

HEMISÍNTESIS DE UN HÍBRIDO DIOSGENONA-ARTESUNATO Y SU EFECTO ANTIPLASMODIAL

DIOSGENONE-ARTESUNATE HYBRID HEMISYNTHESIS AND ITS ANTIMALARIAL EFFECT

Jhonatan ARROYAVE, BSc¹, Silvia BLAIR, PhD², Nora RESTREPO-SÁNCHEZ, PhD.^{3*}

Recibido: Marzo 20 de 2014. Aceptado: Octubre 20 de 2014.

RESUMEN

Antecedentes: La malaria es una enfermedad causada por parásitos del género *Plasmodium* y transmitida por mosquitos de género *Anopheles*. Anualmente, se reportan alrededor de 220 millones de casos de malaria en el mundo, de los cuales mueren aproximadamente 650.000 personas, convirtiendo esta enfermedad en un problema de salud pública. En los últimos años se ha reportado resistencia de los parásitos a los antimaláricos: cloroquina, mefloquina y recientemente a los derivados de artemisininas, como artesunato. **Objetivo:** Obtener por hemisíntesis un híbrido de diosgenona-artesunato con un conector hidrolizable tipo éster, y valorar su actividad antiplasmodial y citotoxicidad *in vitro*. **Métodos:** Para la obtención del híbrido **4**, se redujo el grupo carbonilo de la diosgenona en presencia de borohidruro de sodio, para generar un alcohol, el cual se usó para enlazarse con el artesunato, por medio de una reacción de esterificación promovida por el reactivo de Yamaguchi. La actividad antiplasmodial se determinó en la cepa 3D7 de *P. falciparum* sensible a cloroquina, la citotoxicidad se evaluó en la línea celular HepG2. **Resultados:** Mediante una reacción de esterificación con el reactivo de Yamaguchi, se obtuvo el primer **híbrido** diosgenona-artesunato **4** ($IC_{50}=0,0157 \mu M$), el cual fue más activo que la molécula de partida diosgenona **1** ($IC_{50}=35,49 \mu M$) y la diosgenona reducida **2** ($IC_{50}=46,33 \mu M$) pero no más que el artesunato **3** ($IC_{50} = 0,0020 \mu M$). **Conclusiones:** Se obtuvo un nuevo híbrido de diosgenona-artesunato el cual presenta mejor actividad que la molécula natural; resultado de importancia para su uso potencial contra cepas resistentes al artesunato.

Palabras clave: Híbridos antimaláricos, diosgenona, artesunato, malaria, *Plasmodium*.

ABSTRACT

Background: The malaria is a disease caused by parasites of genus *Plasmodium* and transmitted by mosquitoes of genus *Anopheles*. Annually about 220 million cases of malaria are reported worldwide, of which about 650000 people die, making this disease a public health problem worldwide. In the last years it has been reported drug resistance of parasite to antimalarials like chloroquine, mefloquine and recently, artemisinin derivatives like artesunato. **Objective:** Obtaining by hemisynthesis, a diosgenone-artesunate hybrid with a hydrolysable ester type linker, and evaluate its antiplasmodial activity and cytotoxicity *in*

¹ Research auxiliary, Grupo Malaria, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. Sede de Investigación Universitaria - SIU, Calle 62 #52-59. Medellín, Colombia.

² Grupo Malaria, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. Sede de Investigación Universitaria - SIU, Calle 62 #52-59. Medellín, Colombia.

³ Assistant Professor, Grupo Interdisciplinario de Estudios Moleculares (GIEM), Instituto de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Antioquia, Calle 70 No. 52-21. Medellín, Colombia.

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: neugenia.restrepo@udea.edu.co

vitro. **Methods:** The carbonyl group of diosgenone was reduced in the presence of sodium borohydride to generate an alcohol, which was used as the binding moiety with artesunate, via an esterification reaction promoted by Yamaguchi's reagent. The antiplasmodial activity was determined in *P. falciparum* chloroquine-sensitive strains, while the cytotoxicity was evaluated in HepG2 cell line. **Results:** Through an esterification reaction with Yamaguchi reagent, it was obtained the first diosgenone-artesunate hybrid **4** ($IC_{50}=0,0157\ \mu\text{M}$), which was more active than the native molecule, the diosgenone **1** ($IC_{50}=35,49\ \mu\text{M}$) and the reduced diosgenone **2** ($IC_{50}=46,33\ \mu\text{M}$), but it was not more active than the artesunate **3** ($0,0020\ \mu\text{M}$). **Conclusions:** A new diosgenone-artesunate hybrid was obtained, which presents better activity than the native molecule; result of importance for its potential use against artesunate resistant strains.

