

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA



“SÍNTESIS DE UN GRUPO DE DERIVADOS DE LA 3-AMINO-4-DIALQUILAMINOALQUIL- 6-METILPIRAZOLOQUINOLINA COMO POTENCIALES ANTIMALÁRICOS”.

Trabajo Especial de Grado presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela, por la Br. María Gabriela Natali M., para optar al título de Licenciada en Química.

Caracas, octubre de 2012.



Yo Dr. Carlos Márquez, Investigador del Laboratorio de Química Medicinal y Síntesis Orgánica de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela y el Dr. Wilmer Guzmán, Investigador del Laboratorio de Química de la Escuela de Bioanálisis, de la Facultad de Medicina, de la Universidad Central de Venezuela.

Certificamos que, el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

"SÍNTESIS DE UN GRUPO DE DERIVADOS DE LA 3-AMINO-4-DIALQUILAMINOALQUIL- 6-METILPIRAZOLOQUINOLINA COMO POTENCIALES ANTIMALÁRICOS".

ha sido revisado por nosotros y el mismo cumple con los requisitos establecidos en las normativas internas de la CTEG de la Escuela de Química y por ello autorizamos su presentación.

Carlos Márquez

(Tutor)

Wilmer Guzmán

(Tutor)



Yo Dr. Carlos Márquez, Investigador del Laboratorio de Química Medicinal y Síntesis Orgánica de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela y yo, Dr. Wilmer Guzmán Investigador del Laboratorio de Química de la Escuela de Bioanálisis, de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela.

Certificamos que, el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

"SÍNTESIS DE UN GRUPO DE DERIVADOS DE LA 3-AMINO-4-DIALQUILAMINOALQUIL-6-METILPIRAZOLOQUINOLINA COMO POTENCIALES ANTIMALÁRICOS".

Que presenta la Br. María Gabriela Natali, para aspirar al título de Licenciado en Química, ha sido realizado en el Laboratorio de Química de la Escuela de Bioanálisis y en el Laboratorio de Química Medicinal y Síntesis Orgánica de la Escuela de Química en el de la Universidad Central de Venezuela, bajo nuestra dirección, durante los años 2011 y 2012, y con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, 30 de octubre de 2012

Carlos Márquez

(Tutor)

Wilmer Guzmán

(Tutor)

Jurado 1

María Rodríguez

Jurado 2

Carmen Carolla



RESUMEN

Dado el desarrollo de resistencia, que ocurre desde 1960 en América, por parte del parásito que causa la malaria a los medicamentos que se utilizan comercialmente para su tratamiento en la actualidad, se propuso la síntesis de derivados de la 3-amino-4-dialquilaminoalquil-6-metilpirazoloquinolina que pudiesen actuar como antimaláricos. Donde el paso determinante corresponde a la ciclación del 3-amino-5-(*p*-toluidin)-1*H*-pirazolo-4-carboxilato de etilo. Para lo cual se intentó su previa hidrólisis ácida con H_2SO_4 en EtOH- H_2O (4:1) y la hidrólisis básica con NaOH en dos condiciones: una mezcla de CH_2Cl_2 - MeOH (9:1) y en una mezcla de EtOH- H_2O (8:2). También se intentó la ciclación directa con POCl_3 y la posible formación de la 3-amino-6-metil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]quinol-4(9*H*)-ona a partir, tanto de difeniléter como de ácido polifosfórico (PPA).

De la reacción con PPA se obtuvo un sólido que a partir de la evidencia obtenida, se propone como el producto de descarboxilación del 3-amino-5-(*p*-toluidin)-1*H*-pirazolo-4-carboxilato de etilo, con un rendimiento del 19,61%.

“No hay que olvidar que cuando se descubrió el radio, nadie sabía que resultaría útil en los hospitales. El trabajo era ciencia pura. Y esto es una prueba de que el trabajo científico no debe considerarse desde el punto de vista de la utilidad directa de la misma. Se debe hacer por sí mismo, por la belleza de la ciencia y, a continuación, siempre existe la posibilidad de que un descubrimiento científico puede llegar a ser, como el radio, un beneficio para la humanidad”

Marie Curie (1867 – 1934)



ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.	3
II.1. MALARIA	3
II.1.2. MALARIA EN EL MUNDO.	5
II.1.3. MALARIA EN VENEZUELA	7
II.2. CICLO DE VIDA DEL PARÁSITO.	9
II.3. CLASIFICACIÓN DE LA MALARIA	13
II.4. CONTROL DE LA ENFERMEDAD	15
II.5. QUIMIOTERAPIA	18
II.6. ANTIMALÁRICOS COMUNES	19
II.7. DEGRADACIÓN DE LA HEMOGLOBINA Y FORMACIÓN DEL PIGMENTO MALÁRICO	27
II.8.MECANISMO DE ACCIÓN DE LA CLOROQUINA	32
II.8.1. RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD DE LA CLOROQUINA	35
III. ANTECEDENTES	37
III.1. SÍNTESIS PREVIAS	37
III.2. SÍNTESIS PREVIAS REALIZADAS EN EL LABORATORIO	41
IV. OBJETIVO	44
V. PARTE EXPERIMENTAL	45
V.1. ANÁLISIS RETROSINTÉTICO	45
V.2. RUTA SINTÉTICA PROPUESTA	46



V.3. RUTA SINTÉTICA	47
V.4. MATERIALES	48
V.4.1. REACTIVOS	48
V.4.2. SOLVENTES	49
V.5. MÉTODOS DE CARACTERIZACION	50
V.6. MÉTODOS DE SÍNTESIS	51
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
VII. CONCLUSIÓN	77
VIII. RECOMENDACIONES	78
IX. BIBLIOGRAFÍA	80
X. ANEXOS	87



ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 2.1. Malaria, países endémicos	6
FIGURA 2.2. Áreas de riesgo de malaria en Venezuela	7
FIGURA 2.3. Ciclo de vida del <i>Plasmodium</i>	9
FIGURA 2.4. Ciclo epidemiológico de la malaria	15
FIGURA 2.5. Grupos Heme	27
FIGURA 2.6. Hematina (Hidroxiferriprotoporfirina IX)	28
FIGURA 2.7. Estructura molecular de la hemozoína/ β -hematina	29
FIGURA 2.8. Representación esquemática del proceso propuesto en la formación de la hemozoína	31
FIGURA 2.9. Relación estructura –actividad de la cloroquina	36
FIGURA 6.1. Interacción vía puente de hidrógeno en el isómero 5	65
FIGURA 6.2. Posibles productos colaterales en la reacción con POCl_3	69
FIGURA 6.3. Deslocalización de la carga en el 3-amino-5-(<i>p</i> -toluidin)-1 <i>H</i> -pirazolo-4-carboxilato de etilo	71



ÍNDICE DE ESQUEMAS

ESQUEMA 3.1. Síntesis de Stein, R. y colaboradores	37
ESQUEMA 3.2. Síntesis de Helal, M. y colaboradores	38
ESQUEMA 3.3. Síntesis de Thakor, S. y colaboradores	39
ESQUEMA 3.4. Síntesis de Afghan, A. y colaboradores (estrategia 1)	40
ESQUEMA 3.5. Síntesis de Afghan, A. y colaboradores (estrategia 2)	40
ESQUEMA 3.6. Síntesis general realizada previamente	42
ESQUEMA 3.7. Síntesis de Guzmán, W. y colaboradores (estrategia 1)	43
ESQUEMA 3.8. Síntesis de Guzmán, W. y colaboradores (estrategia 2)	43
ESQUEMA 5.1. Retrosíntesis de la propuesta	45
ESQUEMA 5.2 Ruta sintética propuesta	46
ESQUEMA 5.3. Ruta sintética	47
ESQUEMA 6.1. Síntesis del 2-ciano-3,3-bis(metiltio)acrilato de etilo	59
ESQUEMA 6.2. Modificación de la reacción de Söderback	61
ESQUEMA 6.3. Síntesis del 3-amino-5-(<i>p</i> -toluidin)-1 <i>H</i> -pirazolo-4-carboxilato de etilo y la 4-ciano-5-(<i>p</i> -toluidin)-3-pirazolona	64
ESQUEMA 6.4. Intento de síntesis de la 3-amino-4-cloro-6-metil-1 <i>H</i> -pirazolo[3,4- <i>b</i>]quinolina	66



ESQUEMA 6.5. Intento de síntesis del ácido 3-amino-5-(<i>p</i> -toluidin)-1H-pirazolo-4-carboxílico	70
ESQUEMA 6.6. Intento de síntesis de la 3-amino-6-metil-1H-pirazolo[3,4- <i>b</i>]quinol-4(9H)-ona	72
ESQUEMA 6.7. Posible mecanismo de descarboxilación del 3-amino-5-(<i>p</i> -toluidin)-1H-pirazolo-4-carboxilato de etilo	76
ESQUEMA 8.1. Ruta sintética, propuesta 1	78
ESQUEMA 8.2. Ruta sintética, propuesta 2	79



ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 5.1. Reactivos utilizados	48
TABLA 5.2. Solventes utilizados	49
TABLA 6.1. Síntesis del 2-ciano-3,3-bis(metiltio)acrilato de etilo, reacción de Söderback	60
TABLA 6.2. Síntesis del 2-ciano-3,3-bis(metiltio)acrilato de etilo a partir de la modificación de la reacción de Söderback	62
TABLA 6.3. Resultados del intento de síntesis con POCl_3	67
TABLA 6.4. Resultados del intento de síntesis de la 3-amino-6-metil-1 <i>H</i> -pirazolo[3,4- <i>b</i>]quinol-4(9 <i>H</i>)-ona usando PPA	73



I. INTRODUCCIÓN.

La malaria es una enfermedad parasitaria, también conocida como paludismo, que se piensa se originó en África ^[1], el cual es actualmente uno de los continentes más afectados por la misma. Sin embargo, la mitad de la población mundial, aproximadamente 2.500 millones de personas, viven en riesgo de adquirirla ^[2]; constituyendo un problema de salud mayor en gran parte de los países tropicales y subtropicales. El Centro de Control de Enfermedades de los Estados Unidos (C.C.E.) calcula que cada año se presentan entre 300 a 500 millones de casos de malaria, de los cuales más de un millón de personas mueren, en su mayoría niños menores de 5 años ^[3]. En Venezuela se presenta actualmente un aumento del 20,8 % en los casos de malaria respecto a los casos presentados hasta el mes de marzo de 2011^[4], manteniendo al país en alerta epidemiológica desde julio de 2010 ^[5]. A pesar del esfuerzo por reducir la transmisión e incrementar el tratamiento, ha habido muy poco cambio en las zonas que se encuentran en riesgo de la enfermedad desde 1992 ^[6]. De hecho, si la prevalencia de la malaria continúa en su curso de permanente aumento, la tasa de mortalidad puede duplicarse en los próximos veinte años ^[7].

