

Síntesis y actividad antimalárica de un grupo de pirazoloquinolinas

Synthesis and antimalarial activity of some pyrazoloquinolines

WILMER GUZMÁN*, CARLOS MÁRQUEZ**, NEIRA GAMBOA DE DOMÍNGUEZ***, MARÍA EUGENIA ACOSTA***, SIMÓN MENESES*, ERIC DEHARO****

Resumen

La cloroquina y la quinina han sido los antimaláricos más usados durante las últimas décadas, no obstante, la resistencia que ha desarrollado el *Plasmodium* en contra de la primera y la toxicidad de la segunda, han limitado su uso. Por ello, en la actualidad hay una imperiosa necesidad de desarrollar nuevos medicamentos para combatir la malaria. En este estudio fue sintetizado un grupo de pirazoloquinolinas como potenciales inhibidores de la formación de la hemozoína, el cual es un mecanismo de defensa utilizado por el parásito para evitar los efectos tóxicos del hemo. En ensayos *in vitro*, los compuestos **17** y **11b** inhibieron la formación de hemozoína en un 85% y un 79%, respectivamente, mientras que cloroquina tuvo una inhibición del 88%. En las evaluaciones *in vivo*, Prueba de Peter, **11b** redujo la parasitemia al 8% mientras que cloroquina la redujo al 4% en el mismo ensayo.

Palabras clave: Síntesis, pirazoloquinolinas, antimaláricos, hemozoína, hemo, prueba de Peter.

Abstract

Chloroquine and quinine have been the most widely used antimalarial drugs in recent decades, however, resistance developed by the *Plasmodium* against the first and toxicity of the latter have limited its use. Therefore, there is now an urgent need to develop new drugs to fight malaria. In this study, a group of pyrazoloquinolines was synthesized as potential inhibitors of hemozoin formation, which is a mechanism used by the parasite against the toxic effects of heme. Compounds **17** and **11b** inhibited hemozoin formation by 85% and 79%, in *in vitro* tests, respectively, whereas chloroquine had an inhibition of 88%. *In vivo* evaluations, Peter's test, **11b** reduced to 8% parasitemia while chloroquine reduced it to 4% in the same trial.

Key Words: Synthesis, pyrazoloquinolines, antimalarials, hemozoin, heme, Peter's test.

Introducción

La malaria es una enfermedad producida por los protozoarios del género *Plasmodium* y transmitida por el mosquito hembra del género *Anopheles*. La forma más peligrosa de la enfermedad es producida por el *Plasmodium falciparum*. En los registros epidemiológicos de las semanas 36, 37 y 38 de septiembre de 1997, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó la situación mundial de malaria para el año 1994 (WHO 1997). Para ese año, la malaria se presentó en varios grados de incidencia en 100 países y terri-

torios del mundo. La población en riesgo de contraer la enfermedad se estimó en 2300 millones de personas, el 41% de la población mundial. Los estimados de morbilidad y mortalidad debido a la malaria fueron de 300-500 millones de casos clínicos por año y de 1,5 a 2,7 muertes cada año. Más de un millón de los casos mortales tuvieron lugar en la región africana, 90%, la mayoría de los cuales corresponden a niños menores de 5 años. Por su parte, en el año 2008 (WHO 2008), la morbilidad y mortalidad debidas a la malaria fueron estimadas en 243 millones de casos

* Cátedra de Química, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, UCV

** Laboratorio de Química Medicinal y Síntesis Orgánica, Facultad de Ciencias, UCV

*** Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Farmacia, UCV

**** UMR-152 IRD-Universidad Paul Sabatier, Centro IRD BP 165, 97300 Cayenne, France

y 863.000 muertes, respectivamente. De nuevo, la mayoría de los casos clínicos, 85%, y los decesos, 89%, correspondieron a la región africana, asimismo, los principales afectados siguen siendo los menores de 5 años. Esta reducción observada en los casos de malaria, ha sido probablemente debida a la implementación de diversos programas de prevención y control sugeridos por la OMS, entre los que destacan, el uso de mosquiteros tratados con insecticidas de larga duración, el tratamiento combinado basado en la artemisinina y la reactivación del rociamiento de interiores con insecticidas de acción residual. No obstante, el principal inconveniente en la lucha antimalárica radica en el continuo aumento de la resistencia que ha desarrollado el *Plasmodium* contra los medicamentos de mayor uso, en particular, con cloroquina y más recientemente a la artemisinina (WHO 2009).

El *Plasmodium falciparum* en el estado de trofozoito se nutre del citoplasma eritrocítico del huésped y degrada la hemoglobina dentro de un gran organelo ácido conocido como la vacuola digestiva. Entre el 30% y 90% de la hemoglobina del hospedador es degradada en el estado eritrocítico del *Plasmodium*. En los últimos años se ha dedicado un gran esfuerzo para comprender como es que el parásito realiza la degradación de la hemoglobina, ello con la finalidad de obtener nuevos blancos biológicos para la quimioterapia antimalárica. Las investigaciones indican que al menos cuatro proteasas parecen intervenir durante el proceso proteolítico de la hemoglobina. Dos de ellas, las conocidas proteasas cisteínicas de trofozoitos, falcipaina II y falcipaina III y las otras, las proteasas aspárticas, plasmepsina I y plasmepsina II. (Rosenthal y col., 1988, 1989; Gamboa y col., 1996; Golberg y col., 1991).

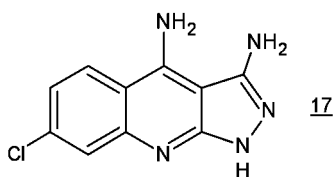
Durante la digestión de la hemoglobina se libera el hemo, el cual, cuando se disuelve es altamente tóxico al *Plasmodium* (Vander Jagt y col., 1987). Sin embargo, el parásito se protege de los efectos nocivos del hemo mediante la formación de una estructura cristalina conocida como hemozoína o pigmento malárico, el cual es insoluble en el medio fisiológico de la vacuola alimenticia del *Plasmodium*. Las investigaciones en torno a la formación de la hemozoína han sido objeto de gran controversia. En las primeras evaluaciones se propuso la existencia de una enzima llamada heme-polimerasa, que para la fecha no se ha aislado. Por su parte las proteínas ricas en histidinas, *Pf* HRP II, han sido implicadas como núcleo o molde para la formación del pigmento malárico (Sullivan y col., 1996). No obstante, investigaciones recientes en las que se ha inhibido la proteína *Pf* HRP II, originaron parásitos normales (Nolan y col., 2003).

Recientemente, los lípidos han cobrado auge en lo que respecta a su mediación en la formación del pigmento malárico. En 1999, Fitch y colaboradores, durante un estudio sobre la participación de lípidos en la formación de β -hematina, producto sintético equivalente a la hemozoína natural, indicaron que un «factor promotor» de la formación de la β -hematina fue aislado de una muestra de lisados de trofozoitos tratados con cloroformo (Fitch y col., 1999). El análisis del extracto clorofórmico sólo mostró lípidos, los cuales serían los responsables de la formación de la hemozoína en parásitos. Más interesante resultó el hallazgo de Coppens y Vielmeyer (Coppens y Vielmeyer, 2005) quienes reportaron por primera vez que la hemozoína de la vacuola digestiva de *P. falciparum* está encapsulada dentro de un cuerpo lipídico neutro. Posteriormente, otro grupo de investigadores (Pisciotta y col., 2007) corroboraron que la formación de hemozoína tiene lugar dentro de cuerpos lipídicos, a los que denominaron nanoesferas lipídicas.

Finalmente, la resistencia del *Plasmodium* en contra de los antimaláricos de uso clínico ha motivado la investigación sobre el modo de acción de las principales drogas contra la malaria. Para la fecha aún no está claro cómo actúa la cloroquina, un antimalárico que se ha utilizado por más de medio siglo. Sin embargo, la mayoría de las evaluaciones indican que, en general, las 4-aminoquinolinas actúan dentro de la vacuola digestiva del *P. falciparum* por interrupción del proceso de cristalización o mineralización que conduce a la formación hemozoína.