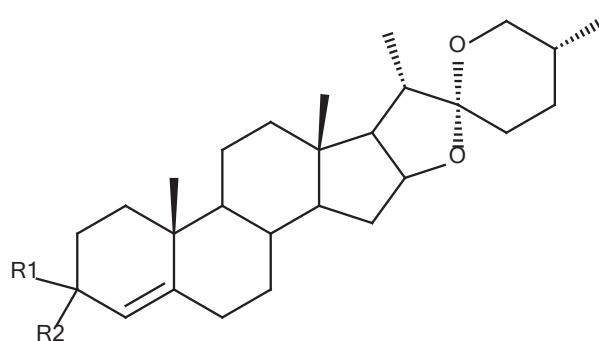
Keywords: Antimalarial hybrids, diosgenone, artesunate, malaria, *Plasmodium*.

INTRODUCCIÓN

La malaria es una enfermedad causada por parásitos de género *Plasmodium*, siendo *P. falciparum* el más letal de todos los que infectan al ser humano. Anualmente se reportan alrededor de 220 millones de casos de malaria en el mundo, de los cuales mueren aproximadamente 650.000 personas, convirtiendo esta enfermedad en un problema de salud pública a nivel mundial (1). Para combatir la enfermedad, se han planteado diversos esquemas terapéuticos dados en forma de monoterapia o terapia combinada, como la combinación artemeter-lumenfetrina, para el tratamiento de la infección por *P. falciparum* (2).

Debido a los problemas de resistencia que presentan los parásitos a algunos de los medicamentos actualmente utilizados para su tratamiento, se hace necesario buscar nuevos agentes antimaláricos, ya sean de origen natural o sintético.

Una tendencia en el diseño de agentes antiplasmodiales es la producción de moléculas híbridas, formadas por dos o más farmacóforos que poseen diferentes modos de acción (3-5), como los híbridos entre los triterpenos lupeol con quinolinas y ácido ursólico con piperazinas, que presentan actividad antiplasmodial promisorias (6, 7). El triterpeno diosgenona **1** (figura 1), reportado por primera vez por Sáez y colaboradores (8), ha demostrado tener una actividad antiplasmodial de $IC_{50}=27,9\ \mu\text{M}$ y $35,4\ \mu\text{M}$ en la cepa de *Plasmodium falciparum* FCB2 y NF54 resistente y sensible a cloroquina, respectivamente. Esta molécula no es tóxica, ni mutagénica y se encuentra de forma mayoritaria en la planta *Solanum nudum*, es fácilmente aislable y purificable (8-11).



R1 = R2 = O = diosgenona **1**

R1 = OH, R2 = H = diosgenona reducida **2**

Figura 1. Estructura de diosgenona **1** y diosgenona reducida **2**.

Los derivados de artemisinina, son compuestos sesquiterpénicos con un puente endoperóxido, al cual se atribuye su actividad antiplasmodial. En la actualidad los derivados de las artemisininas, entre los cuales es de destacar el artesunato **3** (figura 2), son los antimaláricos más utilizados en el tratamiento de la enfermedad, debido a su rápida y efectiva acción antiplasmodial. En comparación con los otros derivados de la artemisinina, el artesunato posee tres átomos de oxígeno más, lo cual hace que tenga una mayor solubilidad en sistemas acuosos, debido a los puentes de hidrógeno que puede formar, además de esto, posee un grupo carboxilo que le da la posibilidad de formar híbridos tipo hidrolizables (12) y buena biodisponibilidad oral, lo que lo constituye en un excelente candidato para la formación de híbridos.

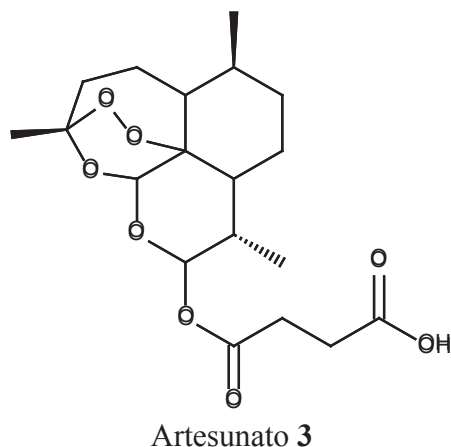


Figura 2. Estructura de artesunato.