A pesar de no tratarse de una enfermedad nueva, el problema principal es atribuido al desarrollo de cepas del parásito responsable de la enfermedad, *Plasmodium*, resistentes al principal antimalárico: cloroquina ^[8], una 4-aminoquinolina. Hasta la fecha, una opción alternativa terapéutica, eficaz para el tratamiento de la malaria resistente, está representada por el endoperóxido natural: artemisinina y sus derivados semisintéticos ^[9]. Sin embargo, la resistencia del parásito a los fármacos antipalúdicos y la resistencia del mosquito a los insecticidas constituyen grandes amenazas para la lucha contra el paludismo a escala mundial. La correcta vigilancia de la eficacia de los medicamentos en países endémicos, respaldada por la Organización Mundial de la Salud (O.M.S.), ha deparado los primeros datos indicativos de resistencia



a las artemisininas, lo que ha llevado a encabezar una importante iniciativa para detener la aparición de resistencias, que se deben sobre todo al hecho de que se siga utilizando monoterapia de artemisinina. Aunque la O.M.S. ha apelado a poner fin al uso de éstas, en muchos países se siguen usando. Por ello se ha optado por la combinación de los principales medicamentos con algunos de sus derivados sintéticos más efectivos para tratar la enfermedad ^[10].

A pesar de los esfuerzos combinados de muchos países para erradicar la malaria, ésta infección sigue siendo una de las más devastadoras en el mundo, reclama muchas vidas y el costo que representa tratar y prevenir la enfermedad impone una carga económica tremenda en los países afectados, que en su mayoría son pobres ^[11]. Esto indica que todavía se necesitan fármacos, insecticidas y vacunas; todos ellos prácticos, eficaces, inocuos y económicos, para combatir el paludismo. En la década de 1950, se produjo la aparición de resistencia a insecticidas y medicamentos antipalúdicos, como la cloroquina y desde 1960, ha aumentado la transmisión en muchas regiones en las que la infección es endémica, al igual que sucede con la magnitud de la resistencia a medicamentos ^[12].

A consecuencia de la constante problemática que presenta el tratamiento y control de la enfermedad, se plantea la síntesis de derivados del tipo 3-amino-4-dialquilaminoalquil-6-metilpirazoquinolina como potenciales compuestos antimaláricos de acción esquizonticida, para el tratamiento alternativo de infecciones que presentan resistencia a la cloroquina.



II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

II.1. Malaria

También conocida como paludismo o fiebre palúdica, es una enfermedad infecciosa que probablemente se originó en África y acompañó las migraciones humanas a las orillas del Mediterráneo, a la India y al Asia Sur-Oriental. En el pasado, la malaria era común en las áreas pantaneras de Roma y por ende su nombre se deriva del italiano, mal-aria o "mal aire"^[1]. Es producida por protozoarios del género *Plasmodium* y es adquirida principalmente de forma natural por la picadura del mosquito hembra del género *Anopheles* ^[13].

Existen más de 150 especies de *Plasmodium* que infectan diferentes vertebrados ^[2]. En el hombre es causada, principalmente, por cuatro especies: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* y *Plasmodium malariae*. Aunque el *P. vivax* es el responsable de la mayoría de la infecciones, la forma más severa de la enfermedad es causada por el *P. falciparum* ^[14].

Los síntomas que se pueden presentar en el individuo afectado incluyen fiebre, escalofríos, sudoración y dolor de cabeza. En ciertos casos, puede producir ictericia, defectos de la coagulación sanguínea, shock, insuficiencia renal o hepática, trastornos del sistema nervioso central y coma. Los ciclos de escalofríos, fiebre y sudoración que ocurren cada uno, dos o tres días, son un buen indicador de malaria en una persona que haya regresado recientemente de una región tropical ^[15], ya que dicha enfermedad es potencialmente letal para aquellos individuos no inmunes que visitan dichas regiones ^[16].



La enfermedad también puede ser adquirida por transfusiones de sangre infectada; congénitamente de algunas madres a sus hijos cuando nacen o justo antes de nacer en infecciones de *P. vivax* ^[17].

La malaria puede ser vista en términos de ser estable (endémica) o inestable (una epidemia). Cuando es endémica se refiere a una situación en la que hay una incidencia medible de transmisión natural durante varios años. Diferentes áreas pueden experimentar diferentes niveles de las tasas de incidencia y esto se denota a menudo por: mesoendémica, hipoendémica, hiperendémica, y holoendémicas. Cuando se trata de una epidemia, se refiere a un aumento de la malaria en las zonas de baja endemicidad o brotes en áreas previamente sin malaria o entre personas no-inmunes. Estos brotes generalmente se pueden atribuir a los cambios en el comportamiento humano o efectos sobre el medio ambiente. Por ejemplo, la migración humana y el reasentamiento pueden introducir la malaria en una zona o exponer a una población no inmune previamente, a la transmisión endémica ^[18].



II.1.2. MALARIA EN EL MUNDO.

Para 2008, fueron notificados 172.997.420 casos de la enfermedad a nivel mundial ^[19]. Sin embargo se calcula que para 109 países con malaria endémica (Figura 2.1), de los cuales, 45 se encuentran en la región africana, hubo 243 millones de casos de malaria que causaron 863.000 defunciones, en su mayoría de niños menores de 5 años. De ellos el 90% corresponden a la región sub-sahariana ^[10]. La enfermedad fue también común en muchas zonas templadas incluyendo los EE.UU., Europa y el norte de Eurasia y Asia, pero ha sido erradicada. En muchas zonas donde anteriormente la enfermedad estaba bajo control, se está experimentando un resurgimiento ^[20].

En América, el número de casos oscila entre uno y cuatro millones por año, con una tasa de incidencia de más de 430 casos por cada 100.000 habitantes. Muchos de estos casos corresponden a adultos expuestos a la infección por razones de tipo profesional o turístico. Debe destacarse que en Latinoamérica, a diferencia de lo que ocurre en África, el riesgo de infección para los visitantes a áreas urbanas en general y especialmente a aquellas ubicadas por encima de los 800 metros de altura, es extremadamente bajo ^[16].