Debido a esto, nuestro objetivo fue obtener un grupo de compuestos cuya primordial acción biológica sea la inhibición de la cristalización de la hematina. Para ello se propuso la síntesis de un grupo de compuestos del tipo 3-metilpirazoloquinolina con cadenas diamínicas en el carbono C-4 y sustituyentes tales como el átomo de cloro y el trifluorometilo en el anillo bencenoide de la estructura (esquema 1). La elección de este núcleo fue debida a que su planaridad probablemente pueda favorecer las interacciones cofaciales π - π entre éste y el núcleo porfirínico de la hematina, tal y como se cree actúa la cloroquina. Para que su distribución en el organismo sea adecuada, se incluye la cadena diamínica en el carbono C-4 de la pirazoloquinolina, de nuevo tratando de imitar la particular acumulación de cloroquina dentro de la vacuola del parásito, la cual se ha atribuido a su cadena de diaminopentano lateral. La variación de sustituyentes en el anillo bencenoide del extremo quinolínico es con el fin de explorar como afectan estos sustituyentes el perfil inhibitorio de los compuestos objetivo. Otro compuesto que incluimos en este trabajo fue la 3,4-diamino-7-cloro-1H-pirazolo-(3,4-b)-quinolina (17)

(esquema 2). Por un lado, el sistema planar de este núcleo lo perfila como un posible inhibidor de la formación de la hemozoína, del mismo modo a como lo hace la cloroquina. Mientras que por el otro, la disposición espacial de los grupos amino en C-3 y C-4, permite suponer que este compuesto pudiese formar un complejo con el hierro.



El estudio biológico de los compuestos sintetizados implicó la evaluación de la capacidad inhibitoria de la cristalización de la hematina, seguidamente los mejores inhibidores fueron evaluados, *in vivo*, prueba de Peter, contra *P. berghei*, en ratones (Peter's test, 1999).

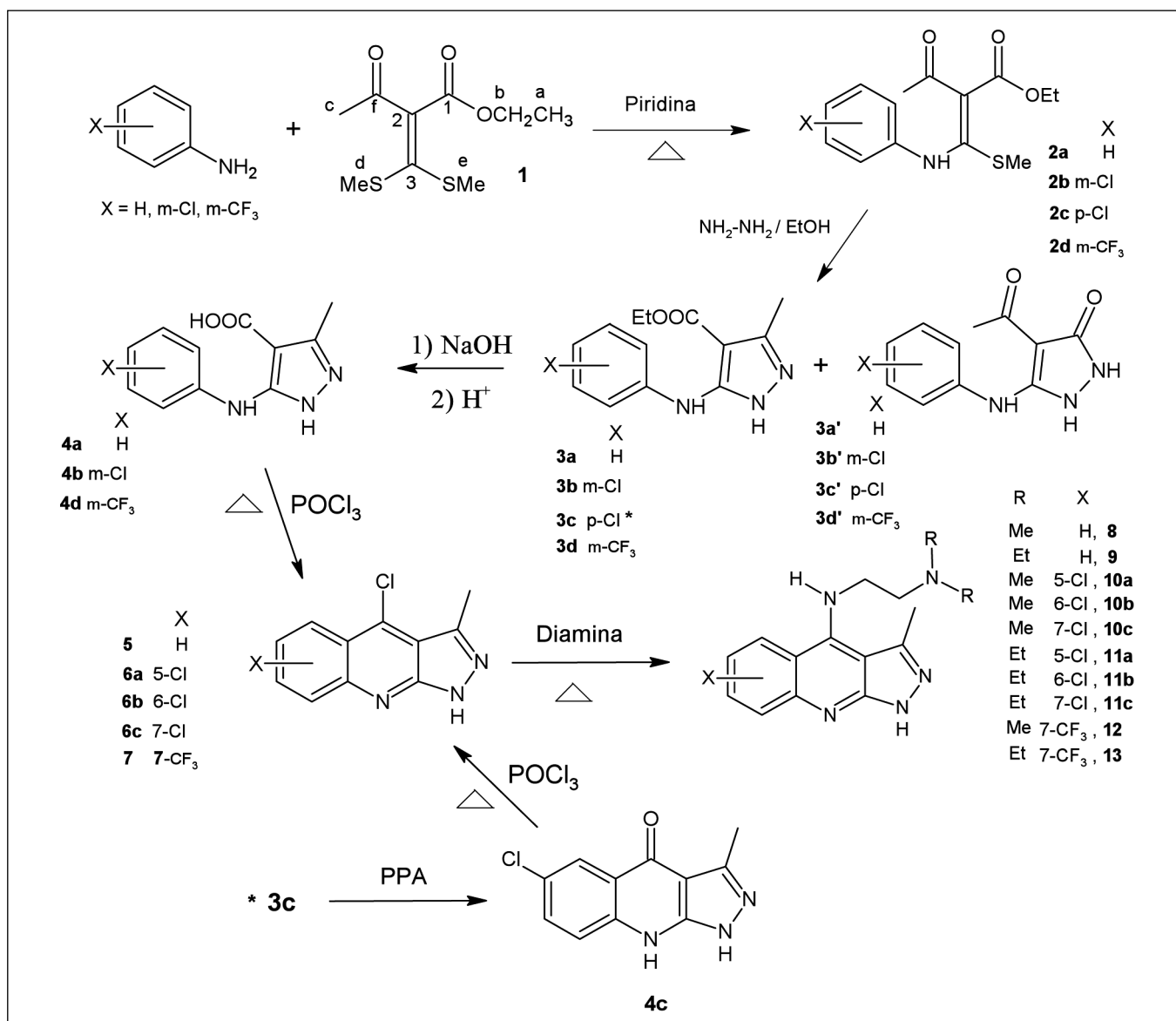
Materiales y métodos

QUÍMICA:

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato marca Electrothermal y no están corregidos. Los espectros de infrarrojo se realizaron en un espectrofotómetro Perkin Elmer, modelo 1310, el registro se hizo en cm^{-1} y en un espectrómetro Perkin Elmer, FT-IR, Modelo Spectrum RXI. Los espectros de RMN se realizaron en un JEOL ECLIPSE 270 (270 MHz, ^1H y 67,8 MHz, ^{13}C) y en un BRUKER 500 (500 MHz, ^1H y 125 MHz, ^{13}C). Para las asignaciones espectroscópicas se usaron las tablas de Pretsch y colaboradores (Pretsch y col., 1980).

BIOLOGÍA:

Las pruebas biológicas *in vitro*, preliminares, se realizaron según protocolo de Baelmans (Baelmans y col., 2000). Se utilizó un lector de microplacas



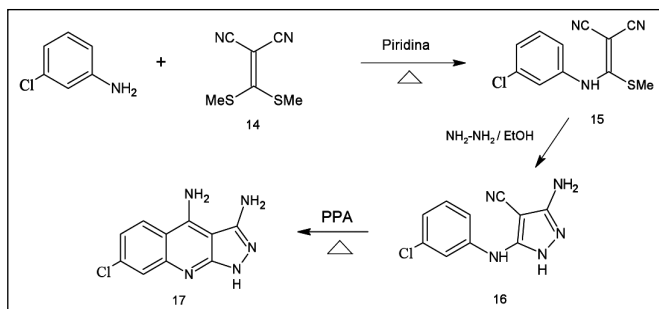
Esquema 1. Estrategia sintética para la obtención de las pirazoloquinolinas.

BIO-RAD modelo 550. En las evaluaciones *in vivo*, se utilizaron ratones machos NIH (18 - 22g) obtenidos en el Bioterio del Instituto Nacional de Higiene «Rafael Rangel», mantenidos a temperatura ambiente y alimentados con Ratarina® y agua *ad libitum*. Es importante resaltar que los ensayos biológicos fueron ejecutados según los principios establecidos por: Commission on Life Sciences, National Research Council, 1996.

QUÍMICA

Síntesis del 2-Acetil-3,3-bis-(metiltio)acrilato de etilo, **1**

Se mezclaron 3,36 g (60,00 mmoles) de hidróxido de potasio pulverizado y 40 mL de dioxano, bajo agitación y en un baño de hielo-agua a 10 °C. Desde un embudo se adicionaron, gota a gota, 3,91 g (30,00 mmoles) de acetilacetato de etilo y 2,30 g (30,00 mmoles) de disulfuro de carbono, disueltos en 20 mL de dioxano. Una vez culminada la adición, la reacción se mantuvo bajo agitación por 90 minutos a temperatura ambiente. La mezcla así formada, fue filtrada a través de un embudo buchner y el sólido obtenido fue lavado con 20 mL de dioxano y secado con 20 mL de éter. El sólido fue posteriormente colocado en un vaso de precipitado de 250 cc y se trató con una solución fría formada por 8,60 g (60,00 mmoles) de yoduro de metilo y 100 mL de etanol. La mezcla fue agitada por una hora a temperatura ambiente. El yoduro de potasio formado fue eliminado por filtración y la solución etanólica fue evaporada a presión reducida. Se obtuvo un aceite amarillo, el cual fue purificado por cromatografía de columna usando como eluyentes, hexano, mezclas de polaridad creciente de CH₂Cl₂ / hexano y CH₂Cl₂. Se obtuvieron 5,50g (78,23%) de producto puro. Para estructura y asignaciones, ver compuesto **1** (esquema 1). IR (pel. líq.) ν_{\max} : 2960, 2920, 1700, 1660, 1260, 1205, 1065 cm⁻¹. RMN-¹H (CDCl₃), δ : 1,26 (3H, t, H-a); 2,27 (3H, s, H-c); 2,37 (6H, s, H-d, H-e); 4,22 (2H, c, H-b) ppm. RMN-¹³C (CDCl₃), δ : 14,09 (C-a); 18,61 (C-d, C-e); 30,01 (C-c); 61,53 (C-b); 135,24 (C-2); 157,26 (C-3); 165,12 (C-1); 195,41 (C-f) ppm.



