

Vol. 25(6), 91-100 (2014)
doi: 10.4067/S0718-07642014000600012

Evaluación de la Actividad Antimalárica y Citotóxica de Estirilquinolinas obtenidas a partir de 8-Hidroxiquinaldina con Aldehídos Aromáticos

Omar L. Torres^{(1)*}, Roger D. Espinosa⁽¹⁾, Alex A. Saez⁽²⁾, Gilmar G. Santafé⁽³⁾

(1) Grupo de Investigación Desarrollo de Fármacos y Afines IDEFARMA, Universidad de Córdoba, Carrera 6 # 76-103, Montería, Colombia. (e-mail: omart2365@gmail.com; rdespinosa03@gmail.com)

(2) Grupo de Investigación en Biología y BioProcesos (CIBIOP). Universidad EAFIT, Carrera 49 N° 7 Sur-50, Medellín, Colombia (e-mail: asaez70@gmail.com)

(3) Grupo de Química de los Productos Naturales, Universidad de Córdoba, Carrera 6 # 76-103, Montería, Colombia. (e-mail: gsantafe@correo.unicordoba.edu.co)

* Autor a quien debe dirigirse la correspondencia

Recibido May. 12, 2014; Aceptado Jul. 18, 2014; Versión final recibida Ago. 24, 2014

Resumen

El presente estudio reporta la síntesis de cinco (*E*)-estirilquinolinas (Q.1, Q.2, Q.3, Q.5, Q.6) y tres derivados *O*-alquilados (Q.1a, Q.6a, Q.6b) y la evaluación de su actividad antimalárica y citotóxica *in vitro*. Para obtener las estirilquinolinas se empleó la reacción de condensación tipo Perkin a partir de 8-hidroxiquinaldina con aldehídos aromáticos. La actividad antimalárica se realizó empleando el método Radioisotópico con cepas FCB-2 de *Plasmodium falciparum* (resistente a la cloroquina) y para la actividad citotóxica se empleó el método del MTT con células HepG2. La mayoría de los compuestos mostraron ser activos antimaláricos. Los que presentan mayor actividad son el Q.3 (IC₅₀ 6.4 μM), y el Q.5 (IC₅₀ 10.8 μM) aunque todos mostraron ser citotóxicos a concentraciones superiores a 1 μg/mL. Las estructuras de estos compuestos se confirmaron empleando técnicas espectroscópicas de Infrarrojo y Resonancia Magnética Nuclear en una y dos dimensiones.

Palabras clave: estirilquinolinas, actividad antimalárica, reacción de Perkin, compuestos o-alquilados, citotoxicidad

Evaluation of Antimalarial and Cytotoxic Activity of Styrylquinolines obtained from 8-Hydroxyquinaldine with Aromatic Aldehydes

Abstract

This study reports the synthesis of five (*E*)-Styrylquinolines (Q.1, Q.2, Q.3, Q.5, Q.6) and three *O*-alkylated derivatives (Q.1a, Q.6a, Q.6b) and the evaluation of its antimalarial activity and cytotoxic *in vitro*. For Styrylquinolines Perkin condensation reaction type from 8-hydroxyquinaldine with aromatic aldehydes was used. Antimalarial activity was performed using the method Radioisotope with FCB-2 strains of *Plasmodium falciparum* (chloroquine-resistant) and for the cytotoxic activity the MTT method with HepG2 cells was employed. Most compounds showed to be active antimalarial. Those with higher activity were Q.3 (IC₅₀ 6.4 μM) and Q.5 (IC₅₀ 10.8 μM), although all of them were cytotoxic at concentrations above 1 μg / mL. The structures of these compounds were confirmed using infrared spectroscopy techniques and MRI in one and two dimensions.

Keywords: styrylquinolines, antimalarial, cytotoxicity, Perkin reaction, o-alkylated compounds

INTRODUCCIÓN

En los países tropicales y subtropicales del mundo son muy comunes enfermedades ocasionadas por parásitos, para solucionar este problema de salud pública se ha recurrido a diferentes alternativas terapéuticas, inicialmente al uso tradicional de fuentes naturales como las plantas, las cuales han sido utilizadas como agentes en el tratamiento de afecciones gastrointestinales, dermatológicas y respiratorias entre otras, atribuyéndole estas acciones farmacológicas a la presencia de metabolitos secundarios como flavonoides y alcaloides principalmente (Murillo et al., 2011). Enfermedades parasitarias como la Malaria, se han convertido en un problema de salud pública en gran parte del mundo, principalmente en países que se encuentran ubicados en regiones tropicales y subtropicales de nuestro planeta. Esta enfermedad es causada por un parásito del género *Plasmodium* y transmitida por la picadura de la hembra del mosquito *Anopheles*, la cual se reproduce en regiones que combinan factores como calor, humedad y vegetación óptimos para su desarrollo. La malaria es característica de naciones en vía de desarrollo, siendo este factor determinante para el mantenimiento de la enfermedad. (Informe OMS, 2012).

Las principales especies de *Plasmodium* que afectan al hombre son: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* y el más severo *Plasmodium falciparum*, que presenta la más alta tasa de morbilidad dentro de las enfermedades de este tipo y es la tercera causa de muertes por infección después de la tuberculosis y la infección por VIH/ SIDA (Lopez, 1988; Olumese, 2010). Se estima que anualmente se producen en el mundo entre 300 y 500 millones de casos de Malaria y se han reportado entre uno y tres millones de muertes por su causa, principalmente en niños menores de cinco años (Informe OMS, 2012). En Colombia, el 85% del territorio presenta condiciones que favorecen la transmisión de la enfermedad, encontrándose para el cierre de 2012 un total de 56,175 casos de malaria, 41817 (74,4%) correspondieron a *P vivax*, 13733 (24,4%) a *P falciparum*, 617 (1,1%) a la asociación y 8 (0,01%) a *P malariae*. (Instituto Nacional de Salud, 2012)

Para el tratamiento de la malaria se han empleado diferentes medicamentos (fig. 1) como la Quinina (I), que fue el primer antipalúdico utilizado, Quinidina (II), Mefloquina (III), Cloroquina (IV) y la Amodiaquina (V). Todos estos principios activos poseen el núcleo quinolínico en su estructura, el cual representa en gran parte la potente actividad antimalárica de estos compuestos. El empleo frecuente de estos medicamentos ha ocasionado una serie de limitaciones de tipo farmacológico, como la toxicidad variable, aunque el principal problema es el fenómeno de resistencia por parte del parásito. La selección de antimaláricos para un determinado caso de la malaria se basa en la especie de *Plasmodium* que participa, la gravedad de la enfermedad y el origen geográfico de la infección (Arango et al., 2006, Robledo et al., 2010).