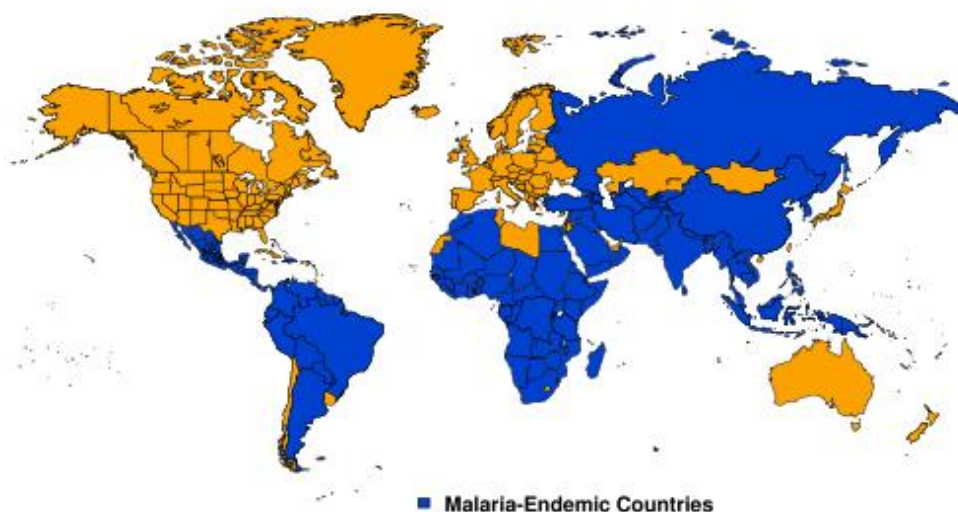


Figura 2.1. Malaria. Países endémicos ^[21].

Pese al aumento del suministro, en casi todo el mundo, de la cantidad de mosquiteros tratados con insecticida, disponibles en 2008, estuvo muy por debajo de las necesidades. Creció la adquisición de medicamentos antipalúdicos a través de los servicios de salud pública, pero el acceso al tratamiento, en particular a la terapia combinada basada en artemisinina, fue insuficiente en todos los países estudiados en 2007 y 2008. No obstante, hay indicios de que 9 países africanos y 29 países de otros continentes van en camino de alcanzar la meta de los ODM (*Objetivo de desarrollo del milenio*) relativa a la reducción de la carga de malaria propuesta por la O.M.S. ^[19]

II. 1.3. Malaria en Venezuela.

En Venezuela, se han reportado 10.623 casos hasta marzo de 2012, lo que representa un aumento del 20,8 % con respecto al período homólogo del año anterior que presentó 8.796 casos. La Incidencia Parasitaria Anual (IPA) del país es actualmente de 8,8 por cada 1.000 habitantes de la población, con base a la población expuesta a riesgo, en municipios a los cuales, por investigación, se les haya atribuido transmisión malárica durante el año. En general, estamos en situación de alarma para ésta enfermedad ^[4]. En base a los boletines epidemiológicos de los últimos años ^[4,22] se puede notar una tendencia al aumento en casos de malaria del país, obteniéndose así 45.155 casos en el 2010, mientras que en el año 2011 se reportó un total de 45.753 casos.

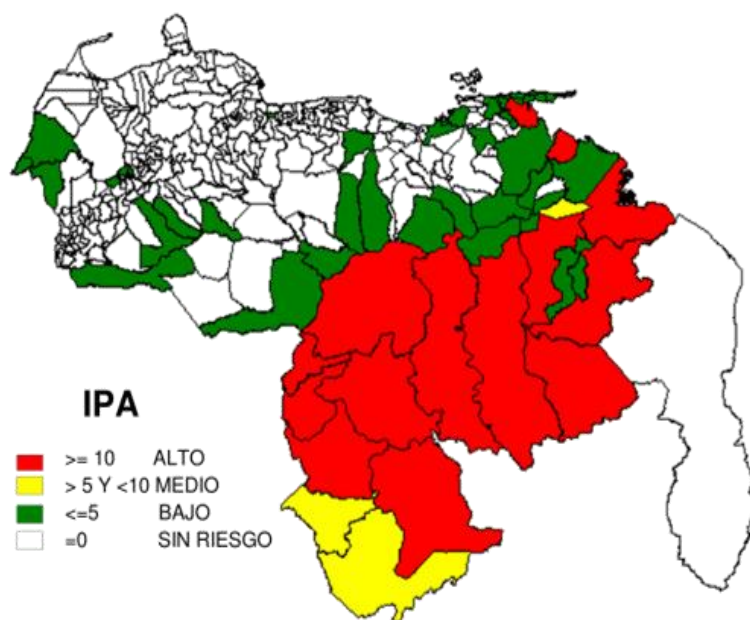


Figura 2.2. Áreas de riesgo de malaria en Venezuela según el IPA hasta la semana epidemiológica 52 de 2011^[22]



La figura 2.2 muestra las áreas de riesgo del país según su IPA, donde se puede observar que los estados Bolívar, Amazonas, Delta Amacuro y Sucre poseen la mayor incidencia, en especial el estado Bolívar que reporta el 93,9% de la casuística nacional. Sin embargo; los estados Zulia, Apure, Monagas y Anzoátegui también se encuentran entre los estados donde ocurren habitualmente casos de infección con malaria, reportando para el final del 2011: 151,32, 79 y 43 casos respectivamente ^[22].