Esquema 2. Estrategia sintética para la obtención de las pirazoloquinolinas **17**.

Síntesis de derivados del 2-acetil-3-anilino sustituido-3-metiltioacrilato de etilo, **2a-d**

Procedimiento general. En un balón de 100 cc, provisto con un condensador de reflujo y un agitador magnético, se colocaron 7,02 g (30,00 mmoles) del 2-acetil-3,3-bis(metiltio)acrilato de etilo y 30,00 mmoles de la anilina respectiva, en 40 mL de etanol. La mezcla homogénea se calentó a reflujo por una hora y se continuó su agitación a temperatura ambiente por 24 horas. Al final de este tiempo el solvente fue evaporado a presión reducida. El crudo resultante fue purificado por cromatografía de columna empleando una mezcla de hexano/acetato de etilo (200/15). Estos productos fueron caracterizados solamente por espectroscopia de IR debido a que consistieron de una mezcla isomérica E/Z, cuya separación y caracterización adicional no fue requerida.

2-acetil-3-anilino-3-metiltioacrilato de etilo, **2a**

Se obtuvieron 5,65 g (52,66%) del producto esperado según IR (pel. líq.) banda ancha 3400-2600 centrada en 2960, 1730, 1640, 1585, 1560, 1265, 1220, 1095, 1055, 1035 cm⁻¹.

2-acetil-3-m-cloroanilino-3-metiltioacrilato de etilo, **2b**

Gramos obtenidos, 6,39 g (67,50%) IR (pel. Líq.) ν_{\max} : banda ancha 3500-2400, centrada en 2970; 1735; 1640; 1585; 1465; 1400; 1250; 1210; 1095; 1060; 1015; 940; 875; 780; 690 cm⁻¹.

2-acetil-3-(4-cloroanilino)-3-metiltioacrilato de etilo, **2c**

Se aislaron 5,50 g (58,50%), IR (pel. líq.) ν_{\max} : 3600-2400 banda ancha, 1700-1570 banda ancha e intensa, 1480, 1250, 1085, 1060 cm⁻¹.

2-acetil-3-(3'-trifluorometilanilino)-3-metiltioacrilato de etilo, **2d**

El rendimiento de la reacción fue de 60,00%. IR (pel. líq.) ν_{\max} : 3600-2500 banda ancha, 1720, 1650, 1580, 1475, 1260, 1080, 1040 cm⁻¹.

Síntesis de los derivados de 4-carboetoxi-5 (anilino sustituido)-3-metil-1H-pirazol, **3a-d**

Procedimiento general. En un balón de 250 cc, se colocaron 20,00 mmoles del 2-acetil-3-(anilino sustituido)-3-metiltioacrilato de etilo, 30 mL de etanol y 1,20 mL de hidrato de hidracina. La mezcla se calentó a reflujo por 30 minutos y se dejó agitando por otros 90 minutos a temperatura ambiente. Sólo se observaron dos manchas bien definidas en TLC, ninguna co-

respondiente a producto de partida. Por adición de agua se obtuvo un precipitado blanco. Las manchas citadas pertenecen a los productos 3a-d y 3a'-d' identificados en el esquema 1.

4-carboetoxi-5-anilino-3-metil-1H-pirazol, 3a

Al tratar el sólido con CH_2Cl_2 , se observó que parte de la muestra sólida fue disuelta, por lo que fue necesario filtrar nuevamente. En esta oportunidad se obtuvieron 1,40 g (30,37%) de un sólido insoluble, 3a', y 1,17 g (25,38%) de sólido soluble, 3a, Pf_(3a): 165-166 °C. Datos espectroscópicos en la Tabla I.

4-carboetoxi-5-(m-cloroanilino)-3-metil-1H pirazol 3b

Al tratar la mezcla sólida con CH_2Cl_2 se obtuvo un residuo sólido insoluble que pesó 1,90 g (33,96%) el cual fue identificado como 3b' y uno soluble, 3b, que después de eliminar el diclorometano pesó 2,35 g (42,00%). Pf. 155-156 °C. Datos espectroscópicos de 3b en la Tabla I.

5-(p-cloroanilino)-4-carboetoxi-3-metil-1H-pirazol, 3c

Se obtuvieron 2,84 g. De estos, 2,19 g (3c', 61,40%) resultaron insolubles en una mezcla de diclorometano/hexano (4/1). Datos espectroscópicos de 3c en la Tabla I.

5-(3'-trifluorometilanilino)-4-carboetoxi-3 metil-1H-pirazol, 3d

Se obtuvieron 4,87 g de producto. De allí 1,97 g (35,28%) resultaron insolubles en diclorometano (3d') y 2,90 g (47,31%) fueron solubles, 3d, Pf. 178-180 °C. Datos espectroscópicos de 3d en la Tabla I.

Síntesis de los derivados del Ácido 5-anilino sustituido-3-metil-1H-pirazolo-4-carboxílico, 4a, 4b y 4d

Procedimiento general. Se colocaron (10 mmoles) del respectivo 4-carboetoxi-5-anilino-3-metil-1H-pirazol, 572 mg (10,00 mmoles) de KOH y 35 mL de una mezcla de etanol/agua (9/1) en un balón de reacción de 125 cc. La mezcla se calentó a reflujo por 3 horas y luego se permitió enfriar hasta ambiente. Se adicionó agua al crudo de reacción y se formó un precipitado blanco, que después de filtrar y secar pesó 620 mg, este sólido corresponde al éster de partida 3a. La solución básica de donde provino el sólido anterior fue neutralizada con ácido clorhídrico diluido y se observó un nuevo sólido blanco (4a) que pesó 815 mg (36,80%). Pf.: 191 – 193 °C. Datos espectroscópicos en la Tabla II.

Síntesis del Ácido 5-(m-cloroanilino)-3-metil-1H-pirazolo-4-carboxílico, 4b

Se obtuvieron 1,51 g (60,00%) de sólido blanco que fundió a 190 °C^d. En el TLC se observó solo una mancha, cuando se empleó como eluyente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (24/1). Datos espectroscópicos en la Tabla II.

Síntesis del Ácido 3-metil-5-(m-trifluorometilanilino)-1H-pirazolo-4-carboxílico, 4d

Se aislaron 1,74 g (55,40%) del producto 4d al estado puro. Pf. 200-201 °C, Datos espectroscópicos en la Tabla II.

Síntesis de la 6-cloro-3-metil-1H-pirazolo(3,4-b)-4-quinolona, 4c

Se hicieron reaccionar 400 mg (1,43 mmoles) del éster 3c durante 1 hora, con 800 mg de PPA y la temperatura de reacción fue de 150 °C. Se permitió enfriar y el crudo se trató con hielo y agua. La mezcla heterogénea que se formó fue neutralizada con Na_2CO_3 . El sólido obtenido pesó 135 mg (40,40%) y se recrystalizó en DMSO/agua. Datos espectroscópicos en la Tabla II.

Síntesis de los derivados clorados 5, 6 y 7

Síntesis de la 3-metil-4-cloro-1H-pirazolo(3,4-b)quinolina, 5

Procedimiento general. Se mezclaron 10,00 mmoles del correspondiente ácido 5-anilino-3-metil-1H-pirazolo-4-carboxílico y 25 cc de oxiclórico de fósforo recién destilado. La reacción se calentó a reflujo por 3 horas o hasta que el TLC en $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (29/1) no mostró la mancha del ácido de partida. El sólido fue purificado por cromatografía de columna a presión media (CCPM). Para el caso del compuesto 5 el peso obtenido fue de 1,85 g (84,80%). Datos espectroscópicos en la Tabla III.

Síntesis de la 3-metil-4,5-dicloro-1H-pirazolo(3,4-b)quinolina, 6a y de la 3-metil-4,7-dicloro-1H-pirazolo(3,4-b)quinolina, 6c

Se obtuvo sólido beige (2,42 g), IR en tabla III. Este sólido no fue adicionalmente caracterizado debido a su limitada solubilidad y a que el producto aislado consistió de una mezcla de los isómeros con el cloro en C-5 y en C-7, por ello se decidió continuar el siguiente paso de la síntesis con la mezcla isomérica de 6a y 6c.