Actualmente se han realizado estudios sobre quinolinas obtenidas de fuentes naturales o productos de síntesis evaluando sus actividades frente a diferentes agentes patógenos, comprobándose así la eficacia y efectividad de esta clase de compuestos. Por ejemplo, de *Galipea officinalis*, planta nativa de Venezuela se identificaron cuatro alcaloides perteneciente al grupo de las 2-arilquinolinas: Agustureine, Galipeine, Cuspareine y Galipinina, las cuales presentaron buena actividad antimalárica *in vitro* (Jacquemond-Collet, 2002). Así mismo Franck y colaboradores, 2005 reportaron el estudio la síntesis de 2-arilquinolinas, sustancias previamente aisladas de plantas, las cuales mostraron ser activas *in vitro* contra *Trypanosoma brucei*, *T. Cruzi*, *Leishmania infantum*, *L.amazonensis* y *Plasmodium falciparum*, además, resultaron ser potentes inhibidores *in vitro* del virus de inmunodeficiencia humana del tipo-1 (HIV-1) integrado. Por otro lado Saez et. Al., 2010 reportó la síntesis de estirilquinolinas y derivados reducidos presentado promisorio actividad contra tripomastigotes de *T. cruzi*.

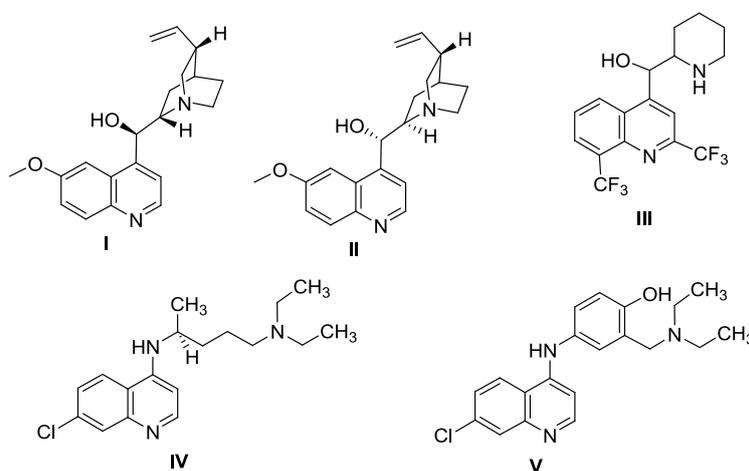


Fig. 1: Estructuras de algunas drogas antimaláricas de uso actual

Por todo lo anterior en el presente trabajo se evalúa la actividad antimalárica y citotóxica *in vitro* de 2- arilquinolinas, sintetizadas empleando la reacción de condensación tipo perkin entre 8- hidroxiquinaldina y los aldehídos aromáticos 4-isopropilbenzaldehído, piperonal, 2-cloro-3-quinolincarboxaldehído y 2,5-dimetoxibenzaldehído en presencia de anhídrido acético con posterior derivatización utilizando la reacción de eterificación de *Williamsom*, que puedan servir como nuevas y más eficaces alternativas terapéuticas en el tratamiento de esta enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la síntesis de las estirilquinolinas y los derivados O-alquilados se utilizaron los siguientes reactivos de alta pureza tipo Merck: 8-hidroxi-2-metil-quinolina, Acetona 4-isopropilbenzaldehído, piperonal, 2-cloro-3-carboxaldehído, 3,4-dimetoxibenzaldehído y 2,5-dimetoxibenzaldihído o, 1-bromooctano, 1-bromododecano y anhídrido acético. Las reacciones se monitorearon empleando cromatografía en capa fina sobre placas de sílica gel (Merck Kiesegel 60 F₂₅₄), utilizando como revelador el reactivo de Dragendorff. Las separaciones de los compuestos sintetizados se realizaron utilizando cromatografía en columna flash (CC) y cromatografía de capa delgada (CCDP), usando sílica gel 60 (0,063-0,200 mm) Merck como fase estacionaria. Los solventes utilizados para la extracción de los productos crudos y la purificación de los compuestos sintetizados son los siguientes: Acetato de etilo (AcOEt), Diclorometano (CH₂Cl₂), Metanol (MeOH), Etanol (EtOH), Bencina de petróleo, todos tipo comercial previamente destilados.

Los experimentos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ¹³C y ¹H, 2D COSY y HSQC se realizaron en dos espectrómetros Bruker de 300 y 400 MHz, utilizando como disolvente cloroformo deuterado (CDCl₃). Los espectros de infrarrojo (IR) se obtuvieron en un equipo Perkin-Elmer RX/FT-IR System, donde solo se reportaron las absorciones características. Los desplazamientos químicos (δ) están expresados en partes por millón (ppm) tomando como referencia el TMS y las constantes de acoplamiento (J) en Herzios (Hz).

Metodología de Síntesis de las (E)-Estirilquinolinas (Q.1- Q.6)

A una solución de 30 mmol de 8-hidroxi-2-metil-quinolina **I** en 50 mL de anhídrido acético, se le adicionó 40 mmol del correspondiente aldehído aromático **II** (fig. 2), la solución se calentó a reflujo por intervalos de tiempo que variaron entre 8 y 72 horas. La reacción fue monitoreada por cromatografía en capa delgada (CCD), al completar la reacción, la mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente, luego se le adicionó poco a poco una solución saturada de bicarbonato de sodio hasta hidrólisis completa. La mezcla se extrajo con tres porciones de 200 mL de una mezcla bencina de petróleo: acetato de etilo en proporción (1:2), la fase orgánica se secó con Sulfato de Sodio Anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida (Saez et al., 2010, Molano, 2004, Walker, 1951, Frank, 2005, Fakhfakh, 2001, Fakhfakh, 2003). El producto crudo se purificó por cromatografía en columna flash (CC), utilizando como eluyente mezcla de Bencina de petróleo : Acetato de etilo en proporciones variadas, obteniéndose las siguientes estirilquinolinas: 2-[(E)-2-(4-isopropilfenil) etenil]quinolin-8-il-acetato (Q.1), 2-[(E)-2-(3,4-metilendioxfenil)etenil]quinolin-8-ol (Q.2), 2-[(E)-2-(3'-2'-cloroquinolin)] etenil]quinolin-8-il-acetato (Q.3). 2-[(E)-2-(3,4-dimetoxifenil)etenil]quinolin-8-ol (Q.5), 2-[(E)-2-(2,5-dimetoxifenil)etenil]quinolin-8-ol (Q.6). (fig. 4).