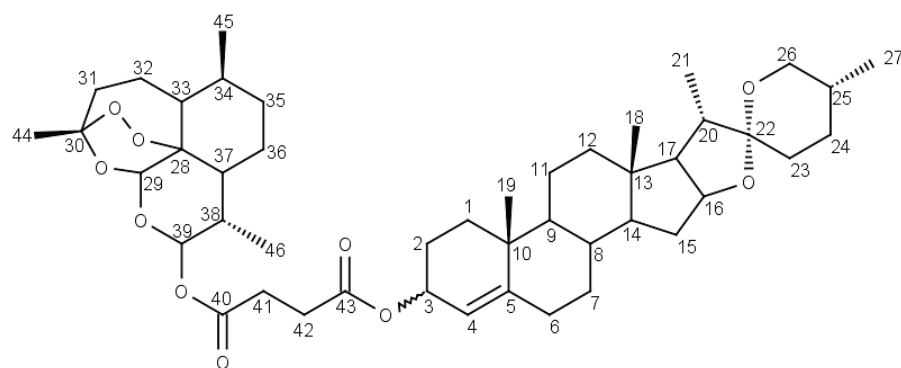


Figura 3. Estructura del híbrido diosgenona-artesunato 4.

Debido a la urgencia de buscar nuevos medicamentos para el tratamiento de la malaria y la importancia que poseen los productos naturales como nuevos farmacóforos, entre ellos los compuestos triterpénicos aislados de la planta *Solanum nudum*, se diseñó el híbrido antimalárico **4** (figura 3), entre diosgenona reducida **2** (figura 1) y artesunato **3**, por medio de una reacción de esterificación mediada por el reactivo de Yamaguchi y se evaluó *in vitro* su actividad antiplasmodial en la cepa 3D7 de *P. falciparum* y su toxicidad sobre la línea celular HepG2.

MATERIALES Y MÉTODOS

El artesunato, el cloruro de 2,4,6-triclorobenzoilo, la trietilamina, el 4-dimetilamino piridina y el borohidruro de sodio fueron de Sigma[®]; el tetrahidrofurano de Merck[®] y el diclorometano, metanol, hexano y acetato de etilo son grado comercial. El progreso de las reacciones se monitoreó por cromatografía de capa delgada (CCD), sílica

gel 60 F254 (Merck[®]). El revelado de las placas se hizo con una mezcla ácido sulfúrico, ácido acético y agua. Las columnas cromatográficas se hicieron con una matriz de sílica gel 60 (0,063-0,200 mm, Merck[®]). El espectro IR se obtuvo en un Spectrum One (Perkin Elmer[®]) y el software usado para interpretar los resultados es el Spectrum v5.3.1. Para los análisis espectroscópicos de ¹H-RMN y ¹³C-RMN se utilizó un espectrómetro Bruker[®] 300 MHz para ¹H y 75 MHz para ¹³C, con trimetilsilano como estándar interno y cloroformo deuterado (CDCl₃) o metanol deuterado (MeOD) como solvente. El espectro de masas del híbrido fue obtenido en un espectrómetro con un analizador de masas LC-MSD-Trap-SL 6300 (Agilent Technologies[®]).

Aislamiento de diosgenona 1

La diosgenona **1** se aisló a partir del extracto de hexano obtenido por percolación de la parte aérea de la planta *S. nudum*, tal como fue descrito por Sáez y colaboradores (8).

Obtención de diosgenona reducida 2

Para la reducción de la diosgenona, se siguió la metodología empleada por Pabón y colaboradores (13), con modificaciones menores consistentes en el uso de tetrahidrofurano como co-solvente y suspensión de la reacción por adición de solución saturada de cloruro de amonio.

Síntesis del híbrido diosgenona-artesunato 4

La diosgenona **1**, en presencia de borohidruro de sodio, tetrahidrofurano y metanol, dio el compuesto **2**, nombrado “diosgenona reducida **2**”, luego, ésta última se hizo reaccionar con artesunato **3** en presencia de trietilamina, cloruro de 2,4,6 triclórobenzoilo, dimetilamino piridina y diclorometano, para dar el híbrido diosgenona-artesunato, compuesto **4** o híbrido **4** (Figura 4).