Síntesis de la 4-cloro-3-metil-7-trifluorometil-1H-pirazolo(3,4-b)quinolina, 7

Se obtuvieron 1,50 g (93,75%) de una mezcla de

Tabla I
Estructura y Datos espectroscópicos de los compuestos 3a-d

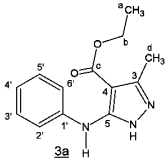
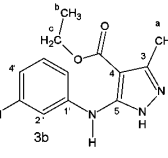
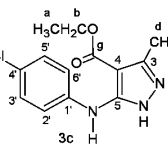
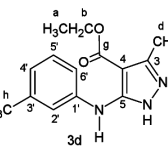
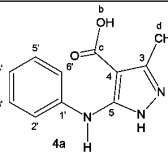
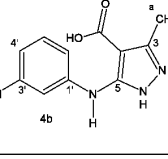
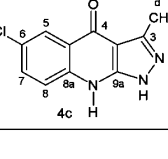
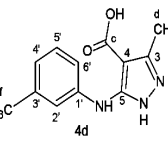
Compuesto	IR (cm ⁻¹)	RMN ¹ H (ppm)	RMN ¹³ C (ppm)
	(KBr) ν_{max} : 3365, 3250, 3220, 2960, 2920, 1640, 1590, 1545, 1460, 1140	(CDCl ₃) δ : 1,37 (3H, t, H-a); 2,32 (3H, s, H-d); 4,32 (2H, c, H-b); 6,90 (1H, t, J_0 : 7,2 y 7,4 Hz, H-4'); 7,27 (2H, t, J_0 : 7,3 y 8,2 Hz, H-3' y H-5'); 7,48 (1H, d, J_0 : 8,2 Hz, H-2' y H-6'); 8,24 (1H, s, NH)	(CDCl ₃) δ : 9,9 (C-a); 12,1 (C-d); 57,6 (C-b); 94,5 (C-4); 118,4 (C-4'); 118,8 (C-2', C-6'); 126,7 (C-3', C-5'); 138,8 (C-1'); 141,5 (C-3); 151,4 (C-5); 163,2 (C-c)
	(KBr) ν_{max} : 3360, 3250, 1640, 1590, 1550, 1140	(DMSO-d6) δ : 1,27 (3H, t, H-b); 2,34 (3H, s, H-a); 4,26 (2H, c, H-c); 6,87 (1H, d, J_0 : 7,7 Hz, H-6); 7,24 (1H, t, J_0 : 7,9 y 8,2 Hz, H-5); 7,35 (1H, d, J_0 : 8,4 Hz, H-4); 7,89 (1H, t, J_m : 2,0 Hz, H-2); 8,34 (1H, s, NH); 12,57 (1H, sa, NH)	(DMSO-d6) δ : 12,1 (C-a); 14,8 (C-b); 60,1 (C-c); 96,8 (C-4); 115,6 (C-6'); 116,1 (C-2'); 119,7 (C-4'); 130,8 (C-5'); 133,9 (C-3'); 143,4 (C-3, C-1'); 152,9 (C-5); 165,1 (C=O)
	(KBr) ν_{max} : 3360, 3240, 2970, 1670, 1600, 1560, 1260, 1125, 1110	(DMSO-d6) δ : 1,29 (3H, t, H-a); 2,39 (3H, s, H-d); 4,24 (2H, c, H-b); 7,27 (2H, d, J_0 : 8,7 Hz, H-2', H-6'); 7,61 (2H, d, J_0 : 8,7 Hz, H-3', H-5'); 8,29 (1H, s, NH)	(DMSO-d6) δ : 12,1 (C-d); 14,8 (C-a); 60,0 (C-b); 96,6 (C-4); 118,3 (C-2', C-6'); 123,5 (C-4'); 129,1 (C-3', C-5'); 141,0 (C-1'); 143,3 (C-3); 153,1 (C-5); 165,2 (C-g)
	(KBr) ν_{max} : 3360, 3240, 2960, 2915, 1640, 1595, 1460, 1325, 1125 y 1115	(CDCl ₃) δ : 1,36 (3H, t, H-a); 2,43 (3H, s, H-d); 4,31 (2H, c, H-b); 7,11 (1H, d, J_0 : 7,7 Hz, H-4'); 7,33 (1H, t, J_0 : 7,7 Hz, H-5'); 7,60 (1H, d, J_0 : 7,7 Hz, H-6'); 7,89 (1H, s, H-2'); 8,42 (1H, s, NH)	(CDCl ₃) δ : 12,3 (C-a); 14,5 (C-d); 60,2 (C-b); 97,4 (C-4); 113,4 (J: 4,1 Hz, C-4'); 116,8 (J: 4,1 Hz, C-2'); 119,9 (C-6'); 124,4 (J: 271,4 Hz, C-h); 129,4 (C-5'); 131,4 (J: 31,5 Hz, C-3'); 141,7 (C-1'); 143,4 (C-3); 153,7 (C-5); 165,5 (C-g)

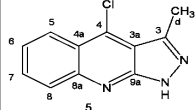
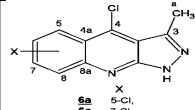
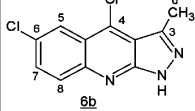
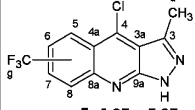
Tabla II
Estructura y Datos espectroscópicos de los compuestos 4 a-d

Compuesto	IR (cm ⁻¹)	RMN ¹ H (ppm)	RMN ¹³ C (ppm)
	(KBr) ν_{max} : banda ancha entre 3400 – 2000; bandas de mediana intensidad 1680 – 1560	(DMSO-d6) δ : 2,39 (3H, s, H-d); 6,82 (1H, t, J_0 : 7,2 y 8,2 Hz, H-4'); 7,24 (2H, t, J_0 : 7,2 Hz, H-2', H-6'); 7,54 (2H, d, J_0 : 8,2 Hz, H-3', H-5'); 8,36 (1H, s, NH); 12,48 (1H, sa, H-b)	(DMSO-d6) δ : 12,1 (C-d); 96,8 (C-4); 116,6 (C-2', C-6'); 120,0 (C-4'); 129,4 (C-3', C-5'); 142,1 (C-3); 143,2 (C-1'); 153,6 (C-5); 167,2 (C-c)
	(KBr) ν_{max} : 3500-2000 banda ancha con varios picos poco definidos, 1660, 1600, 1125	(DMSO-d6) δ : 2,39 (3H, s, H-a); 6,84 (1H, dt, J_0 : 7,7 Hz, J_m : 0,9 Hz y 1,2 Hz, H-6'); 7,23 (1H, t, J_0 : 8,3 y 7,7 Hz, H-5'); 7,34 (1H, J_0 : 8,3 Hz, J_m : 1,2 y 0,9 Hz, H-4'); 7,89 (1H, sa, H-2'); 12,48 (1H, s, COOH)	(DMSO-d6) δ : 12,0 (C-a); 97,2 (C-4); 115,5 (C-6'); 116,0 (C-2'); 120,0 (C-4'); 130,8 (C-5'); 133,9 (C-3'); 143,3 (C-3)*; 143,5 (C-1)*; 153,1 (C-5); 167,0 (C=O) * intercambiables.
	(KBr) ν_{max} : 3560-2400 banda ancha e intensa, 1640, 1585, 1570	(DMSO-d6) δ : 2,58 (3H, s, H-d); 7,49 (1H, d, J_0 : 8,9 Hz, H-8); 7,58 (1H, dd, J_0 : 8,9 y J_m : 2,2 Hz, H-7); 8,03 (1H, d, J_m : 2,2 Hz, H-5)	(DMSO-d6) δ : 12,2 (C-d); 106,5 (C-3a); 119,8 (C-5); 123,0 (C-4a); 124,7 (C-6); 125,2 (C-7); 132,8 (C-8); 140,7 (C-3); 141,6 (C-8a); 150,3 (C-9a); 174,6 (C-4)
	(KBr) ν_{max} : 3600-2000 banda ancha e intensa, 1660, 1500, 1455, 1420, 1320, 1120	(DMSO-d6) δ : 2,39 (3H, s, H-d); 7,14 (1H, d, J_0 : 8,0 Hz, H-4'); 7,44 (1H, t, J_0 : 8,0 Hz, H-5'); 7,68 (1H, d, J_0 : 8,0 Hz, H-6'); 8,20 (1H, s, H-2'); 8,63 (1H, s, NH); 12,57 (1H, sa, NH)	(DMSO-d6) δ : 12,0 (C-d); 97,3 (C-4); 112,6 (J: 4,1 Hz, C-4'); 116,1 (J: 4,1 Hz, C-2'); 120,6 (C-6'); 125,0 (J: 270,3 Hz, C-f); 130,2 (J: 31,0 Hz, C-3'); 130,3 (C-5'); 142,7 (C-1'); 143,3 (C-3); 153,1 (C-5); 166,9 (C-c)

* Intercambiables: No hay suficientes elementos de juicio para asignar la señal a un átomo específicamente.