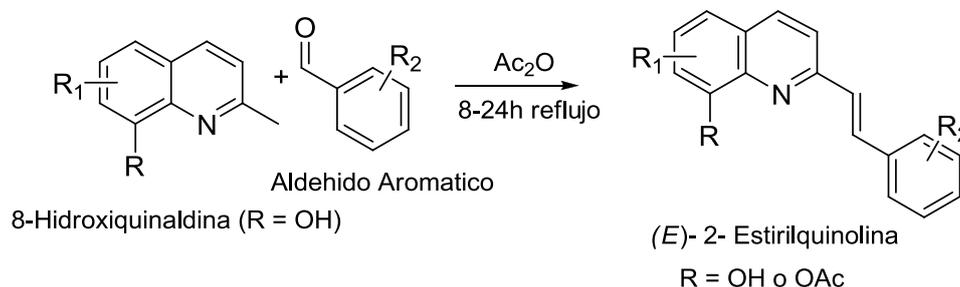


Fig. 2: Reacción General de la Reacción tipo Perkin.

Obtención de los Derivados O-alquilados Q.1a, Q.6a, Q.6b

A una solución de 0.1 g (0.3455 mmol) de estirilquinolina en 37 ml de acetona, se le adicionaron 0.6 g de K₂CO₃ y 0.2 g de KOH (Véase fig. 3), la solución se dejó agitando durante una hora, luego se le adicionaron 0.2 g de 1-bromooctano o 1-bromododecano según el caso. Se dejó a reflujo entre 6 y 8 horas, monitoreando periódicamente la reacción por CCD. Al completar la reacción, la mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente. Luego se evaporó la acetona a presión reducida, la mezcla se redisolvió en acetato

de etilo y se lavó con tres porciones de 50 ml de agua para remover el KOH y el K₂CO₃ presentes (Chaudhuri et al., 2007). La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y concentró a sequedad. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna (CC), utilizando un sistema bencina de petróleo : acetato de etilo en proporción (9:1); obteniéndose los correspondientes derivados O-Alquilados: 2-[(E)-2-(4-isopropilfenil)etenil]-8-(octiloxi) quinolina (Q.1a), 2-[(E)-2-(2,5-dimetoxifenil)etenil]-8-(octiloxi)quinolina (Q.6a) y 2-[(E)-2-(2,5-dimetoxifenil)etenil]-8-(dodecilo)quinolina (Q.6b). (Fig. 5)

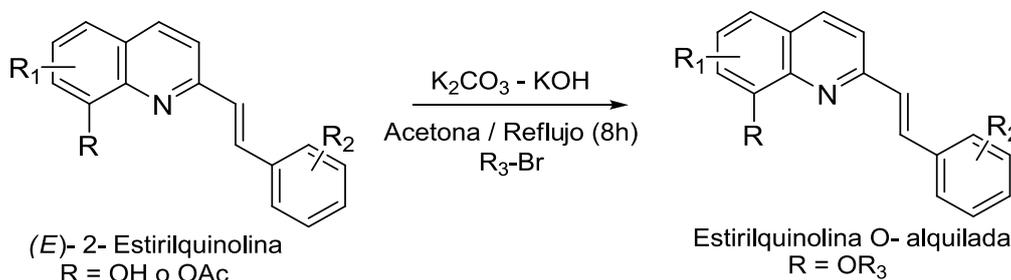


Fig. 3: Ruta sintética empleada para obtener los derivados O-alquilados

Ensayos de Actividad Antimalárica *in vitro* de los compuestos Sintetizados

Se utilizó el método Radioisotópico, el cual se basa en la medición indirecta de la actividad metabólica del parásito, por medio de la incorporación de un precursor de ácidos nucleicos marcado radiactivamente como es la Hipoxantina Triterada (³H). Los ensayos se realizaron sobre la cepa FCB-2 resistente a la cloroquina CQ-R de *Plasmodium falciparum*. (Trager, 1976, Desjardins, 1979). El ensayo se realizó en platos de 96 pozos, se evaluaron a 7 concentraciones de cada compuesto en un rango entre 100 µg/mL y 1.56 µg/mL. Cada concentración se evaluó por duplicado y se prepararon a partir de diluciones seriadas de una solución madre de 500 µg/mL. La concentración de DMSO en la primera dilución fue del 1% que se ha demostrado no ser tóxica para el parásito, como control de tratamiento se utilizó amodiaquina que fue evaluada también a 7 concentraciones en un rango entre 392 ng/mL y 6.13 ng/mL, preparadas a partir de una solución madre de 5 µM, en estos rango de concentraciones se conoce que hay una relación dosis respuesta y los porcentajes de inhibición del crecimiento están entre el 30% y el 80%. Inicialmente se colocaron 100 µL de la solución madre de cada compuesto en la fila H y se hacen diluciones seriadas en los pozos G-B, Por duplicado, con 50 µL/pozo. La fila A se toma como control negativo o de crecimiento (CN).

El resultado de actividad antimalárica se determinó mediante el cálculo del porcentaje de inhibición (%) de la parasitemia para cada concentración de cada compuesto en el cuál se compara el crecimiento de la parasitemia en presencia del compuesto con la parasitemia del control de crecimiento (control negativo). El porcentaje de inhibición se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - [(P/T) \times 100] \quad (1)$$

En esta ecuación *P* es el promedio de CPM en duplicado (cuentas por minuto) y nos dice que tan metabólicamente activo son a cada concentración y *T* es el control Negativo (Cultivo de Glóbulos Parasitados sin Droga)

El cálculo de la IC₅₀ (concentración inhibitoria media) se determinó a través de una interpolación logarítmica de la siguiente manera:

$$\text{Log (IC}_{50}) = \text{Log (X}_1) + [(50 - Y_1)/(Y_2 - Y_1)] (\text{Log X}_2 - \text{log X}_1) \quad (2)$$

En esta ecuación, X₁ es la concentración de la droga que da una inhibición de la parasitemia Y₁ > 50% y X₂ es la concentración de la droga que da una inhibición de la parasitemia Y₂ < 50%

Ensayo de Citotoxicidad *in vitro* de los Compuestos Sintetizados

La evaluación de la toxicidad de compuestos puede determinarse con la medición de la viabilidad y proliferación *in vitro* de la línea celular HepG2 (células derivadas de hepatoblastoma humano), como modelo para evaluar el potencial efecto tóxico sobre los hepatocitos, que constituyen la primera célula hospedera para *Plasmodium* en el humano y la única célula que invade el parásito en este hospedero con capacidad de dividirse. El método se fundamenta en la reducción del bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) descrito por Mosmann (1983), el cual revela daños celulares a nivel mitocondrial.