Para la síntesis, se diluyeron 113,9 mg (0,296 mmoles) de artesunato **3** en 3 mL de dicloro-

metano a temperatura ambiente, se adicionaron 73 μL (0,524 mmoles) de trietilamina y 70 μL (0,448 mmoles) de cloruro de 2,4,6-triclórobenzoilo, se dejó el sistema en agitación continua, en atmósfera inerte y a temperatura ambiente por 2 horas. Posteriormente, se adicionaron 558 mg (0,457 mmoles) de dimetilamino piridina en 3 mL de diclorometano y transcurridos 5 minutos se agregaron 123 mg (0,296 mmoles) de diosgenona reducida **2**, en 3 mL de diclorometano, dejando la reacción por 3 horas. La reacción se detuvo con una solución de agua destilada saturada con cloruro de amonio, se realizó una separación líquido-líquido con lavados de 15 mL de acetato de etilo (tres veces). El exceso de solvente se eliminó a presión reducida y se purificó el compuesto por cromatografía de columna en sílica gel con elución en gradiente (hexano/acetato de etilo, desde 100/0 hasta 0/100 v/v).

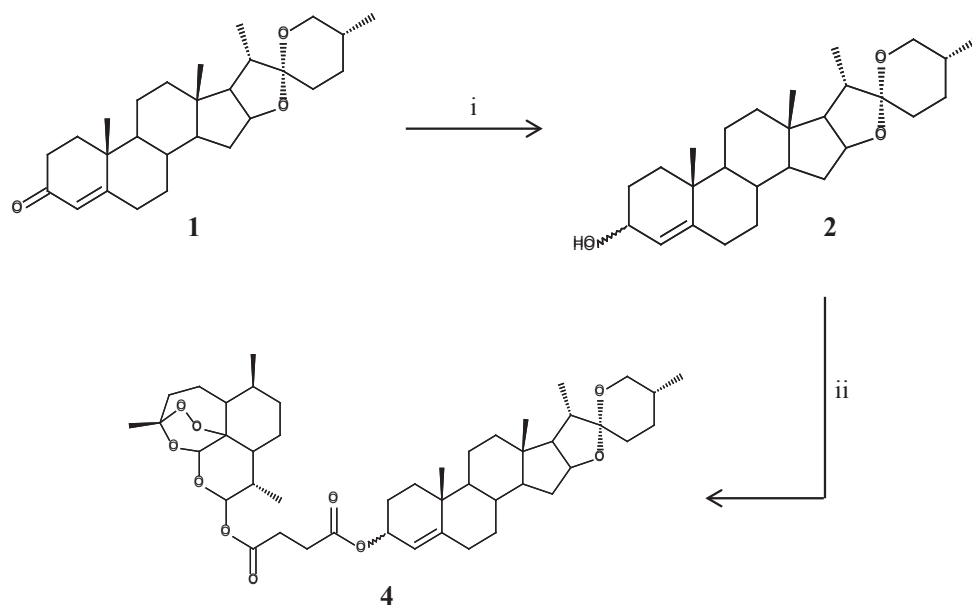


Figura 4. Síntesis del híbrido diosgenona-artesunato **4**. (i) MeOH, THF, NaBH₄, 2h, t. amb; (ii) a- artesunato, DCM, Et₃N, cloruro de 2,4,6-triclórobenzoilo, 2h, t. amb; b- compuesto **2**, DCM, DMAP, 3h, t. amb.

Ensayo de citotoxicidad

La línea celular HepG2 se cultivó en platos de 96 pozos, de fondo plano a una concentración de 2×10^5 células/pozo en 100 μL de medio DMEM F-12 suplementado con suero fetal bovino al 10%. Las células se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂ durante 30 horas, para permitir la formación de la monocapa. A cada pozo se le adicionaron 100 μL de los compuestos a concentraciones seriadas desde 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hasta 3,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Todas las soluciones

madre se prepararon en DMSO (dimetilsulfóxido) y a partir de allí se hicieron las diferentes diluciones en agua destilada. Los platos se incubaron por 48 horas a 37 °C. Posteriormente se agregó el reactivo MTT (1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan, Thiazolyl blue formazan; Sigma®) y se registró la absorbancia de cada pozo a 595 nm para determinar el efecto citotóxico midiendo la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial de las células (14).