Tabla III

Estructura y datos espectroscópicos de los compuestos 5-7

Compuesto	IR (cm ⁻¹)	RMN ¹ H (ppm)	RMN ¹³ C (ppm)
	(KBr) ν_{\max} : 3240-2000 banda ancha con máximos en 3040 y 2960, 1600 débil, 1555, 1240	(DMSO-d6) δ : 2,77 (3H, s, H-d); 7,59 (1H, t, J_{01} : 7,44, J_{02} : 7,27, H-6); 7,83 (1H, t, J_{01} : 7,3, J_{02} : 7,9, H-7); 7,99 (1H, d, J_0 : 8,6, H-5); 8,28 (1H, d, J_0 : 8,6, H-8); 13,41 (1H, s, NH)	¹³ C (DMSO-d6) δ : 15,4 (C-d); 113,8 (C-4a), 121,5 (C-3a), 124,6 (C-5); 125,2 (C-6); 128,7 (C-8); 131,6 (C-7); 136,0 (C-4); 141,7 (C-3); 149,0 (C-8a); 152,9 (C-9a)
	(KBr) ν_{\max} : 3600-2500 banda ancha poco intensa, 1605, 1560, 1220	---	---
	(KBr) ν_{\max} : 3600-2400, 1625, 1590, 1560, 1080	(DMSO-d6) δ : 2,77 (3H, s, H-d); 7,83 (1H, dd, J_0 : 9,2 y J_m : 2,3 Hz, H-7); 8,02 (1H, d, J_0 : 9,2 Hz, H-8); 8,26 (1H, d, J_m : 2,3 Hz, H-5)	(DMSO-d6) δ : 15,3 (C-a); 114,1 (C-4a); 122,1 (C-3); 123,0 (C-5); 129,8 (C-6); 131,0 (C-8); 132,0 (C-7); 135,1 (C-4); 141,9 ((C-3); 147,4 (C-8a); 153,1 (C-9a)
	(KBr) ν_{\max} : 3400-2500 banda ancha, 1620 débil, 1570, 1320, 1170, 1120	---	---

los derivados 5-CF₃ y 7-CF₃, **IR** en tabla III. Se decidió trabajar con la mezcla para la siguiente reacción.

Síntesis de la 4,6-dicloro-3-metil-1H-pirazolo(3,4-b)quinolina, **6b**

170 mg (0,73 mmoles) de la pirazoloquinolona **4c** se mezclaron con 10 mL de POCl₃. La mezcla se calentó a reflujo hasta que en el TLC con acetato de etilo/hexano (2/1), no se observó la mancha del reactivo de partida pero si la del producto. Se obtuvieron 130 mg (70,87%) de **6b**. Pf. 273-275 °C. Datos espectroscópicos en Tabla III.

Síntesis de las pirazoloquinolinas **8-13**

Síntesis de la 3-metil-4-dimetilaminoetilamino-1H-pirazolo(3,4-b)quinolina, **8**

Procedimiento general. Se mezclaron 125 mg (0,57 mmoles) del respectivo derivado clorado (4-Cl) y suficiente dimetilaminoetilamina para disolver el sólido de partida. Se calentó a 110 °C por 3 horas. Por adición de agua se obtuvo un sólido amarillo que pesó 137 mg (79,07%). Este compuesto fue recrystalizado en MeOH/agua. Pf. 240-242 °C. Datos espectroscópicos en la Tabla IV.

Síntesis de la 3-metil-4-dietilaminoetilamino-1H-pirazolo(3,4-b)quinolina, **9**

Se siguió el procedimiento del caso previo. Se aislaron 148 mg (86,50%) de sólido amarillo después de

recrystalizar en MeOH. Pf. 200-201 °C. Datos espectroscópicos en la Tabla IV.

Síntesis de la 3-metil-4-dimetilaminoetilamino-5-cloro-1H-pirazolo(3,4-b)quinolina, **10a** y la 3-metil-4-dimetilaminoetilamino-7-cloro-1H-pirazolo(3,4-b)quinolina, **10c**

El producto sólido de esta reacción fue purificado por CCPM, la columna fue eluida con CH₂Cl₂ y luego con CH₂Cl₂/MeOH, desde 1% hasta 20% de MeOH. En total se obtuvieron 78 mg de **10a** (25,67%) y 106 mg de **10c** (34,89%). El rendimiento de la reacción fue de 60,56% y la relación **10c/10a** fue de 1,36/1. Datos espectroscópicos en la Tabla IV..

6-cloro-4-dimetilaminoetilamino-3-metil-1H-pirazolo(3,4-b)quinolina, **10b**

Por adición de agua se formó precipitado amarillo claro. El producto fue recrystalizado en etanol/agua y se obtuvieron 70 mg (58,09%) de producto puro. Pf. 245-247 °C. Datos espectroscópicos en la Tabla IV.

3-metil-4-dietilaminoetilamino-5-cloro-1H-pirazolo(3,4-b)quinolina, **11a** 3-metil-4-dietilaminoetilamino-7-cloro-1H-pirazolo(3,4-b)quinolina, **11c**

Se obtuvieron por diferencia de solubilidad 51 mg de **11c** de un total de 160 mg de la mezcla sólida del crudo de reacción. El resto fue purificado por CCPM,

Tabla IV
Estructura y datos espectroscópicos de los compuestos 8-11b

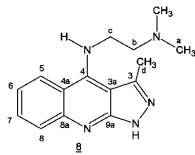
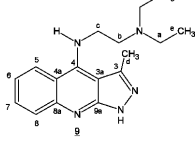
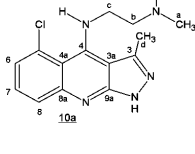
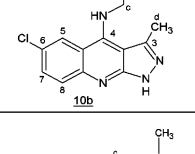
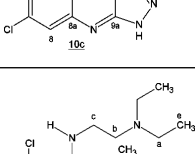
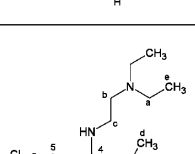