El MTT de color amarillo es reducido por las células metabólicamente activas, en parte por la acción de enzimas deshidrogenasas, generando equivalente reducidos tales como NADH y NADPH que dan como resultado la formación de cristales de formazán, un compuesto de coloración violeta que es solubilizado y cuantificado por espectrofotometría a 570nm (Bautista, 2000). Se contaron en una cámara nebulosa las células HepG2, y se sembraron en un plato de 96 pozos de fondo plano 100µl de una solución de 2×10^5 células/ml en medio completo al 10%. Se incubaron las células por 24 horas a 37°C en medio de CO₂ al 5%, se formó una monocapa, se descarta el medio y que se lavó con solución salina 0.85%. Se preparó una solución stock de cada compuesto a una concentración de 20mg/ml en DMSO al 96% (2 mg de cada compuesto en 100 µL de DMSO) en medio DMEM F-12 completo (10% de suero fetal bovino), se prepararon diluciones seriadas a partir de la solución stock, para obtener las concentraciones a evaluar de cada compuesto: 400 µg/mL, 100µg/mL, 10µg/mL y 1µg/mL.

Se agregaron 100 µL de cada una de las concentraciones por triplicado (previamente preparadas) en los pozos. Se incubaron los platos durante 48h a 37°C. Posteriormente se eliminó el medio y se lavó dos veces con solución salina 0.85%. Se adicionó 30 µL/plato de MTT a una concentración de 2 mg/mL y posterior incubación durante 4 horas, se eliminó el sobrenadante con cuidado y se le agregó 130 µL de DMSO al 96%. Por último se incubaron los platos durante 20 min a temperatura ambiente y se mezclaron suavemente para permitir que los cristales de MTT se disuelvan. Se leyó la absorbancia de cada pozo a 570 nm. El efecto tóxico se determinó al comparar la absorbancia obtenida en el control con la de los tratamientos y determina de esta forma, si hubo o no un efecto tóxico. La medición de la actividad citotóxica se calculó mediante el índice de toxicidad (IT) con la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de Toxicidad} = \text{Abs del Tratamiento} / \text{Abs del Control} \quad (3)$$

El valor de referencia para el índice de toxicidad es 1 y los derivados con valores mayores o iguales a 1 no presentan actividad citotóxica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron las siguientes estirilquinolinas: 2-[(E)-2-(4-isopropilfenil)etenil]quinolin-8-il-acetato (Q.1), 2-[(E)-2-(3,4-metilendioxfenil)etenil]quinolin-8-ol (Q.2), 2-[(E)-2-[3'-(2'-cloroquinolin)] etenil]quinolin-8-il-acetato (Q.3), 2-[(E)-2-(3,4-dimetoxifenil)etenil]quinolin-8-ol (Q.5), 2-[(E)-2-(2,5-dimetoxifenil)etenil]quinolin-8-ol (Q.6), con rendimientos de 16.4%, 1.4%, 3.11%, (fig. 4).

Los derivados O-alkilados Q.1a, Q.6a y Q.6b (fig. 5) se obtuvieron empleando la reacción de eterificación de *Williamson* entre la estirilquinolina y 1-Bromooctano, 1-Bromododecano. Siguiendo la metodología de síntesis de los derivados O-alkilados descrita anteriormente. Todos estos compuestos fueron caracterizados por técnicas espectroscópicas de Resonancia Magnética Nuclear, RMN-¹H y RMN-¹³C, los experimentos bidimensionales COSY y HMQC, así como también espectros de Infrarrojo. La Tabla 1 muestra los datos espectroscópicos de los compuestos sintetizados.