Actividad antiplasmodial

La actividad antiplasmodial de los compuestos **1**, **2**, **3** y **4** se evaluó *in vitro* en la cepa 3D7 de *Plasmodium falciparum* sensible a cloroquina utilizando la metodología descrita por Bravo y colaboradores en 1999 y Desjardins y colaboradores en 1979 (15, 16).

Se evaluaron 7 concentraciones seriadas – disueltas en DMSO – en el rango de 242,37 a 3,78 μM para diosgenona **1**; de 241,20 a 3,76 μM , para diosgenona reducida **2**; de 0,64 hasta 0,010 μM para el híbrido **4**; y finalmente para el artesunato **3** se utilizaron concentraciones desde 0,065 hasta a 0,0010 μM . Como control positivo se utilizó la cloroquina en concentraciones desde 0,15 hasta 0,00234 μM , disuelta en agua destilada. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y la concentración final del DMSO fue siempre menor a 0,1%. La actividad antiplasmodial se realizó utilizando hipoxantina radiomarcada, así: a los platos de 96 pozos de fondo plano, con las concentraciones a evaluar se agregaron 2000 μL de eritrocitos parasitados (parasitemia 1% y hematocrito 1,8%) más 1 $\mu\text{C}/\text{mL}$ de ^3H -hipoxantina (MP Biomédical Santana). Estos platos se incubaron por 48 horas a 37 °C en atmosfera de 5% de O_2 , 5% de CO_2 y nitrógeno balanceado. El ADN de los parásitos fue colectado con la ayuda de un cosechador semiautomático y la radioactividad fue medida en un contador de centelleo (Merk). Se consideró un experimento válido cuando la lectura de los pozos de los controles sin tratamiento (medio de cultivo) fue superior a 2000 cpm. Los resultados se expresaron como el promedio de la concentración que inhibe el 50%.

Análisis estadísticos

Para estimar la actividad antiplasmodial y la citotoxicidad, se realizaron análisis de regresión no lineal. Los resultados corresponden a las medias más o menos la desviación estándar, los cuales se obtuvieron de tres experimentos independientes. Los análisis estadísticos fueron obtenidos en el programa Prism 5.0 (GraphPad).

Interpretación de resultados de actividad antiplasmodial y citotóxica

Se consideró una actividad promisoriosa o moléculas “hit” cuando la IC_{50} de cada compuesto fue

menor de 1 μM , buena de 1-20 μM , moderada de 20-100 μM , baja actividad 100-200 μM y no activo, cuando las concentraciones fueron mayores de 200 μM (17).

Se consideró la toxicidad de una molécula según los siguientes rangos: CT_{50} inferior a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (altamente citotóxica), 1-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (moderadamente citotóxica), 10-30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (toxicidad media) y superior a 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (no-tóxica) (18).

RESULTADOS

La diosgenona **1** fue caracterizada por infrarrojo, resonancia magnética nuclear de protones y espectrometría de masas, los resultados se compararon con los reportados por Sáez y colaboradores (8).

La diosgenona reducida **2** fue caracterizada por infrarrojo, resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas, comparando los resultados con los reportados por Pabón y colaboradores (13).

El híbrido diosgenona-artesunato **4** fue analizado por infrarrojo, resonancia magnética nuclear, espectrometría de masas y se determinó su punto de fusión, los resultados obtenidos fueron: Punto de fusión 183,03°C. IR (cm^{-1}) 2926, 2852, 1734, 1400. ^1H -RMN (CDCl_3) δ 5.84 (d, 1H, H-39), 5.48 (s, 1H, H-29), 5.24 (s amplio, 2H, H-3, H-4), 4.40 (dd, 1H, H-16), 3.39 (dt, 2H, H-26), 2.69-0.83 (62H). ^{13}C RMN 12.11 (C-46), 14.52 (C-21), 16.42 (C-18), 17.17 (C-19), 18.85 (C-27), 20.25 (C-45), 20.79 (C-11), 22.03 (C-32), 24.61 (C-44), 25.05 (C-2), 26.00 (C-36), 28.83 (C-24), 29.30 (C-42), 29.73 (C-41), 30.32 (C-25), 31.39 (C-23), 31.77 (C-6), 31.85 (C-38), 32.14 (C-15), 33.08 (C-7), 34.12 (C-35), 34.93 (C-1), 35.51 (C-8), 36.25 (C-31), 37.31 (C-34), 37.40 (C-10), 39.85 (C-12), 40.46 (C-13), 41.65 (C-20), 45.27 (C-37), 51.59 (C-33), 54.17 (C-9), 55.92 (C-14), 62.09 (C-17), 66.87 (C-26), 71.24 (C-3), 80.15 (C-28), 80.76 (C-16), 91.53 (C-29), 92.14 (C-39), 104.50 (C-30), 109.28 (C-22), 119.07 (C-4), 149.28 (C-5), 171.23 (C-40), 171.96 (C-43). MS (ESI), encontrado 803.5 m/z [$\text{M}+\text{Na}^+$].