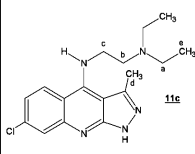
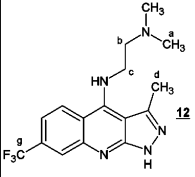
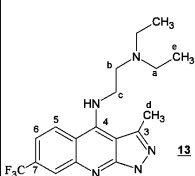
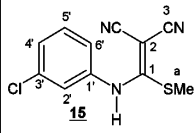
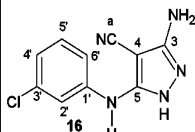
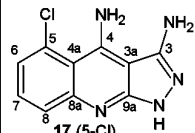
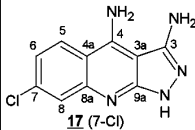
Compuesto	IR (cm ⁻¹)	RMN ¹ H (ppm)	RMN ¹³ C (ppm)
	(KBr) ν_{\max} : 3260, 3220-2000 ancha e intensa, 1605, 1570, 1610, 1260, 1235	(DMSO-d6) δ : 2,23 (6H, s, H-a); 2,60 (2H, t, H-b); 2,70 (3H, s, H-d); 3,81 (2H, c, H-c); 6,67 (1H, t, NH); 7,19 (1H, t, J _o : 6,6 y 8,6 Hz, H-6); 7,56 (1H, t, J _o : 6,6 y 8,6 Hz, H-7); 7,67 (1H, d, J _o : 8,6 Hz, H-8); 8,24 (1H, d, J _o : 8,6 Hz, H-5); 12,54 (1H, s, NH)	(DMSO-d6) δ : 17,3 (C-d); 45,2 (C-a); 46,5 (C-b); 58,7 (C-c); 102,9 (C-3a); 114,8 (C-4a); 120,3 (C-6); 125,1 (C-5); 128,2 (C-8); 130,0 (C-7); 140,8 (C-3); 150,0 (C-8a); 150,3 (C-9a); 155,1 (C-4)
	(KBr) ν_{\max} : 3400-2000 banda ancha e intensa, 1610, 1555, 1510, 1255	(DMSO-d6) δ : 0,95 (6H, t, H-e); 2,54 (4H, c, H-a); 2,71-2,75 (m, H-b, H-d); 3,81 (2H, c, H-c); 6,74 (t _d , 1H, NH); 7,18 (1H, t, J _o : 7,3 y 8,6 Hz, H-6); 7,55 (1H, t, J _o : 7,3 y 8,6 Hz, H-7); 7,66 (1H, d, J _o : 8,6 Hz, H-8); 8,25 (1H, d, J _o : 8,6 Hz, H-5); 12,55 (1H, s, NH)	(DMSO-d6) δ : 12,0 (C-e); 17,5 (C-d); 46,1 (C-a, C-b); 52,3 (C-c); 102,7 (C-3a); 114,6 (C-4a); 120,2 (C-6); 125,1 (C-5); 128,3 (C-8); 130,0 (C-7); 140,6 (C-3); 149,9 (C-8a); 150,4 (C-9a); 155,1 (C-4)
	(KBr) ν_{\max} : 3320 ancha, 3120 ancha, 2960, 2860, 2820, 2765, 1595, 1560	(DMSO-d6) δ : 2,30 (6H, s, H-a); 2,49 (3H, t, H-b); 2,76 (3H, s, H-d); 3,68 (2H, c, H-c); 7,19 (1H, dd, J _o : 7,4 Hz, J _m : 1,1 Hz, H-6); 7,41 (1H, dd, J _o : 7,4 y 8,4 Hz, H-7); 7,83 (1H, dd, J _o : 8,4 Hz, J _m : 1,2 Hz, H-8); 7,24 (1H, s, NH); 7,98 (1H, t, NH)	(DMSO-d6) δ : 18,1 (C-d); 45,0 (C-a); 48,3 (C-b); 58,6 (C-c); 103,6 (C-3a); 112,7 (C-4a); 124,0 (C-6); 127,1 (C-7); 129,2 (C-8); 129,4 (C-5); 142,0 (C-3); 150,8 (C-8a); 152,2 (C-4); 155,2 (C-4); 155,2 (C-9a)
	(KBr) ν_{\max} : 3500-2000 banda ancha e intensa; 1610 débil, 1575	(DMSO-d6) δ : 2,22 (6H, s, H-a); 2,60 (2H, t, H-b); 2,69 (3H, s; H-d); 3,81 (2H, sa, H-c); 6,81 (1H, sa, NH); 7,55 (1H, dd, J _o : 9,4 y J _m : 1,7 Hz, H-7); 7,67 (1H, d, J _o : 9,4 Hz, H-8); 8,33 (1H, d, J _m : 1,7 Hz, H-5)	(DMSO-d6) δ : 17,5 (C-d); 45,3 (C-a); 46,5 (C-b); 58,6 (C-c); 103,0 (C-3a); 115,3 (C-4a); 123,8 (C-5); 124,3 (C-6); 130,2 (C-8); 130,5 (C-7); 140,9 (C-3); 148,5 (C-8a); 149,4 (C-4); 155,3 (C-9a)
	(KBr) ν_{\max} : 3325, 3100, 2850, 2810, 2760, 1605, 1570	(DMSO-d6) δ : 2,24 (6H, s, H-a); 2,62 (3H, t, H-b); 2,68 (3H, s, H-d); 3,82 (2H, c, H-c); 6,83 (1H, s, NH); 7,16 (1H, dd, J _o : 9,1 Hz y J _m : 2,3 Hz, H-6); 7,65 (1H, d, J _m : 2,3 Hz, H-8); 8,29 (1H, d, J _o : 9,1 Hz, H-5); 12,65 (1H, s, NH)	(DMSO-d6) δ : 17,3 (C-d); 45,2 (C-a); 46,2 (C-b); 58,4 (C-c); 102,8 (C-3a); 113,3 (C-4a); 120,4 (C-5); 126,3 (C-6); 127,5 (C-8); 134,8 (C-7); 141,1 (C-3); 150,9 (C-8a); 150,2 (C-9a); 155,4 (C-4)
	(KBr) ν_{\max} : 3360, 3320, 3200-2000 ancha, 1620, 1595, 1540	(CDCl ₃) δ : 1,01 (6H, t, H-e); 2,59 (6H, C _{dist} , H-a, H-b); 3,68 (2H, c, H-c); 7,17 (1H, dd, J _o : 7,9 Hz y J _m : 1,2 Hz, H-6); 7,40 (1H, dd, J _o : 7,9 y 8,7 Hz, H-7); 7,86 (1H, dd, J _o : 8,66 Hz y J _m : 1,2 Hz, H-8); 8,11 (1H, as, NH)	(CDCl ₃) δ : 11,7 (C-e); 18,3 (C-d); 46,2 (C-a); 48,1 (C-b); 52,6 (C-c); 103,2 (C-3a); 112,6 (C-4a); 123,8 (C-6); 127,0 (C-7); 129,2 (C-8); 129,3 (C-5); 142,0 (C-3); 150,7 (C-8a); 152,2 (C-4); 155,5 (C-9a)
	(KBr) ν_{\max} : 3600-2000 banda ancha e intensa; 1600 débil; 1560; 1500	(DMSO-d6) δ : 0,93 (6H, t, H-e); 2,54 (4H, m, H-a, mezclada con señal de solvente); 2,69 (3H, s, H-d); 2,73 (2H, t, H-b); 3,79 (2H, sa, H-c); 6,85 ((1H, s, NH); 7,54 (1H, d, J _o : 9,3 Hz, H-7); 7,67 (1H, d, J _o : 9,3, H-8); 8,30 (1H, s, H-5); 12,66 (1H, s, NH)	(DMSO-d6) δ : 12,0 (C-e); 17,6 (C-d); 46,3 (C-a); 46,4 (C-b); 52,4 (C-c); 102,9 (C-3a); 115,2 (C-4a); 123,8 (C-5); 124,2 (C-6); 130,2 (C-7); 130,4 (C-8); 140,8 (C-3); 148,6 (C-8a); 149,4 (C-4); 155,3 (C-9a)

Tabla V
Estructura y datos espectroscópicos de los compuestos 8-11b

Compuesto	IR (cm ⁻¹)	RMN ¹ H (ppm)	RMN ¹³ C (ppm)
	(KBr) ν_{\max} : 3320, 3200-2300 ancha, 1605, 1575, 1505	(100 °C)(DMSO-d6) δ : 0,95 (6H, t, H-e); 2,55 (4H, c, H-a); 2,70 (3H, s, H-d); 2,75 (2H, t, H-b); 3,82 (2H, señal ancha y distorsionada, H-c); 6,84 (1H, sa, NH); 7,15 (1H, dd, J_o : 9,1 Hz y J_m : 2,1 Hz, H-6); 7,65 (1H, d, J_m : 2,1 Hz, H-8); 8,29 (1H, d, J_o : 9,1 Hz, H-5)	(DMSO-d6) δ : 12,1 (C-e); 17,1 (C-d); 46,7 (C-a, C-b); 52,9 (C-c); 103,3 (C-3a); 113,6 (C-4a); 120,8 (C-5); 126,4 (C-6*); 127,2 (C-8*); 134,8 (C-7); 141,0 (C-3); 150,3 (C-4); 51,1 (C-8a); 155,7 (C-9a) ppm. * intercambiables.
	(KBr) ν_{\max} : 3360, 2810, 1620 débil, 1580, 1340, 1300, 1150	(DMSO-d6) δ : 2,23 (6H, s, H-a); 2,61 (2H, t, H-b); 2,71 (3H, s, H-d); 3,85 (2H, sa, H-c); 6,96 (1H, sa, NH); 7,37 (1H, d, J_o : 8,8 Hz, H-6); 7,95 (1H, s, H-8); 8,49 (1H, d, J_o : 8,8 Hz, H-5)	(DMSO-d6) δ : 17,3 (C-d); 45,2* (C-a); 46,2* (C-b); 58,4 (C-c); 103,3 (C-3a); 114,7 (C-4a); 116,2 (C-6, no se observa acoplamiento); 124,5 (J: 270 Hz, C-g); 125,5 (J: 4,1 Hz, C-8); 127,5 (C-5); 130,1 (J: 34,1 Hz, C-7); 141,2 (C-3); 149,2 (C-8a); 150,0 (C-9a); 155,5 (C-4) ppm. * Intercambiables.
	(KBr) ν_{\max} : 3400-2200 ancha e intensa, 1610 débil, 1580, 1340 1300, 1125	(DMSO-d6) δ : 0,94 (6H, t, H-e); 2,54 (4H, c, H-a); 2,73 (3H, s, H-d); 2,75 (2H, t, H-b); 3,85 (2H, c, H-c); 7,00 (1H, t, NH); 7,36 (1H, dd, J_o : 8,9 Hz y J_m : 1,6 Hz, H-6); 7,95 (1H, s, H-8); 8,49 (1H, d, J_o : 8,9 Hz, H-5)	(DMSO-d6) δ : 12,0 (C-e); 17,4 (C-d); 46,1 (C-a, C-b); 52,2 (C-c); 103,2 (C-3a); 114,5 (C-4a); 116,1 (C-6, no se observa acoplamiento); 124,7 (J: 266 Hz, C-g); 125,5 (J: 4,6 Hz, C-8); 127,5 (C-5); 130,1 (J: 32,0 Hz, C-7); 141,1 (C-3); 149,3 (C-8a); 150,0 (C-9a); 155,4 (C-4)
	(KBr) ν_{\max} : 3200, 3040, 2955, 2200, 1580, 1520, 1240, 1090	(DMSO-d6) δ : 2,53 (3H, s, H-a); 7,24 (1H, cd, J_o : 8,2 y J_m : 2,0 Hz, H-6'); 7,37 (1H, t, J_m : 2,0 Hz, H-2'); 7,42 (1H, t, J_o : 7,9 y 8,2 Hz, H-5'); 10,56 (1H, sa, NH)	(DMSO-d6) δ : 16,3 (C-a); 53,6 (C-2); 115,8 (C-3); 122,8 (C-6'); 123,9 (C-4'); 126,5 (C-2'); 131,2 (C-3'); 133,9 (C-5'); 141,3 (C-1'); 171,8 (C-1)
	(KBr) ν_{\max} : 3440, 3370, 3340, 3120, 2200, 1620 débil, 1585, 1540, 1470	(DMSO-d6) δ : 6,36 (2H, s, NH); 6,79 (1H, d, J_o : 7,8 Hz, H-6') 7,18 (1H, t, J_o : 7,8 y 8,2 Hz, H-5'); 7,34 (1H, d, J_o : 8,2 Hz, H-4'); 7,71 (1H, s, H-2'); 8,67 (1H, s, NH); 11,24 (1H, s, NH)	(DMSO-d6) δ : 114,1 (C-a); 114,6 (C-4'); 116,0 (C-6'); 119,6 (C-2'); 129,6 (C-3'); 134,3 (C-5'); 144,0 (C-1'); 151,0 (C-3); 153,8 (C-5); ppm. No se observa C-4
	(KBr) ν_{\max} : 3480, 3370, 3320, 3160 1625, 1600, 1580	(DMSO-d6 + D2O) δ : 5,54 (2H, s, NH2); 7,12 (1H, d, J_o : 7,2 Hz, H-6); 7,39 (1H, t, J_o : 7,2 y 8,6 Hz, H-7); 7,49 (1H, d, J_o : 8,6 Hz, H-8); 11,57 (1H, sa, NH)	(DMSO-d6) δ : 95, 1 (C-3a); 109,6 (C-4a); 122,7 (C-6); 128,1 (C-7); 129,5 (C-8); 130,2 (C-5); 148,9 (C-3); 149,0 (C-8a); 152,7 (C-4); 154,1 (C-9a)
	(KBr) ν_{\max} : 3440, 3360, 3150, 1640, 1620, 1580	(DMSO-d6) δ : 5,62 (2H, s, NH2); 7,08 (1H, dd, J_o : 9,0 Hz y J_m : 2,0 Hz, H-6); 7,38 (2H, s, NH); 7,50 (1H, d, J_m : 2,0 Hz, H-8); 8,24 (1H, d, J_o : 9,0 Hz, H-5); 11,39 (1H, s, NH)	(DMSO-d6) δ : 93,5 (C-3a); 111,7 (C-4a); 119,5 (C-5); 125,6 (C-6); 126,031 (C-8); 134,9 (C-7); 148,3 (C-8a); 149,0 (C-3); 150,9 (C-4); 155,3 (C-9a)