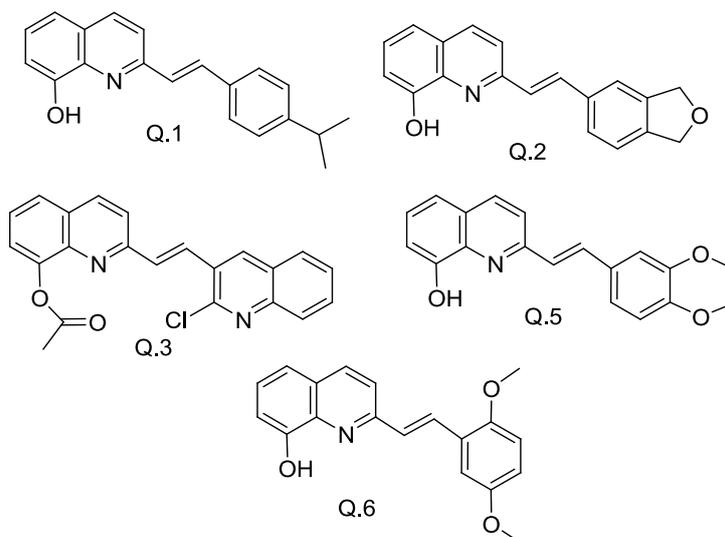


Fig. 4: Estirilquinolinas sintetizadas

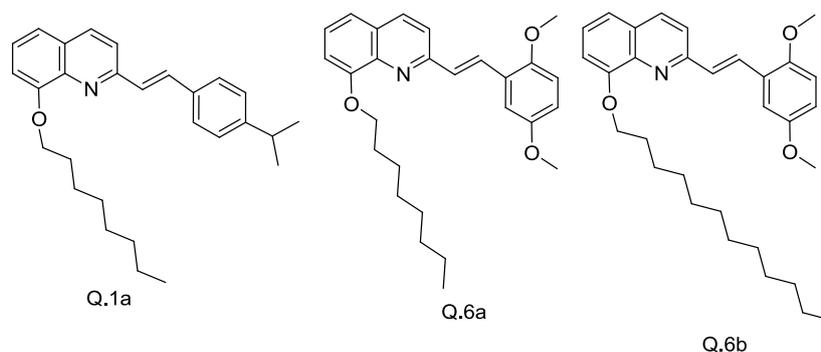


Fig. 5: Derivados O-alkilados

Tabla 1: Datos espectroscópicos de los compuestos sintetizados

Compuesto	Descripción
2-[(E)-2-(4-isopropilfenil)etenil]quinolin-8-il-acetato. (Q.1):	Sólido Blanco, Rendimiento de 16.4%, IR v (cm ⁻¹). 3056-3000; 2942-2833; 2362-2253; 1632; 1613-1496; 1380, 1130; 1207.22; 904; 723. RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 300MHz): 2.42 (s, 3H; CH ₃); 1.15 (d, J=6.94Hz, 6H 2xCH ₃); 2.79 (sept., 1H, CH); 7.12 (d, J=7.85 Hz, 2H); 7.40 (d, J=7.85 Hz, 2H); 7.15 (d, J=16.0 Hz, 1H); 7.51 (d, J=16.0 Hz, 1H); 7.47 (d, J=8.6 Hz, 1H); 7.93(d, J=8.6 Hz, 1H); 7.52 (d, J=7.8. Hz, 1H); 7.27 (d, J=7.8. Hz, 1H); 7.30 (t, J=7.8. Hz, 1H). RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 75MHz): 20.9 (CH ₃); 23.8 (2xCH ₃); 33.9 (CH); 133.5(C1''); 126.7 (C2'' y C6''); 126.2 (C3'' y C5''); 149.1(C4''); 127.5 (C-1'); 135.6 (C-2'); 155.4 (C-2); 120.9 (C-3); 134.1 (C-4); 127.9 (C4a); 124.9 (C-5); 126.7 (C-6); 119.5 (C-7); 140.4(C-8) 146.7 (C8a); 169.2 (C=O).
2-[(E)-2-(3,4-metilendioxfenil)etenil]quinolin-8-ol. (Q.2):	Sólido amarillo, rendimiento de 1.4%, IR v (cm ⁻¹): 3380.26; 3056-3000; 2942; 2850; 2000-1700; 1561-1448.83; 1257.11. RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 400MHz): 6.01 (s, 2H; CH ₂); 6.84(d, J=8.6 Hz, 1H); 7.07 (dd J=8.6, 2.5 Hz, 1H); 7.13 (d, J=2.5Hz, 1H); 7.62 (d, J=16.0 Hz, 1H); 7.16 (d, J=16 Hz, 1H); 7.57(d, J=8.6 Hz, 1H); 8.08 (d, J=8.6 Hz, 1H); 7.27 (d, J=7.8. Hz, 1H); 7.37 (t, J=7.8. Hz, 1H); 7.15 (d, J=7.8. Hz, 1H). RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 100MHz): 101.3 (CH ₂);130.9 (C1''); 122.8 (C6''); 151.9 (C3''); 146.7 (C4'') 108.5 (C5'');110.0 (C2''); 134.0(C-1'); 105.9 (C-2'); 155.4 (C-2); 120.3 (C-3); 136.3 (C-4); 127.9 (C4a); 117.6 (C-5); 127.0 (C-6); 126.2 (C-7); 140.4(C-8); 146.7 (C8a).
2-[(E)-2-[3'-(2'-cloroquinolin)etenil]quinolin-8-il-acetato. (Q.3):	Cristales Blancos, rendimiento de 3.11%, IR v (cm ⁻¹): 3100, 3000; 2920; 2000-1600; 1650; 1758.62; 1203.58; 1038.37; 969.15. RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 400MHz): 2.60(s, 3H; CH ₃);8.49 (s, 1H); 7.85 (d, J=7.28, 1H); 7.58 (t, J=7.0, 1H); 7.72 (t, J=8.50, 1H); 8.00 (d, J=8.50, 1H); 8.17 (d, J= 16.00, 1H); 7.40 (d, J=16.00, 1H); 8.15 (d, J=8.56, 1H); 7.65 (d, J= 8.56, 1H); 7.44 (d, J=7.10, 1H); 7.67 (t, J=7.10, 1H); 7.46 (d, J=7.10, 1H). RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 100MHz): 20.30 (CH ₃); 169.20 (C=O); 128.0 (C3''); 134.33 (C4''); 128.33 (C4a''); 127.70 (C5''); 127.40 (C6''); 130.60 (C7''); 128.25 (C8''); 149.51 (C8a''); 140.16 (C2''); 129.15 (C1'); 132.70 (C2'); 153.8 (C2); 120.60 (C3); 136.60 (C4), 127.90 (C4a); 120.00 (C5); 127.1(C6); 126.60 (C7); 140.2 (C8); 146.8 (C8a).
2-[(E)-2-(3,4-dimetoxifenil)etenil]quinolin-8-ol (Q.5):	Sólido amarillo, rendimiento de 20%, IR v (cm ⁻¹): 3431.23; 3056; 3000; 2942; 2850; 2000-1700; 1600; 1490; 1200. RMN- ¹ H δ(ppm): 3.92 (s, 3H; OCH ₃); 3.93 (s, 3H; OCH ₃); 6.90(d, J=8.5 Hz, 1H; 5''); 7.17 (dd J=8.5, 2.5Hz, 1H; 6''); 7.18 (d, J=2.5 Hz, 1H; 2''); 7.66 (d, J=16.0 Hz, 1H; 1'); 7.21 (d, J=16 Hz, 1H; 2'); 7.62(d, J=8.6 Hz, 1H; 3); 8.09 (d, J=8.6. Hz, 1H; 4); 7.27 (d, J=7.8. Hz, 1H; 5); 7.37 (t, J=7.8. Hz, 1H; 6); 7.15 (d, J=7.8. Hz, 1H; 7). RMN- ¹³ C (ppm): 56.0 (OCH ₃); 55.8 (OCH ₃); 129.3(C1''); 109.0(C2''); 149.8 (C3''); 149.1 (C4''); 111.1 (C5''); 121.1 (C6''); 134.1 (C-1'); 126.1 (C-2'); 151.9 (C-2); 120.2 (C-3); 136.2 (C-4); 127.2 (C4a); 117.6 (C-5); 127.0 (C-6); 110.0 (C-7); 153.8 (C-8); 137.9 (C8a).
2-[(E)-2-(2,5-dimetoxifenil)etenil]quinolin-8-ol. (Q.6):	Sólido amarillo, rendimiento de 32%, IR v (cm ⁻¹): 3408.57; 3056-3000; 2942; 2850; 1598,1420; 1213.74. RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 400MHz): 3.73 (s, 3H; OCH ₃); 3.77 (s, 3H; OCH ₃); 6.94 (d, J=8.5 Hz, 1H); 6.76 (dd J=8.5, 2.5Hz, 1H); 6.76 (d, J=2.5Hz, 1H); 7.82 (d, J=16.0 Hz, 1H); 7.43 (d, J=16 Hz, 1H); 7.73 (d, J=8.6 Hz, 1H); 7.96 (d, J=8.6 Hz, 1H); 7.27 (d, J=7.8. Hz, 1H); 7.22 (t, J=7.8. Hz, 1H); 7.16 (d, J=7.8. Hz, 1H). RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 100MHz): 55.3 (OCH ₃); 55.7 (OCH ₃); 126.0 (C1''); 154.1 (C2''); 115.3 (C3''); 112.3 (C4''); 152.0 (C5''); 111.9 (C6''); 136.2 (C-1'); 127.05 (C-2'); 151.9 (C-2); 120.2 (C-3); 137.9 (C-4); 127.3 (C4a); 117.6 (C-5); 127.1 (C-6); 109.9 (C-7); 153.6 (C-8); 137.9 (C8a).