La mayoría de las infecciones actuales en el país, son causadas por el *P. vivax* con un 80,2%, mientras que el 17,4% corresponde al *P. falciparum* y algunas son infecciones mixtas de *P. vivax* y *P. falciparum*, con un 2,4% ^[4].

II.2.CICLO DE VIDA DEL PARÁSITO.

A través del estudio del ciclo de desarrollo del *Plasmodium* (Figura 2.3) se pueden conocer los sitios de acción de las drogas antimaláricas. Éste es diverso y comprende varias etapas en dos ciclos de vida interdependientes: uno es el ciclo sexual o esporogónico, que ocurre en el mosquito, y el otro corresponde al ciclo asexual o esquizogónico, el cual se produce dentro del huésped humano. Además, el ciclo asexual del parásito consiste en una fase externa al eritrocito, denominada fase pre-eritrocítica, y una fase dentro de él, o fase eritrocítica ^[11].

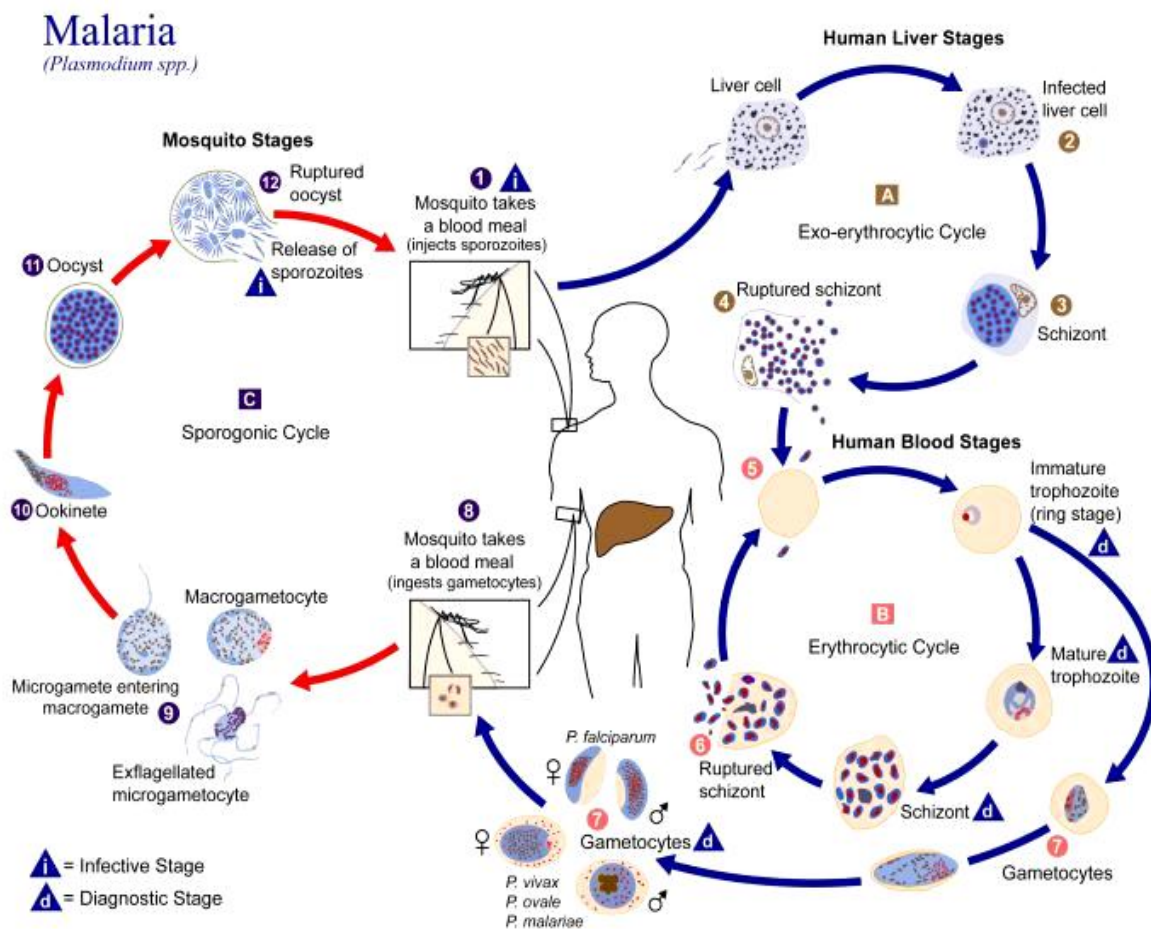


Figura 2.3. Ciclo de vida del *Plasmodium* ^[23].



- **Ciclo asexual o esquizogónico**

El ciclo en el hombre comienza con la penetración intracapilar de los esporozoítos a través de la piel. Estas formas parasitarias fusiformes y móviles, pasan rápidamente a la circulación, donde permanecen alrededor de 30 minutos antes de invadir los hepatocitos ^[24].

a) Etapa pre-eritrocítica: representada como A en la figura 1.3, se inicia con la penetración de los esporozoítos a los hepatocitos. Dentro de cada hepatocito parasitado se forma el esquizonte primario, constituido por múltiples núcleos con su correspondiente citoplasma. Este esquizonte madura y deforma la célula hepática. Después de 6 a 12 días, ésta sufre ruptura, y libera miles de merozoítos, los cuales van a la circulación para invadir los eritrocitos. En los *P. ovale* y *P. vivax* algunas formas se desarrollan muy lentamente en el hígado y pueden permanecer latentes por varios meses, por lo cual se han llamado hipnozoítos. Cuando éstos salen tardíamente a la circulación se producen recaídas. Esto no sucede con *P. falciparum* y *P. malariae* ^[23].