* Intercambiables: No hay suficientes elementos de juicio para asignar la señal a un átomo específicamente.

Tabla VI
**Actividad biológica, *in vitro*,
 de los compuestos sintetizados**

compuesto	8	9	10a	10b	10c	11a	11b	11c	12	13	17	CQ
% inh. β - hematina	3	30	2	48	1	1	79	1	1	21	85	88

Tabla VII
**Actividad biológica de los compuestos
 con el mejor índice terapéutico**

compuesto	Estudio <i>in vitro</i>		Estudio <i>in vivo</i>		
	% inh. Formación de β -hematina*	Cl ₅₀ (mM)	Prueba de Peter's		
			% Parasitemia*	% inh. Parasitemia	% Días de Supervivencia*
Control sol. salina	-	-	17	-	8
11b	79	2,14	8	63	13
17	85	1,46	19	0	10
CQ	88	0,69	4	77	curación

* Los resultados se expresan como la media de 5 determinaciones

de donde se aislaron 75 mg de **11a** y otros 22 mg de **11c**. La relación de **11c/11a** fue aproximadamente 1. Datos espectroscópicos de **11a** se observan en la tabla IV y los de **11c** en la Tabla V.

6-cloro-4-dietilaminoetilamino-3-metil-1H-pirazolo(3,4-b)quinolina, 11b

El producto fue recristalizado en etanol/agua y se obtuvieron 70 mg (80,57%). Pf. 207-209 °C. Datos espectroscópicos en la Tabla IV.

4-dimetilaminoetilamino-3-metil-(7)-trifluorometil-1H-pirazolo(3,4-b)quinolina, 12

Se obtuvieron 354,3 mg (96,20%) de la mezcla correspondiente a los derivados 5-CF₃ y 7-CF₃. El sólido fue sometido a recristalización con metanol caliente, se aislaron 173 mg (46,97%) del compuesto marcado como **12** (7-Cl), El resto de la mezcla resultó difícil de separar. Solo se trabajó con el derivado 7Cl. Datos espectroscópicos en la Tabla V.

4-dietilaminoetilamino-3-metil-(7)-trifluorometil-1H-pirazolo(3,4-b)quinolina, 13

De nuevo, cuando se recristalizó con metanol, fueron aislados 123 mg de **13** y el resto igual que en el caso anterior, consistió de una mezcla de los isómeros esperados. Sólo se caracterizó al compuesto **13**, Pf. 205-206 °C, Datos espectroscópicos en la Tabla V.

2-ciano-3-metiltio-3-(m-cloroanilino)acrilonitrilo, 15

Se hicieron reaccionar 1,57 g (12,30 mmoles) de la m-cloroanilina con 2,10 g (12,30 mmoles) del bis(metiltio)metilenmalononitrilo en un balón de 100 cc. Se empleó como solvente piridina. La reacción se calentó a reflujo por 3 horas y luego el crudo fue vertido sobre hielo y HCl_(conc). Se extrajo con acetato de etilo y al evaporarlo se obtuvo un sólido amarillo, el cual fue posteriormente tratado con CH₂Cl₂ en caliente. Después de enfriar, se filtró y se obtuvieron 1,715 g (55,80%). De las aguas madre se obtuvieron 1,20 g adicionales. El rendimiento total fue de 94,80%. Pf. 168-171 °C, reportado 171-174 °C (Tominaga y col., 1990). Datos espectroscópicos en la Tabla V.

3-amino-4-ciano-5-(m-cloroanilino)-1H-pirazol, 16

500 mg (2,00 mmoles) del respectivo anilinoacrilonitrilo fueron disueltos en 30 mL de etanol y posteriormente se le añadieron 10 gotas del hidrato de hidracina. La solución se calentó a reflujo durante 1 hora y luego de enfriar se adicionó agua hasta la formación de un precipitado blanco. La recristalización de éste último en metanol/agua produjo 438 mg (93,70%) de sólido blanco que fundió a 200-202 °C, reportado 195-200 °C (Traxler y col., 1997). Datos espectroscópicos en la Tabla V.

7-cloro-3,4-diamino-1H-pirazolo(3,4-b)quinolina, 17

300 mg (1,28 mmoles) de **16** fueron mezclados con 1,00 g de PPA (ácido polifosfórico). La mezcla se calentó a 150 °C durante 5 horas. En esta oportunidad el aislamiento y purificación de los productos resultó un poco difícil. Fue necesario utilizar cantidades pequeñas de trietilamina en combinación con diclorometano y metanol (0,5/50/10) para la purificación por cromatografía de columna. Se aislaron 110 mg (36,60%) del derivado 17 (5-Cl) y 78 mg (26,00%) del correspondiente 17 (7-Cl). Se obtuvo un rendimiento total de 62,60%. Datos espectroscópicos de 17 (5-Cl) y 17 (7-Cl) se observan en la tabla V.

BIOLOGÍA

Inhibición de la Formación de β -hematina

Se empleó el protocolo descrito por Baelmans (2000). Los resultados fueron expresados como el porcentaje de inhibición de la formación de β -hematina. Las drogas que produjeron, al menos, 50% de inhibición de la formación de hemozoína fueron incluidas en el estudio de actividad antimalárica *in vivo* mediante la prueba de Peter

Test Supresivo de 4 días (Prueba de Peter)

Se utilizaron ratones machos NIH (18 - 22g) obtenidos en el Bioterio del Instituto Nacional de Higiene «Rafael Rangel», mantenidos a temperatura ambiente alimentados con Ratarina® y agua *ad libitum*. Se siguió técnica desarrollada por Peter (1999). El tiempo de sobrevivencia después de la infección fue comparado con los ratones de control. Los datos obtenidos fueron estadísticamente analizados usando *t*-tests para comparaciones de grupos específicos, asumiendo 95% de confianza de acuerdo al software SigmaPlot SPW11, versión de prueba (SigmaPlot, 11.0). Los resultados de las evaluaciones biológicas, tanto *in vitro* como *in vivo*, se presentan en las Tablas VI y VII.