Tabla 1: Datos espectroscópicos de los compuestos sintetizados (Continuación)

2-[(E)-2-(4-isopropilfenil)etenil]-8-(octiloxi)quinolina. (Q.1a):	Líquido viscoso, rendimiento de 67%, IR v (cm ⁻¹): 3056-3000; 2942, 2833; 2362; 1613-1496; 1200; 904, 723 (C-H); 500. RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 300MHz): 1.29 (d, J=6.98 Hz, 6H; 2xCH ₃); 2.94 (sept., 1H; CH); 7.27 (d, J=7.85 Hz, 2H); 7.58 (d, J=7.85 Hz, 2H); 7.47 (d, J=16.0 Hz, 1H); 7.64 (d, J=16.0 Hz, 1H); 7.71 (d, J=8.6 Hz, 1H); 8.08(d, J=8.6 Hz, 1H); 7.34 (d, J=7.8. Hz, 1H); 7.06 (d, J=7.8. Hz, 1H); 7.39 (t, J=7.8. Hz, 1H). RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 75MHz): 23.8 (CH ₃ x2); 33.9 (CH); 134.3(C1''); 127.2 (C2'' y C6''); 126.8 (C3'' y C5''); 154.7(C-4''); 129.2 (C-1'); 136.1 (C-2'); 149.4 (C-2); 126.1 (C-3); 133.6 (C-4); 128.4 (C4a); 119.2 (C-5); 128.8 (C-6) ; 109.3 (C-7); 155.1(C-8); 140.3 (C8a). GRUPO ALQUÍLICO: 4.26 (t, 2H); 2.08 (m, 2H); 1.58 (m, 2H); 1.28-1.41 (m, 8H).0.89 (t, 3H). RMN- ¹³ C 14.0 C-8(CH ₃); 22.6 C-7 (CH ₂); 31.8 C-6 (CH ₂); 28.9 C-5 (CH ₂); 29.2 C-4 (CH ₂); 26.0 C-3 (CH ₂); 29.4 C-2 (CH ₂); 69.2 C-1 (CH ₂).
2-[(E)-2-(2,5-dimetoxifenil)etenil]-8-(octiloxi)quinolina. (Q.6a):	Líquido viscoso, rendimiento de 24.4%, IR v (cm ⁻¹): 3050-3000; 2927.13; 2855.20; 1220.76; 1600.19, 1555.47; 520. RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 300MHz): 3.75 (s,3H; CH ₃); 3.79(s,3H; CH ₃); 6.96 (s, J=8.50, 1H); 6.77 (dd, J=8.50, 2.5, 1H); 6.77 (d, J=2.5, 1H); 7.85 (d, J=16.00, 1H); 7.45 (d, J=16.00, 1H); 7.75 (d, J=8.66, 1H); 7.99 (d, J=8.66, 1H); 7.29 (d, J=7.8, 1H); 7.30 (t, J=7.8, 1H), 7.24 (d, J=7.8, 1H). RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 75MHz): 55.10 (OCH ₃); 54.70 (OCH ₃); 126.70 (C1''); 154.40 (C2''); 114.40 (C3''); 111.30 (C4''); 152.60 (C5''); 110.10 (C6''); 136.50(C-1'); 126.9 (C-2'); 152.60 (C-2); 125.10 (C-3); 139.10 (C-4); 127.30 (C4a); 117.70 (C-5); 127.30 (C-6); 110.10 (C-7); 153.60 (C-8); 139.90 (C8a). GRUPO ALQUÍLICO: 4.17 (t, 2H); 1.97 (m, 2H); 1.46 (m, 2H), 1.35-1.14 (m, 8H); 0.79 (t, 3H). RMN- ¹³ C 68.10 C-1(CH ₂); 32.30 C-2 (CH ₂); 29.90 C-3 (CH ₂); 29.70 C-4 (CH ₂); 29.40 C-5 (CH ₂); 26.50 C-6 (CH ₂); 23.10 C-7 (CH ₂); 14.60 C-8 (CH ₃).
2-[(E)-2-(2,5-dimetoxifenil)etenil]-8-(dodeciloxi)quinolina. (Q.6b):	Líquido viscoso, rendimiento de 12.5%, IR v (cm ⁻¹): 3020-3000; 2925.44; 1853.77; 1221.47; 1600.00; 500. RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 300MHz): 3.75 (s,3H); 3.79 (s,3H); 6.97 (s, J=8.50, 1H); 6.78 (dd, =8.50, 2.5, 1H); 6.78 (d, J=2.5, 1H); 7.85 (d, J=16.00, 1H); 7.45(d, J=16.00, 1H); 7.75 (d, J=8.66, 1H); 7.98 (d, J=8.66, 1H); 7.29 (d, J=7.8, 1H); 7.30 (t, J=7.8, 1H), 7.24 (d, J=7.8, 1H). RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 75MHz): 55.50 (OCH ₃); 55.00 (OCH ₃); 125.60 (C1'');154.00 (C2''); 114.90 (C3''); 111.70 (C4''); 153.00 (C5''); 110.40 (C6''); 135.20 (C-1'); 125.60 (C-2'); 151.00 (C-2); 118.50(C-3); 135.20 (C-4); 127.30 (C4a); 118.00 (C-5); 127.80 (C-6); 108.50 (C-7); 153.00 (C-8); 139.50 (C8a). GRUPO ALQUÍLICO: 4.17 (t, 2H); 1.98 (m, 2H); 1.60 (m, 2H); 1.48-1.38 (m, 18H); 0.79 (t, 3H). RMN- ¹³ C:68.50 C-1 (CH ₂); 31.10 C-2 (CH ₂); 28.90 C-3 (CH ₂); 28.80 C-4 (CH ₂); 28.70 C-5 (CH ₂); 28.60 C-6 (CH ₂); 28.10 C-7 (CH ₂); 25.20 C-8(CH ₂); 21.90 (CH ₂); 13.30 C-12 (CH ₃).