b) Etapa eritrocítica: los merozoítos procedentes de esquizontes tisulares invaden los eritrocitos, en donde toman inicialmente forma anillada, denominada trofozoítos, que al madurar adquieren una configuración irregular. En ésta etapa el parásito utiliza la hemoglobina del hospedador para su nutrición, por un lado degrada la globina mientras que por el otro elimina al grupo hemo bajo la forma del pigmento malárico o hemozoína, el cual aparece en el protoplasma del parásito. Al dividir su cromatina se constituye el esquizonte, que madura y toma forma de roseta, llamada así por la distribución de los fragmentos de cromatina, el citoplasma y el pigmento malárico. El *P. falciparum* realiza la formación de esquizontes en los eritrocitos adheridos a las paredes capilares viscerales. El esquizonte maduro al romper el eritrocito libera un número de merozoítos, de acuerdo a la especie de *Plasmodium*. La liberación de merozoítos ocurre cada 48

horas en *P. vivax*, *P. falciparum* y *P. ovale*, mientras que en el *P. malariae* ocurre cada 72 horas. Cada una de estas formas del parásito invade un nuevo eritrocito y da comienzo a otro ciclo eritrocítico. Algunos merozoítos, al parecer, tienen una determinación genética para constituir los elementos masculinos y femeninos o gametocitos, que circulan como formas infectantes para los mosquitos y no producen sintomatología en el hombre (ciclo B en la Figura 2.3). Estos gametocitos no llevan a reactivación de la infección humana y si no son ingeridos por los mosquitos, desaparecen espontáneamente de la sangre. En el *P. falciparum*, los gametocitos aparecen en la sangre circulante de 1 a 3 semanas después de haber parasitemia asexual y permanecen de 4 o 6 semanas después de terminada. En el *P. vivax* aparecen y desaparecen junto con las formas asexuadas ^[24].

- **Ciclo sexual o esporogónico**

Se efectúa en las hembras de mosquitos del género *Anopheles*, que se infectan al ingerir sangre de una persona que tenga los parásitos sexualmente diferenciados en machos y hembras, llamados respectivamente microgametocitos y macrogametocitos. Estas formas sexuales entran al estómago del mosquito, los microgametocitos comienzan el proceso de exflagelación, en el cual la cromatina se divide en varios fragmentos, alrededor de 8, que se localizan en la periferia del parásito y originan formas flageladas, móviles, llamadas microgametos, que al liberarse buscan las células femeninas para fecundarlas. En cada uno de los macrogametos se forman de 1 a 2 cuerpos polares que se mueven a la superficie del parásito, para recibir un microgameto que lo fecunda. Ocurre así la fusión de sus cromatinas, para conformar el huevo o cigoto. Éste se transforma en una célula alargada y móvil, llamada ooquinetto, el cual penetra la pared del estómago del mosquito y se coloca entre las capas epitelial y muscular. Allí crece y se forma el ooquiste que es redondeado. En su interior ocurre la división del núcleo y el citoplasma, para constituir gran cantidad de elementos



filamentosos llamados esporozoítos. Al estallar el ooquiste se liberan estos esporozoítos y se diseminan por el cuerpo del mosquito, pero se localizan de preferencia en las glándulas salivales, donde permanecen hasta ser inoculados al hombre durante una nueva picadura. La duración del ciclo en el mosquito varía entre 7 y 14 días, según la especie de *Plasmodium* ^[24].

II. 3. CLASIFICACIÓN DE LA MALARIA

Las infecciones de malaria se pueden clasificar de acuerdo a la especie de parásito involucrado, como:

- a) Malaria terciana benigna: es causada por el *Plasmodium vivax* y corresponde a la forma más frecuente de la enfermedad. Tiene un período de incubación de 1 a 4 semanas (en promedio, 2 semanas). Esta forma de malaria causa la ruptura del bazo y anemia. Las recaídas pueden ocurrir, debido a la renovación de la infección eritrocítica, por la liberación periódica de hipnozoitos de las células del hígado. Las formas eritrocíticas, por lo general, son susceptibles al tratamiento [25].
- b) Malaria terciana maligna o perniciosa: es causada por el *Plasmodium falciparum* y tiene un período de incubación de 1 a 3 semanas (en promedio, 12 días) [23]. Esta forma de malaria presenta el mayor número de complicaciones y por lo tanto es la más grave y potencialmente fatal, al mismo tiempo que los síntomas premonitorios pueden ser mas marcados. El diagnóstico suele ser complicado por sus diferentes manifestaciones en las cuales la edad y el estado inmunitario afectan significativamente [24]. También puede causar malaria cerebral, la cual es una de las complicaciones más frecuentes y serias, caracterizada con la aparición de delirium y coma progresivo, para desembocar en la muerte en un período relativamente corto si no se administra atención médica adecuada [16].
- c) Malaria cuartana: es causada por el *Plasmodium malariae* y tiene un período de incubación de 2 a 4 semanas (en promedio, 3 semanas), el ciclo asexual ocurre cada 72 horas y además de los síntomas usuales, esta forma también causa nefritis. Esta es la forma más suave de malaria y no presenta reincidencia, además de ser muy poco probable que el *P. malariae* se vuelva resistente. Sin



embargo, la infección de los glóbulos rojos puede durar por muchos años ^[26].

- d) Malaria terciana oval: es la producida por el *Plasmodium ovale* y tiene un período de incubación de 9 a 18 días (en promedio, 14 días). Es muy semejante a la malaria terciana, encontrándose reincidencia en los individuos infectados con este parásito ^[25].

II.4.CONTROL DE LA ENFERMEDAD.

