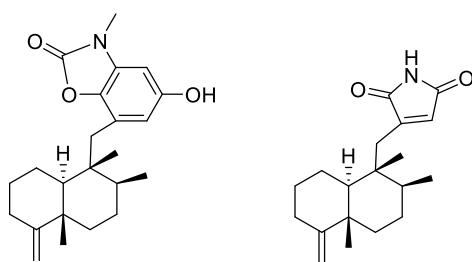
(52) Helenaquinona (53) 14-metoxi-helenaquinona (54) Helenaquinol

Figura 20 (cont.). Sesquiterpenquinonas con anillo quinónico fusionado.

Tabla 8. Actividad de sesquiterpenoides policíclicos.

Compuesto	Organismo	Actividad	Ref
48	<i>Chondrosia chucalla</i> y esponjas de las especies <i>Heteronema</i> , <i>Hyrtilis</i> y <i>Strongylophora</i> .	- Citotoxicidad frente a P-388, A-549 y MCF-7	[31]
		- Inhibición de la diferenciación de células endoteliales y del crecimiento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en un 99 % (CMI 12.5 mg/mL y IC ₅₀ 2.0 mg/mL)	[32] [33] [34]
		- Potenciación de la actividad de la caspofungina	
49	<i>Smenospongia cerebriformis</i>	Citotoxicidad frente a LU-1, HL-60, SK-Mel-2, HepG-2 y MCF-7 (IC ₅₀ 0.7-1.6 µg/mL)	[35]
50-51	<i>Neopetrosia próxima</i>	Citotoxicidad frente a líneas celulares tumorales de mama, pulmón y colon por inducción de apoptosis	[36]
52-54	<i>Xestospongia cf. carbonaria</i>	Inhibitoria sobre PTK (CI ₅₀ < 10 µM)	[37]

e. Misceláneos



(55) Disicigonio A

(56) Disidinoide B

Figura 21. Misceláneos.

Tabla 9. Actividad de los compuestos 55 y 56.

Compuesto	Organismo	Actividad	Ref
55-56	<i>Dysidea septosa</i>	Antiinflamatoria. 56 destaca por presentar valores de IC ₅₀ 9.15 µM y 17.52 µM frente a IL-6 y TNF-α respectivamente y actividad in vivo en el pez cebra	[38]

5. Conclusiones

- A partir de las formas oxidadas de los sesquiterpenos aislados del alga roja *L. johnstonii* se han diseñado y sintetizado compuestos con actividad antileishmania, como es el compuesto A.
- Los resultados de actividad del compuesto A demostraron la efectividad del diseño, ya que presenta una actividad frente a *L. amazonensis* de $IC_{50} = 625$ nM y un SI de 37.6, superando el mostrado por miltefosina, uno de los fármacos de referencia.
- La revisión bibliográfica sobre sesquiterpenos marinos refleja que son muy pocos los metabolitos que presentan actividad antileishmania.
- Además, de la información bibliográfica se desprende la importancia del anillo de quinona en metabolitos que muestran actividades biológicas.
- Los problemas de suministro y la complejidad de las estructuras de este tipo de compuestos hacen de la síntesis química una herramienta que permite obtener análogos más simples igualmente eficaces.