Los resultados de actividad antiplasmodial, citotóxica e índice de selectividad de los diferentes compuestos y del híbrido se pueden observar en la tabla 1.

Tabla 1. Actividad antiplasmodial, citotóxica e índice de selectividad del híbrido y los compuestos de partida.

Compuesto	$\text{IC}_{50} \pm \text{DS}$ 3D7	$\text{CT}_{50} \pm \text{DS}$	IS
Diosgenona	35,49 \pm 0,23	> 484,73	> 13,66
Diosgenona reducida	46,33 \pm 4,08	> 482,39	> 10,41
Artesunato	0,0020 \pm 0,0002	9,31 \pm 3,17	4655
Híbrido Diosgenona-Artesunato	0,0157 \pm 0,0012	60,21 \pm 8,45	3835,03
Cloroquina	0,0111 \pm 0,0018	> 387,70	> 34927,93

La actividad antiplasmodial fue medida en la cepa 3D7 de *P. falciparum* y la citotoxicidad en la línea celular HepG2. La IC_{50} y CT_{50} corresponden al promedio de tres y dos experimentos, respectivamente y son concentraciones expresadas en μM . IS: corresponde al índice de selectividad (CT_{50}/IC_{50}). La cloroquina fue usada como control positivo para el ensayo de actividad antiplasmodial.

El híbrido diosgenona-artesunato **4** presentó una promisoriosa actividad antiplasmodial de $0,0157 \mu M$, molécula hit, que supera la moderada actividad de la molécula natural obtenida de la planta *Solanum nudum*, sin embargo, su actividad es menor que la del compuesto artesunato **3**, compuesto que presentó la mayor toxicidad *in vitro*, la cual disminuye cuando se le adiciona la molécula natural de partida o sea con la formación del híbrido. Con respecto al índice de selectividad se observa que para todas las moléculas este fue mayor de 2000 excepto para la moléculas de origen natural que fue mayor de 10.

DISCUSIÓN

La diosgenona **1** aislada a partir de la planta *Solanum nudum* se verificó por un análisis de 1H RMN y se comparó con el análisis realizado por Sáez y colaboradores (8). Se verificó la obtención de diosgenona reducida **2** por medio de técnicas espectroscópicas y espectrométricas y se comparó con los resultados obtenidos por Pabón y colaboradores (13).

En el espectro de 1H -RMN del híbrido **4**, se logran apreciar las señales características de terpenos entre 0 y 2,5 ppm, también se observa una señal a 5,24 ppm que integra para dos protones, uno vinílico que corresponde al carbono 4 y el otro protón alílico que corresponde al carbono 3, los cuales se observaban en la diosgenona reducida **2** y protones que se encuentran entre dos átomos de oxígeno -O-CHR-O- (5,48 y 5,84 ppm), ambas señales integran para un protón y corresponden a los carbonos 29 y 39, respectivamente. En el espectro de ^{13}C -RMN se observan 36 señales antes de 80 ppm que corresponden a carbonos alifáticos (7 metilos, 16 metilenos, 11 metinos y 2 carbonos cuaternarios), y después de 80 ppm las 10 señales restantes, 4 de ellas a carbonos terciarios y 6 a cuaternarios, se observan dos señales de carbonos insaturados uno terciario (119,07 ppm) y el otro cuaternario (149,28 ppm) (carbonos 4 y 5, respectivamente), al igual que dos señales de carbonos de ésteres, uno

formado a partir de la reacción (171,96 ppm) y otro perteneciente anteriormente a la estructura del artesunato (171,23 ppm). La estructura molecular del híbrido diosgenona-artesunato **4**, se confirmó por espectrometría de masas, en el análisis se observó el ion molecular 803,5 m/z, que corresponde al peso molecular más el ión sodio.