La prevención y tratamiento del paludismo en la actualidad se basa en el control de vectores y la quimioterapia, de forma que pueda romperse el ciclo epidemiológico de la enfermedad (Figura 2.4). El control de vectores se logra mediante la interrupción de su ciclo de vida, y la creación de una barrera entre el huésped humano y los mosquitos^[26]. La protección personal frente a picaduras representa la primera línea de defensa, para lo cual se recomienda el uso de repelentes que contengan entre 20 y 35% de D.E.E.T (N,N-dietilmetatoluamida) y usar ropa que cubra la mayor superficie corporal. Las formas de lograr el control de vectores en circunstancias muy diversas incluyen: dormir con mosquiteros rociados con piretrinas o usar aire acondicionado y fumigar los interiores con insecticidas de acción residual, como el DDT ^[2,10,27].

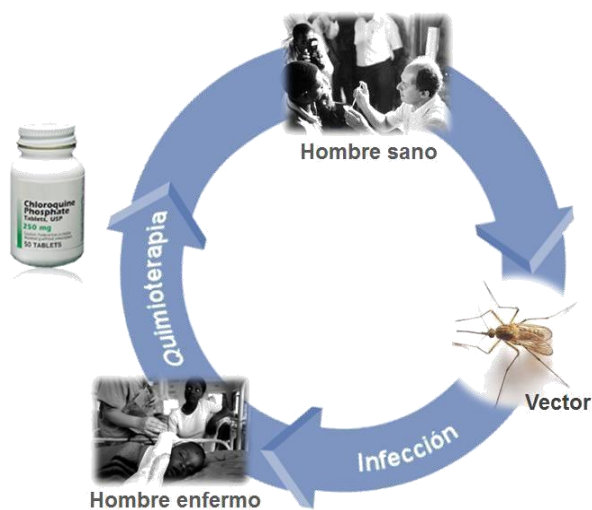


Figura 2.4. Ciclo epidemiológico de la malaria.

La quimioterapia de la malaria, implica básicamente la muerte de los parásitos asexuales y proporcionar terapia de apoyo para impulsar al sistema inmunológico. Actualmente hay medicamentos seguros para el tratamiento de la enfermedad; sin



embargo, los informes de la aparición de resistencia en contra de las drogas existentes justifica la introducción de nuevos fármacos. Antes de la segunda guerra mundial se desarrollaron la quinina, pamaquina, cloroquina (CQ) y mepacrina. Estas fueron seguidas por proguanil y amodiaquina (AQ,1940), primaquina (PQ) y pirimetamina (1950), sulfadoxina (1960) y artemisinina (1970). Un gran número de drogas se introdujo en los años ochenta que incluyen: mefloquina, halofantrina, aablaquina, pironaridina, piperquina y los derivados de la artemisinina, como el artemeter, artesunato y la dihidroartemisinina ^[26]. Los cuáles serán revisados con detalle más adelante.

La forma más eficaz de hacerle frente a la enfermedad sería a través del desarrollo de vacunas, el cual se comenzó en el siglo XX y, a pesar de los avances biomédicos y los estudios realizados, aun no se ha conseguido una vacuna preventiva efectiva, segura y de bajo costo. La dificultad se debe a varios factores, entre los que cabe destacar: que el *Plasmodium* presenta una gran cantidad de antígenos que varían a lo largo de los diferentes estadios de su ciclo vital, así un anticuerpo desarrollado con la fase inicial no protegerá contra las otras fases; además no existen modelos animales adecuados para el estudio y la falta de marcadores inmunológicos que se correlacionen con la protección frente a la malaria. A pesar de estas enormes dificultades, existen suficientes datos para pensar que el desarrollo de una vacuna efectiva es factible. Para ello, se intentan desarrollar vacunas que reproduzcan la inmunidad adquirida que desarrollan los individuos de zonas endémicas. ^[28,29]

Manuel Elkin Patarroyo fue el primer investigador en producir una vacuna sintética contra la malaria causada por *P. falciparum*, cuyo nombre es SPf66. Se realizaron los estudios básicos, preclínicos, clínicos y de campo; y aun así la eficacia de protección contra el parásito fue baja, pues era capaz de proteger al 35% de la población vacunada por un mínimo de 2 años y en la actualidad están intentando mejorar esta cifra. ^[29]



Paralelo a ello, muchas han sido las formulaciones utilizadas en la búsqueda de una vacuna y, recientemente, sólo la RTS,S ha demostrado inducción de respuesta protectora en humanos, demostrando que además los adyuvantes como AS02 son imprescindibles para promover un elevado desarrollo de anticuerpos y de allí deriva la vacuna RTS,S/AS02A, conocida comercialmente como Mosquirix y cuyos tres componentes son: **RTS**, un polipéptido de cadena simple correspondiente a los aminoácidos 207-395 de la parte C-terminal de la proteína circunsporozoítica (CSP), que se fusionó al extremo amínico del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B; **S** es un polipéptido de 226 aminoácidos que corresponde al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B y **AS02A** es una emulsión de aceite en agua, que tiene incorporado el inmunoestimulante monofosforil lípido A (MPL) y un derivado de saponina denominado QS21. Es producida por GSK (GlaxoSmithKline Biologicals) ^[28] y fue desarrollada por el investigador español Pedro Alonso Fernández. Esta vacuna está dirigida contra las fases preeritrocitarias de *P. falciparum*; contra los esporozoitos y las formas asexuadas que se alojan en el hígado para evitar la liberación de merozoitos primarios hacia la sangre. Los resultados han mostrado una eficacia frente al primer episodio de malaria clínica del 29,9%, una eficacia frente a la primera infección del 45% y frente a la malaria grave del 57,7%. Después de un seguimiento de 18 meses tras la tercera dosis, los pacientes seguían protegidos frente a la malaria clínica. Actualmente se encuentra en la fase III de ensayo en 11 centros ubicados en 7 países africanos: Mozambique, Tanzania, Burkina Faso, Gabón, Ghana, Kenia y Malawi. ^[29]



II.5. QUIMIOTERAPIA.