Resultados y discusión

Se logró la síntesis de los compuestos objetivo con buenos rendimientos. La obtención del intermedio clorado **6b** se hizo desde la pirazoloquinolona **4c**, mientras que los derivados clorados, **5**, **6a**, **6c** y **7**, fueron sintetizados desde los intermediarios ácidos **4a**, **4b** y **4d**, respectivamente. La preferencia por los intermediarios ácidos fue debida a las dificultades encontradas durante el aislamiento y purificación de la pirazoloquinolona **4c**. Por su parte, los resultados biológicos muestran que los compuestos **11b** y **17** son buenos inhibidores de la formación de β -hematina en ensayos *in vitro*, a pesar de que requirieron concentraciones inhibitorias (CI_{50}) mayores a las de cloroquina. De las concentraciones inhibitorias, puede notarse que **17** requirió el doble de concentración en relación a cloroquina, sin embargo, en los estudios *in vivo*, Test de Peter, **17** fue incapaz de reducir la parasitemia en relación al grupo control, esto probablemente debido a que sus propiedades farmacocinéticas no son del todo adecuadas para ubicarse en el interior de la vacuola digestiva de *P. falciparum*. La baja lipofilia de **17**, $\log P$: 1,57 (ACD/LABS 12.0), y esperada ionización en los distintos fluidos del organismo además de su elevada tendencia a formar puentes de hidrógeno, tal vez impidan que **17** pueda situarse, a concentraciones inhibitorias adecuadas, dentro de la vacuola digestiva. Los resultados de **11b** muestran que este compuesto redujo la cristalización de la hematina en un 79% y a su vez fue capaz de reducir la parasitemia en 53%. La limitación observada con **11b** fue que su CI_{50} resultó al menos tres veces mayor al de cloroquina, lo cual dificultaría su posible uso como antimalárico, ya que se requerirían elevadas concentraciones para alcanzar una buena acción biológica. Desde el punto de vista estructural, los derivados de las 3-metilpirazoloquinolinas con el átomo de cloro en el carbono C-6 fueron

las mejores inhibidoras durante el ensayo de cristalización. Este es un resultado interesante debido a que es bien conocido, en cloroquina y derivados, que el átomo de cloro en el carbono C-7 de la quinolina es imperativo para la actividad antimalárica de estos compuestos. De hecho, el derivado de la 3-aminopirazoloquinolona, **17**, la cual tuvo una acción inhibitoria del proceso de cristalización parecida a la de cloroquina, tiene un átomo de cloro en el carbono C-7 del núcleo de la pirazoloquinolona. Este último resultado parece indicar que a diferencia del grupo metilo ubicado en el carbono C-3, compuestos **8-13**, el grupo amino ubicado en la misma posición en combinación con el átomo de cloro en carbono C-7, compuesto **17**, le confiere al núcleo de las pirazoloquinolinas las características electrónicas necesarias para interactuar con el grupo porfirínico de la hematina, lo cual se traduciría en una inhibición de la formación de la β -hematina, que es lo requerido para una adecuada acción antimalárica. Para esclarecer estas ideas relacionadas con el núcleo de la pirazoloquinolona, sería necesario sintetizar y evaluar biológicamente un derivado de **17** en donde el átomo de cloro esté ubicado en el carbono C-6. Por otra parte, la principal diferencia estructural entre los compuestos sintetizados y cloroquina radica en la cadena lateral de diaminoalcano, la cual le otorga a cloroquina una mayor lipofilia, $\log P$ 4,59, en comparación con nuestros compuestos, $\log P$ 1,5-3,2 (ACDLABS 12.0). Es probable que esta diferencia sea la responsable del mejor índice terapéutico mostrado por cloroquina en relación con los compuestos sintetizados durante los ensayos *in vivo*.

Conclusión

Los resultados de esta investigación muestran a las pirazoloquinolinas como potenciales antimaláricos. La trascendencia de estos resultados radica que en lo sucesivo será necesario sintetizar derivados de **17** y **11b** con la inclusión de una cadena de diaminoalcano igual o parecida a la de cloroquina en el carbono C-4 de la pirazoloquinolona, esto con la finalidad de elevar la lipofilia, por tanto el $\log P$, de este tipo de compuestos y así esperar una mejor distribución en el organismo durante los ensayos *in vivo*. Es probable que la mayor lipofilia de cloroquina en comparación con **17** y **11b**, sea la responsable de su mayor actividad antimalárica *in vivo*.

Agradecimiento

Al Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACIT) por el financiamiento otorgado a través del proyecto FONACIT-UCV G-2005000397.

Referencias bibliográficas

ACDLABS 12.0, <http://www.acdlabs.com/>

- Baelmans R, Dehara E, Muñoz V, Sauvain M, Ginsburg T. 2000. Experimental conditions for testing the inhibitory activity of chloroquine on the formation of β -hematin. *H Exp Parasitol* 96: 243-248.
- Commission on Life Sciences, National Research Council, 1996, Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Academy Press, Washington, D.C. 21-55.
- Coppens I, Vielemeyer O. 2005. Insights into unique physiological features of neutral lipids in apicomplexa: from storage to potential mediation in parasite metabolic activities. *Int J Parasitol* 35: 597-615.
- Fitch CD, Cai GZ, Chen YF, Shoemaker JD. 1999. Involvement of Lipids in Ferriprotoporphyin IX Polymerization in Malaria. *Biochim Biophys Acta* 1454: 31-37.
- Francis S, Gluzman I, Oksman A, Knickerbocker A, Mueller R, Bryant M, Sherman D, Russell D, Goldberg D. 1994. Molecular characterization and inhibition of a Plasmodium falciparum aspartic hemoglobinase. *EMBO* 13: 2: 306-317.
- Gamboa de DN, Rosenthal PJ. 1996. Cysteine proteinase inhibitors, block early steps in hemoglobin degradation by cultured malaria parasites. *Blood* 87: 10: 4448-4454.
- Goldberg D, Slater A, Beavis R, Chait B, Cerami A, Henderson G. 1991. Hemoglobin Degradation in the Human Malaria Pathogen Plasmodium falciparum: a catabolic pathway initiated by a specific aspartic protease. *J Exp Med* 173: 961-969.
- Nolan GS, Briones N, Sullivan Jr DJ. 2003. The Shape and Size of Hemozoin Crystals Distinguishes Diverse Plasmodium Species. *Mol Biochem Parasitol* 130: 91-99.
- Peters W, Robinson BL. Parasitic Infection Models. In Handbook of Antimalarial Models of Infection, Zak, O., Sande, M., Eds.; Academic Press: London, 1999. pp. 757.
- Pisciotta JM, Coppens I, Tripathi AK, Scholl PF, Shuman J, Bajad S, Shulaev V, Sullivan DJ Jr. 2007. The role of neutral lipid nanospheres in Plasmodium falciparum haem crystallization. *Biochem J* 402: 197-204.
- Pretsch E, Clerc T, Seibl J, Simon W. 1980. Tablas para la elucidación estructura de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos, Eds: Alhambra.
- SigmaPlot, Exact Graphs And Data Analysis, Systat Software Inc., version trial, 11.0.
- Rosenthal P, Mc Kerrow J, Aikawa M, Nagasawa H, Leech J. 1988. A Malarial Cysteine is Necessary for Hemoglobin Degradation by Plasmodium falciparum. *J Clin Invest* 82: 1560-66.
- Rosenthal P, McKerrow J, Rasnick D, Leech J. 1989. Plasmodium falciparum: inhibitors of lysosomal cysteine proteinases inhibit a trophozoite proteinase and block parasite development. *Molecular Biochem Parasitol* 35: 177-184.
- Sullivan Jr. D, Gluzman I, Goldberg D. 1996. Plasmodium Hemozoin Formation Mediated by Histidine-Rich Proteins. *Science*. 271: 219-222.
- Tominaga Y, Honkawa Y, Hara M, Hosomi A. 1990. Synthesis of pyrazolo(3,4-d)pyrimidine derivatives using ketene dithioacetals. *J. Heterocycl. Chem* 27(3):775 - 783.
- Traxler P, Bold G, Frei J, Lang M, Lydon N, Mett H, Buchdunger E, Meyer T, Mueller M, Furet P. 1997. Use of a Pharmacophore model for the design of EGF-R tyrosine kinase inhibitors: 4-(phenylamino)pyrazolo(3,4-d) pyrimidines. *J Med Chem* 40(22): 3601-3616.
- Vander Jagt D, Hunsaker L, Campos N. 1987. Comparison of Proteases from Chloroquine-Sensitive and Chloroquine-Resistant Strains of Plasmodium falciparum. *Biochem. Pharmacology* 36: 3285-91.
- Weekly Epidemiological Record. 1997. WHO. 72: 269-292.
- World Malaria Report 2008. Geneva, WHO.
- World Malaria Report 2009. Geneva, WHO.