Con respecto a la citotoxicidad se encontró que la diosgenona **1** es potencialmente no citotóxica (tabla 1), lo cual está de acuerdo con lo descrito por Álvarez y colaboradores (9), al igual que la diosgenona reducida **2**. Se puede observar que el híbrido es un compuesto menos tóxico contra células HepG2 que el artesunato **3**, lo cual puede ser principalmente atribuido a la presencia de la diosgenona **1**. Cloete y colaboradores encontraron que la citotoxicidad del artesunato de sodio evaluada en la línea celular HepG2 es mayor a $CT_{50}=26 \mu M$ (19), en nuestro estudio se encontró una concentración $CT_{50}=9,31 \mu M$, es decir al menos 2,8 veces menor a la reportada por Cloete (19).

Se observó que al reducir diosgenona **1** se disminuye la actividad antiplasmodial, como lo reporta Pabón y colaboradores (13), indicando que el sistema alfa-beta insaturado puede ser el mayor responsable de dicha actividad.

La actividad antimalárica del artesunato **3** encontrada en este estudio ($IC_{50}=0,0020 \mu M$) es menor que la reportada anteriormente por Vivas y colaboradores ($IC_{50}=9,39$ nM) (20), y por Cloete y colaboradores ($IC_{50}=6,6$ nM) (19), todos estos análisis fueron realizados en la cepa 3D7 de *Plasmodium falciparum* sensible a cloroquina.

La concentración inhibitoria 50 del híbrido diosgenona-artesunato **4** ($IC_{50}=0,0157 \mu M$), no presentó mayor actividad que el artesunato **3** ($IC_{50}=0,0020 \mu M$), pero sí fue más activo que la diosgenona **1** ($35,49 \mu M$) y la diosgenona reducida **2** ($IC_{50}=46,33 \mu M$). El aumento de tamaño molecular del híbrido **4** (781,0 g/mol) con respecto al artesunato **3** (384,4 g/mol) y diosgenona **1** (412,6 g/mol) y el cambio del grupo ácido del artesunato por un grupo éster pueden explicar la disminución de la solubilidad del híbrido **4** y por tanto la actividad antiplasmodial y la citotoxicidad. Este hallazgo concuerda con lo reportado por Aminake y colaboradores, donde proponen que las moléculas de alto peso molecular son más difíciles de solubilizar en soluciones acuosas (21).

CONCLUSIONES

Mediante una reacción de esterificación con el reactivo de Yamaguchi se obtuvo una nueva molécula, el híbrido diosgenona-artesunato **4**, que fue más activo contra las cepas 3D7 de *P. falciparum* que la diosgenona **1** y diosgenona reducida **2**, pero no más que el artesunato. Este híbrido fue menos tóxico que el artesunato en la línea celular HepG2. Otras modificaciones en diferentes partes de la molécula diosgenona, como por ejemplo sobre la insaturación del anillo A o la apertura del anillo espiroetano, deben ser realizadas para formar híbridos alternativos con artesunato, en busca de una mejor relación entre actividad antiplasmódial y citotoxicidad.

AGRADECIMIENTOS

A Colciencias en el marco del proyecto RC-422-2011. A la Universidad de Antioquia Grupo Malaria en su programa de sostenibilidad 2014-2015. A Ana María Mesa, por sus aportes en el diseño sintético de este trabajo. A Alexandra Ríos y Briegel De Las Salas, por sus colaboraciones técnicas y a Cesar Segura por la revisión del manuscrito.

Confirmamos que el manuscrito ha sido leído y aprobado para publicación por todos los autores y que no hay otras personas que satisfagan los criterios para ser autores y no se encuentren aquí listados.