6. Referencias bibliográficas

1. World Health Organization. Neglected tropical diseases. 2020. Disponible en: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/
2. Oryan A. Plant-derived compounds in treatment of leishmaniasis. Iranian J Vet Res. Shiraz University. 2015;16(1):1-19.
3. Geordiadou SP, Makaritsis KP, Dalekos GN. Leishmaniasis revisited: Current aspects on epidemiology, diagnosis and treatment. J Trans Intern Med. 2016;3(2):43-50.
4. Rodrigues IA, Mazotto AM, Cardoso V, Alves RL, Amaral AC, Silva JR, Pinheiro AS, Vermelho AB. Natural Products: Insights into leishmaniasis inflammatory response. Mediators Inflamm. 2015;2015:1-12.
5. Leyva E, Loredó Carrillo SE, López LI, Escobedo Avellana E, Navarro Toar G. Importancia química y biológica de naftoquinonas. Revisión bibliográfica. Afinidad. 2017;74(577):36-50.
6. Casado Hernández I, Mora González N, Ferrer Carmenates G, Fernández Torres S, Pino Blanco D. Citotoxicidad in vitro y potencialidades de los compuestos quinoides como agentes antitumorales. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter. 2016;32(1).
7. Ibacache J, Faundes J, Montoya M, Mejías S, Valderrama J. Preparation of novel homodimers derived from cytotoxic isoquinolinequinones. A twin drug approach. Molecules. 2018;23(2):439.
8. García Davis S, Sifaoui I, Reyes Batlle M, Viveros Valdez E, Piñero JE, Lorenzo Morales J, et al. Anti-acanthamoeba activity of brominated sesquiterpenes from *Laurencia johnstonii*. Mar Drugs. 2018;16(11):443.
9. Kilway KV. Friedel-Crafts alkylation: 1,4-dimethoxybenzene and biphenyl. Department of Chemistry, University of Missouri. 2007;14(5):688-692.
10. Gul W, Hammond NL, Yousaf M, Peng J, Holley A, Hamann MT. Chemical transformation and biological studies of marine sesquiterpene (S)-(+)-curcuphenol and its analogs. Biochim Biophys Acta - Gen Subj. 2007;1770(11):1513-9.
11. Savoia D, Avanzini C, Alice T, Callone E, Guella G, Dini F. Antimicrobial activity of euplotin C, the sesquiterpene taxonomic marker from the marine ciliate *Euplotes crassus*. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48(10):3828-33.
12. Von Salm JL, Wilson NG, Vesely BA, Kyle DE, Cuce J, Baker BJ. Shagenes A and B, new tricyclic sesquiterpenes produced by an undescribed antarctic octocoral. Org Lett. 2014;16(10):2630-3.
13. Imperatore C, Gimmelli R, Persico M, Casertano M, Guidi A, Saccoccia F, et al. Investigating the antiparasitic potential of the marine sesquiterpene avarone, its reduced form avarol, and the novel semisynthetic thiazinoquinone analogue thiazoavarone. Mar Drugs. 2020;18(2):240-252.
14. Tsoukatou M, Maréchal J, Hellio C, Novaković I, Tufegdžić S, Sladić D, et al. Evaluation of the activity of the sponge metabolites avarol and avarone and their

- synthetic derivatives against fouling micro- and macroorganisms. *Molecules*. 2007;12(5):1022–34.
15. Luo X, Li P, Wang K, de Voogd NJ, Tang X, Li G. Cytotoxic sesquiterpenoid quinones from South China Sea sponge *Dysidea* sp. *Nat Prod Res*. 2019.
 16. Božić T, Novaković I, Gašić MJ, Juranić Z, Stanojković T, Tufegdžić S, et al. Synthesis and biological activity of derivatives of the marine quinone avarone. *Eur J Med Chem*. 2010;45(3):923–9.
 17. Jiao WH, Xu TT, Gu B Bin, Shi GH, Zhu Y, Yang F, et al. Bioactive sesquiterpene quinols and quinones from the marine sponge *Dysidea avara*. *RSC Adv*. 2015;5(106):87730–8.
 18. Pejin B, Iodice C, Tommonaro G, Bogdanovic G, Kojic V, De Rosa S. Further in vitro evaluation of cytotoxicity of the marine natural product derivative 4'-leucine-avarone. *Nat Prod Res*. 2014;28(5):347–50.
 19. Alvi KA, Diaz MC, Crews P, Slate DL, Lee RH, Moretti R. Evaluation of New Sesquiterpene quinones from two *Dysidea* sponge species as Inhibitors of protein tyrosine kinase. *J Org Chem*. 1992;57(24):6604–7.
 20. Li J, Wu W, Yang F, Liu L, Wang S-P, Jiao W-H, et al. Popolohuanones G - I, Dimeric sesquiterpene quinones with IL-6 inhibitory activity from the marine sponge *Dactylosporgia elegans*. *Chem Biodivers*. 2018;15(6):e1800078.
 21. Fu Y, Wu P, Xue J, Li H, Wei X. Myrothecols G and H, two new analogues of the marine-derived quinone sesquiterpene penicilliumin A. *Mar Drugs*. 2015;13(6):3360–7.
 22. Diaz-Marrero AR, Austin P, Van Soest R, Matainaho T, Roskelley CD, Roberge M, et al. Aminosol, a meroterpenoid-nucleoside conjugate with antiinvasion activity isolated from the marine sponge *Dysidea* sp. *Org Lett*. 2006;8(17):3749–52.
 23. Shigemori H, Madono T, Sasaki T, Mikami Y, Kobayashi J. Nakijiquinones A and B, new antifungal sesquiterpenoid quinones with an amino acid residue from an Okinawan marine sponge. *Tetrahedron*. 1994;50(28):8347–54.
 24. Kobayashi J, Madono T, Shigemori H. Nakijiquinones C and D, new sesquiterpenoid quinones with a hydroxy amino acid residue from a marine sponge inhibiting c-erbB-2 kinase. *Tetrahedron*. 1995;51(40):10867–74.
 25. Takahashi Y, Kubota T, Ito J, Mikami Y, Fromont J, Kobayashi J. Nakijiquinones G-I, new sesquiterpenoid quinones from marine sponge. *Bioorganic Med Chem*. 2008;16(16):7561–4.
 26. Takahasbi Y, Ushio M, Kubota T, Yamamoto S, Fromont J, Kobayashi J. Nakijiquinones J-R, sesquiterpenoid quinones with an amine residue from okinawan marine sponges. *J Nat Prod*. 2010;73(3):467–71.
 27. Oda T, Wang W, Fujita A, Mochizuki M, Ukai K, Namikoshi M. Promotion of IL-8 production in PMA-stimulated HL-60 cells by sesquiterpene quinones from a marine sponge, *Hippospongia* sp. *J Nat Med*. 2007;61(4):434–7.
 28. Kumar R, Subramani R, Aalbersberg W. Three bioactive sesquiterpene quinones from the Fijian marine sponge of the genus *Hippospongia*. *Natural product research*, 27(16), 1488–1491.