Los resultados de la actividad antimalárica *in vitro* se pueden apreciar en la Tabla 2. La mayor parte de los compuestos mostraron buena actividad antimalárica, comparándose con el control positivo amodiaquina que presentó un IC₅₀ de 0.0345 µM, disminuyendo esta actividad en los derivados O-alkilados. Entre ellos, el compuesto Q.3 es el que presenta mejor actividad con un IC₅₀ de 6,4µM, esta actividad es comparada con la del alcaloide Galipinina aislado de la *Galipea officinalis* (Jacquemonnd-Collet, 2002) que mostró un IC₅₀ entre 0.24 y 6.12µM y cuya estructura es muy similar a la de los compuestos sintetizados en este trabajo, esta actividad puede deberse a la presencia de un grupo clorado es su estructura, así como a la presencia de dos anillos quinolínicos. Por su parte, los compuestos Q.1 , Q.5 y Q.6 también mostraron promisoría actividad reflejándose en los IC₅₀ de 15.4µM, 10.8µM, 16.9µM y respectivamente, los cuales resultaron ser más activos que los alcaloides sintetizados por Fakhfakh et al., 2003 que son de tipo 2-arilquinolina con IC₅₀ >30 µM. Los derivados O-alkilados Q.1a y Q.6b presentaron una baja actividad antimalárica con IC₅₀ de 144.1µM y 63.2 µM, respectivamente, comparado con el IC₅₀ del control amodiaquina que es de 0.0345µM.

Tabla 2: Concentraciones Inhibitorias 50 (IC₅₀) de los compuestos sintetizados. ND: No determinado; NP: No presenta Actividad

Compuestos	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µM)
Q.1	5,1	15.4
Q.2	ND	ND
Q.3	2.4	6.4
Q.5	3.3	10.8
Q.6	5.2	16.9
Q.1a.	57.8	144.1
Q.6a.	NP	NP
Q.6b	30	63.2
A.Q	0.01605	0.0345

Además de evaluar la actividad antimalárica, reflejada en los cálculos de IC_{50} , también se determinó la relación dosis-respuesta (véase Fig. 6 y 7), para establecer el comportamiento metabólico del parásito al aumentar progresivamente la concentración de los compuestos. Analizando las gráficas de relación dosis-respuesta de los productos de condensación (estirilquinolinas) (Fig. 6), se evidencia que todos presentan una buena relación dosis-respuesta, ya que se manifiesta una reducción significativa de las cuentas por minuto (CPM) al ir aumentando de manera progresiva la concentración de los compuestos, un comportamiento que es parecido al del control positivo amodiaquina (AQ).

Para los derivados O-alkilados Q.1a y Q.6b (Fig. 7) se logró evidenciar que hay variación significativa de las CPM solo a altas concentraciones, comportamiento que permite confirmar la baja actividad antimalárica que presentan estos compuestos reflejados en los IC_{50} . El derivado Q.6a, no presenta una variación significativa de CPM de los parásitos, esto permite decir que el compuesto no causa ningún efecto sobre el parásito. Este resultado está en concordancia con la evaluación antimalárica *in vitro* realizada sobre este compuesto que resultó negativa.

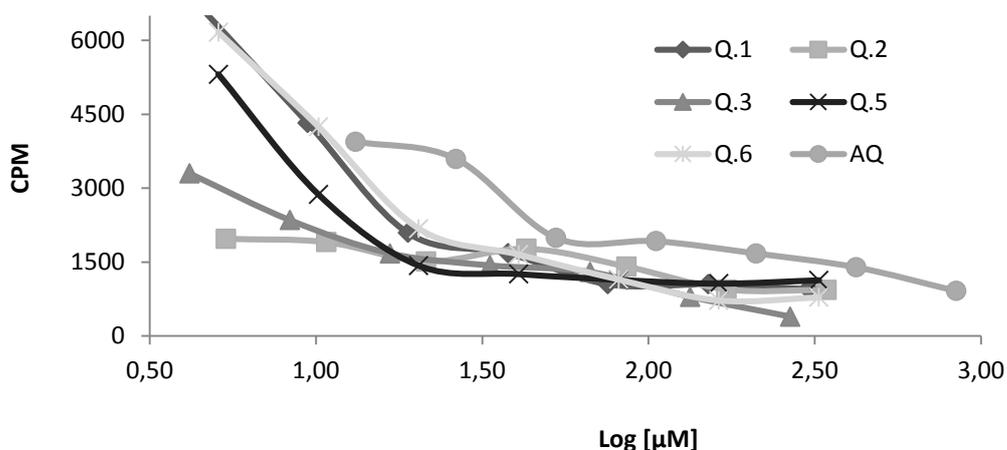


Fig. 6: Curva de relación Dosis Vs Respuesta de las estirilquinolinas

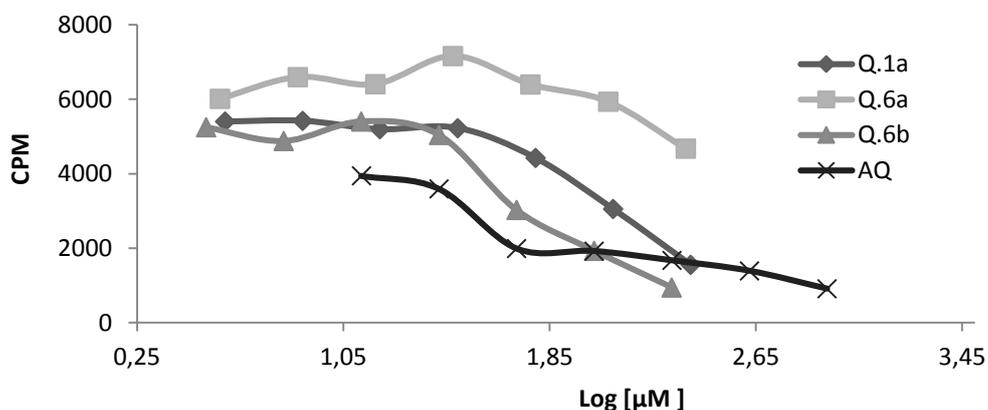


Fig. 7: Curva de relación Dosis Vs Respuesta de los derivados O-alkilados

La mayor parte de los compuestos sintetizados presentaron citotoxicidad a concentraciones superiores de 1 $\mu\text{g/mL}$ (valores de índice de toxicidad menores de la unidad), excepto el derivado Q.1a que presenta actividad citotóxica solo a concentraciones superiores de 100 $\mu\text{g/mL}$. Finalmente, debe resaltarse que los resultados obtenidos en este trabajo son promisorios y constituyen un pilar fundamental para seguir indagando y buscando en este tipo de compuestos soluciones para enfermedades como la malaria.