REFERENCIAS

- WHO, 2001. The use of antimalarial drugs. Texto redactado por Poole, S. Consultado el 29 de septiembre de 2010.
- Muregi F, Ishih A. Next-generation antimalarial drugs: hybrid molecules as a new strategy in drug design. *Drug Dev Res.* 2010; 71, 20-32.
- Saadeh H, Mosleh I, Mubarak M. Synthesis of novel hybrid molecules from precursors with known antiparasitic activity. *Molecules.* 2009 Abr 2; 14, 1483-1494.
- Tsogoeva S. Recent progress in the development of synthetic hybrids of natural or unnatural bioactive compounds for medicinal chemistry. *Mini Rev Med Chem.* 2010 Ago; 10(9): 773-793.
- Meunier B. Hybrid molecules with a dual mode of action: dream or reality? *Acc Chem Res.* 2008 Abr 4; 41(1): 69-77.
- Baggio S, Susplugas S, Vecchia L, Ferreira B, Dassonville A, Zimmer K, et al. Pharmacomodulation on the 3-acetylursolic acid skeleton: design, synthesis, and biological evaluation of novel *N*-{3-[4-(3-aminopropyl)piperazinyl]propyl}-3-*O*-acetylursolamide derivatives as antimalarial agents. *Bioorg Med Chem.* 2008 Oct 14; 16, 771-782.
- Kumar S, Misra N, Raj K, Srivastava K, Puri S. Novel class of hybrid natural product derived from lupeol as antimalarial agents. *Nat Prod Res.* 2008 Mar 10; 22(4): 305-319.
- Sáez J, Cardona W, Espinal D, Blair S, Mesa J, Bocar M, et al. Five new steroids from *Solanum nudum*. *Tetrahedron.* 1998 Jun 26; 54, 10771-10778.
- Alvarez G, Pabón A, Carmona J, Blair S. Evaluation of clastogenic potential of the antimalarial plant *Solanum nudum*. *Phytother Res.* 2004 May 17; 18, 845-848.
- López M, Vommaro R, Zalis M, De Souza W, Blair S, Segura C. Induction of cell death on *Plasmodium falciparum* asexual blood stages by *Solanum nudum* steroids. *Parasitology International.* 2010 Feb 11; 59, 217-225.
- Pabón A. Efecto sobre las concentraciones de tioles (glutati6n y cisteína), la formación de β-hematina de compuestos aislados de *Solanum nudum* (Solanaceae) y actividad antiplasmódial de sus derivados. [Tesis]. [Medellín, Colombia]. Universidad de Antioquia. 2010. 129 p.
- Wanxing E, Hong Y, Tze K, Wong F. Artemisinins: Pharmacological actions beyond anti-malarial. *Pharmacology & Therapeutics.* 2014; 142, 126-139.
- Pabón A, Escobar G, Vargas E, Cruz V, Notario Rafael, Blair S, et al. Diosgenone synthesis, anti-malarial activity and QSAR of analogues of this natural product. *Molecules.* 2013 Mar 14; 18, 3356-3378.
- Reed G, Lynn F, Meade B. Use of coefficient of variation in assessing variability of quantitative assays. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002 Nov; 6, 1235-1239.
- Desjardins R, Canfield C, Haynes J, Chulay J. Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob Agents Chemother.* 1979 Sep 10; 16(6): 710-718.
- Bravo J, Sauvain M, Gimenez T, Munoz O, Callapa J, Men O, et al. Bioactive phenolic glycosides from *Amburana cearensis*. *Phytochemistry.* 1999; 50, 71-74.
- Batista R, Silva A, Oliveira A. Plant-derived antimalarial agents: new leads and efficient phytomedicines. Part II. Non-alkaloidal natural products. *Molecules.* 2009 Ago 13; 14, 3037-3072.
- Zofou1 D, Tematio E, Ntie F, Tene M, Ngemenya M, Tane P, et al. New antimalarial hits from *Dacryodes edulis* (Burseraceae) - Part I: Isolation, *in vitro* activity, *in silico* "drug-likeness" and pharmacokinetic profiles. *Plos One.* 2013 Nov 8; 8(11): 1-9.
- Cloete T, Krebs H, Clark J, Connelly M, Orcutt A, Sigal M, et al. Antimalarial activity of 10-alkyl/aryl esters and aminoethylethers of artemisinin. *Bioorg Chem.* 2012 Nov 3; 46, 10-16.
- Vivas L, Rattray L, Stewart L, Bongard E, Robinson B, Peters W, et al. Anti-malarial efficacy of pyronaridine and artesunate in combination *in vitro* and *in vivo*. *Acta Trop.* 2008 Mar; 105(3): 222-228.
- Aminake M, Mahajan A, Kumar V, Hans R, Wiesner L, Taylor D, et al. Synthesis and evaluation of hybrid drugs for a potential HIV/AIDS-malaria combination therapy. *Bioorg Med Chem.* 2012 Jun 21; 20, 5277-5289.