29. Du L, Zhou YD, Nagle DG. Inducers of hypoxic response: Marine sesquiterpene quinones activate HIF-1. *J Nat Prod.* 2013;76(6):1175–81.
30. Zhang Y, Li Y, Guo YW, Jiang HL, Shen X. A sesquiterpene quinone, dysidine, from the sponge *Dysidea villosa*, activates the insulin pathway through inhibition of PTPases. *Acta Pharmacol Sin.* 2009;30(3):333–45.
31. Quideau S, Lebon M, Lamidey AM. Enantiospecific synthesis of the antituberculosis marine sponge metabolite (+)-Puupehenone. The arenol oxidative activation route. *Org Lett.* 2002;4(22):3975–8.
32. Ebrahim HY, El Sayed KA. Discovery of novel antiangiogenic marine natural product scaffolds. *Mar Drugs.* 2016;14(3).
33. Tripathi SK, Feng Q, Liu L, Levin DE, Roy KK, Doerksen RJ, et al. Puupehenone, a marine-sponge-derived sesquiterpene quinone, potentiates the antifungal drug caspofungin by disrupting Hsp90 activity and the cell wall integrity pathway. *mSphere.* 2020;5(1).
34. El Sayed KA, Bartyzel P, Shen X, Perry TL, Zjawiony JK, Hamann MT. Marine natural products as antituberculosis agents. *Tetrahedron.* 2000;56(7):949–53.
35. Huyen LT, Hang DT, Nhie NX, Tai BH, Anh HLT, Quang TH, et al. Sesquiterpene quinones and diterpenes from *Smenospongia cerebriformis* and their cytotoxic activity. *Nat Prod Commun.* 2017;12(4):477–8.
36. Chayboun I, Boulifa E, Mansour AI, Rodriguez-Serrano F, Carrasco E, Alvarez PJ, et al. First enantiospecific syntheses of marine merosesquiterpenes neopetrosiquinones A and B: Evaluation of biological activity. *J Nat Prod.* 2015;78(5):1026–36.
37. Alvi KA, Rodríguez J, Diaz MC, Moretti R, Wilhelm RS, Lee RH, et al. Protein tyrosine kinase inhibitory properties of planar polycyclics obtained from the marine sponge *Xestospongia cf. carbonaria* and from total synthesis. *J Org Chem.* 1993;58(18):4871–80.
38. Gui YH, Liu L, Wu W, Zhang Y, Jia ZL, Shi YP, et al. Discovery of nitrogenous sesquiterpene quinone derivatives from sponge *Dysidea septosa* with anti-inflammatory activity in vivo zebrafish model. *Bioorg Chem.* 2020;94.