CONCLUSIONES

De las reacciones de condensación tipo Perkin se obtuvieron las siguientes estirilquinolinas: 2-[(*E*)-2-(4-isopropilfenil)etenil]quinolin-8-il-acetato (Q.1), 2-[(*E*)-2-(3,4-metilendioxfenil)etenil]quinolin-8-ol (Q.2), 2-[(*E*)-2-[3'-(2'-cloroquinolin)] etenil]quinolin-8-il-acetato (Q.3), 2-[(*E*)-2-(3,4-dimetoxifenil)etenil]quinolin-8-ol (Q.5),

2-[(E)-2-(2,5-dimetoxifenil)etenil]quinolin-8-ol (Q.6), con rendimientos de 16.4%, 1.4%, 3.2%, 20 y 32% respectivamente (fig. 4), y los derivados O-alkilados: (Q.1a) 2-[(E)-2-(4-isopropilfenil)etenil]-8-(octiloxi)quinolina, (Q.6a) 2-[(E)-2-(2,5-dimetoxifenil)etenil]-8-(octiloxi)quinolina y (Q.6b) 2-[(E)-2-(2,5-dimetoxifenil)etenil]-8-(dodeciloxi)quinolina con rendimientos de 67%, 24,4% y 12,5% respectivamente (Fig. 5)

Todos los productos de la condensación de tipo Perkin mostraron promisoria actividad antimalárica con IC₅₀ entre 6,4 µM y 16,9µM. Los derivados O-alkilados Q.1a y Q.6b presentaron una baja actividad antimalárica con IC₅₀ de 44.1µM y 63.2 µM respectivamente. Mientras que el derivado Q.6a no presentó actividad. De igual forma la mayor parte de los compuestos evaluados mostraron citotoxicidad a concentraciones superiores a 1µg/mL, a excepción del derivado O-alkilado 1a, que mostró citotoxicidad a concentraciones superiores de 100 µg/mL. Las estructuras de estos compuestos se corroboraron utilizando técnicas espectroscópicas de Resonancia Magnética Nuclear de RMN-¹H y RMN-¹³C, y en dos dimensiones 2D COSY y HSQC. e infrarrojo IR.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad de Córdoba por la financiación de la investigación y al profesor Diego Cortés de la Universidad de Valencia por la realización de los espectros de COSY y HMQC.

REFERENCIAS

- Arango, G. J., Osorio, E. J., Montoya, G. L., *Productos Naturales Alcaloidales con Actividad Antiprotozoaria*, VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica, 13 (1), 61-84 (2006).
- Bautista, R.; Acosta, E.; Toledo, I., *Evaluación del Bioensayo de MTT para Determinar la Proliferación in vitro de Linfocitos Bovinos Frescos y Congelados*, Revista Veterinaria de México, 31 (2), 101-106 (2000).
- Boletín Epidemiológico N° 50 de la Malaria en Colombia, Instituto Nacional de Salud, Organización Panamericana de la Salud. (2012). <http://www.paho.org/col/>. Acceso: 20 de Febrero (2014).
- Chaudhuri, P., Majumder, H. K., Bhattacharya, S., *Synthesis, DNA Binding, And Leishmania Topoisomerase Inhibition Activities of a Novel Series of Anthra(1,2-d)imidazole-6,11-dione Derivatives*. Journal of Medicinal Chemistry, 50 (10), 2536–2540 (2007).
- Desjardins, R.E., Canfield, C.J., Haynes, J.D y Chulay, J.D, *Quantitative Assessment of Antimalarial Activity in vitro by a Semiautomated Microdilution Technique*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 16 (6) 710-718 (1979).
- Fakhfakh, M. A., Franck, X., Fournet, A., Hocquemiller, R y Figadere, B, *Expedient Preparation of 2-Substituted Quinolines*, Tetrahedron Letters. 42 (23), 3847-3850 (2001).
- Fakhfakh, M. A., y otros 6 autores, *Synthesis and Biological Evaluation of Substituted Quinolines: Potencial Treatment of Protozoal and Retroviral Co-infections*, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 11(23), 5013-5023 (2003).
- Franck, X., y otros 7 autores, *Nematocidal and Trichomonocidal Activities of 2-Substituted Quinolines*, II FÁRMACO. 60 (3), 219-224 (2005).
- Jacquemond-Collet, I., y otros 5 autores, *Antiplasmodial and Cytotoxic Activity of Galipinine and Other Tetrahydroquinolines From Galipea officinalis*, Planta Med. 68 (1), 68-69 (2002).
- López, F, Diagnóstico de Malaria. OPS, 1-6 (1988).
- Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*, Journal of Immunological Methods, 65, 55-63 (1983).
- Murillo, E., Lombo, O y Méndez, J.J. *Química y Funcionalidad Biológica de Mollinedia racemosa (Monimiaceae)*, Información Tecnológica, 22 (2), 3-14 (2011).
- Olumese, P. Guidelines for the Treatment of Malaria. World Health Organization, Suiza, pag. 87-122 (2006).
- Organización Mundial de la Salud. Informe de Sobre el Paludismo, <http://www.who.int/malaria/es/> (2012).

Robledo, S. M., R Carlos D. AGUDELO R, María CORENA-Mc Leod, *Anhidrasa Carbónica de Plasmodium falciparum: Un Blanco Útil para el Diseño de Medicamentos Antimaláricos y Compuestos Bloqueadores de la Transmisión de Malaria*, VITAE Revista de la Facultad de Química Farmacéutica, 17 (1), 91-100 (2010).

Saez, J., García, P., Genes, C., Molano, P., Torres, O. y Triana, O, *Evaluation of the Trypanocidal, Cytotoxic and Genotoxic Activity of Styrylquinoline Analogs*. Journal of Chemotherapy, 22 (3), 169-174 (2010).

Trager, W., Jensen, J.B, *Human Malaria Parasites in Continuous culture*. Science, 193 (4254), 674-675. (1976).

Walker, A., Baldwin, W.E., Thayer, H. I., Corson, B, *1,2-Di-(2-Quinoly)Ethane And Certain Related Compounds*, Journal Organic Chemistry, 16 (11),1805-08 (1951).