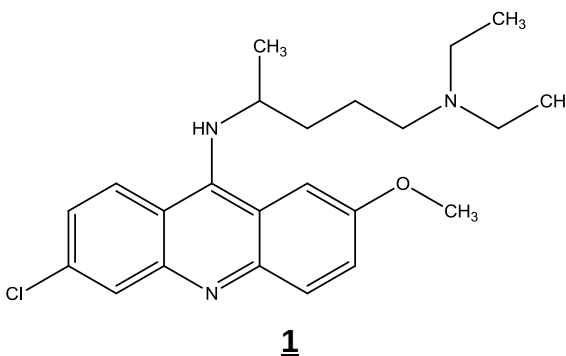
De acuerdo a la etapa del ciclo de vida del parásito, las drogas antimaláricas se pueden clasificar dependiendo de su sitio de acción, como:

- a) Esquizonticidas eritrocíticas: actúan sobre las formas esquizogónicas, en la sangre, de todas las especies de *Plasmodium*. Entre éstas se encuentran las 4-aminoquinolinas, hidroximetilquinolinas, diaminopirimidinas y sulfonamidas ^[24]. Estas drogas destruyen las etapas eritrocíticas del parásito y pueden curar casos de *P. falciparum* o evitar recaídas. Ésta es la fase más fácil de tratar porque la droga puede entrar al torrente sanguíneo rápidamente ^[25].
- b) Esquizonticidas tisulares: como las 8 –aminoquinolinas ^[24], tienen su actividad sobre las formas hepáticas y evitan las recaídas de *P. vivax* y *P. ovale*. Estas drogas erradican las etapas pre-eritrocíticas del parásito, lo cual previene su entrada dentro del torrente sanguíneo. Las drogas de este tipo son útiles para profilaxis. Algunos esquizonticidas pueden actuar sobre los hipnozoitos del *P. vivax* y *P. ovale* y así prevenir las recaídas ^[25].
- c) Gametocidas: son las que tienen acción sobre las formas asexuadas o gametocitos de la sangre de todas las especies humanas de *Plasmodium*. Algunas de ellas las matan y otras las esterilizan, volviendo los parásitos no infectantes para el mosquito ^[24].
- d) Esporozonticidas: Estas drogas actúan contra los esporozoítos y son capaces de matarlos tan pronto como entran en el torrente sanguíneo luego de la picada del mosquito ^[25]. Sin embargo, actualmente no se dispone de este tipo de medicamentos ^[24].

II.6. ANTIMALÁRICOS COMUNES.

Las drogas antimaláricas pueden ser clasificadas de acuerdo a su estructura química, dado que esto les confiere características afines, como:

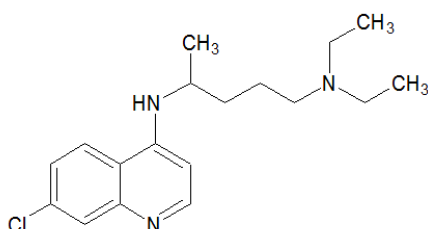
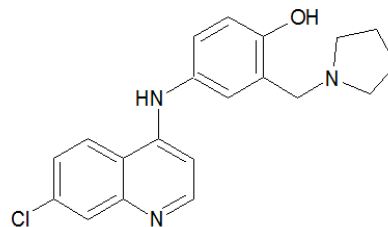
- **Acridinas:** Los primeros antimaláricos sintéticos conformaron el grupo de las 9-aminoacridinas. Las principales fueron: mepacrina (**1**), metoquina y floxacrina; que no se usan actualmente para el tratamiento de la malaria por sus efectos tóxicos ^[24].



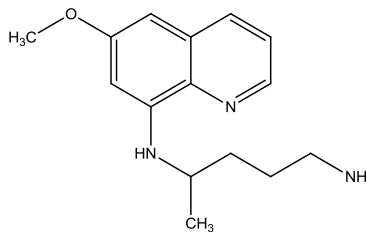
- **Aminoquinolinas:** los derivados de las aminoquinolinas actúan como esquizonticidas y son de dos tipos de compuestos: las 4-aminoquinolinas y las 8-aminoquinolinas ^[24].

❖ 4-aminoquinolinas: la cloroquina (**2**) y amodiaquina (**3**), son las más utilizadas. Actúan efectivamente eliminando los esquizontes eritrocíticos de todas las especies de *Plasmodium*, interfiriendo con los procesos metabólicos mediante los cuales el parásito digiere la hemoglobina, dentro del eritrocito, y no tienen efectos contra los parásitos en el hígado. Son antimaláricos de acción rápida que se absorben en el tubo intestinal, pero si se administran por vía venosa hay peligro de toxicidad. La CQ se acumula en los tejidos, principalmente bazo, riñones, pulmones, corazón e

hígado, con mayor afinidad por los tejidos donde existe melanina, como la piel y los ojos. Se metaboliza lentamente y el principal metabolito en el hombre es la desetil-cloroquina. Es eliminada a través del riñón sin ser modificada. La AQ tiene la misma actividad antimalárica que la CQ, pero cuando se administra por tiempo prolongado puede causar hepatitis tóxica y agranulocitosis fatal; por este motivo la AQ no se recomienda para quimioprofilaxis o tratamiento preventivo ^[24].

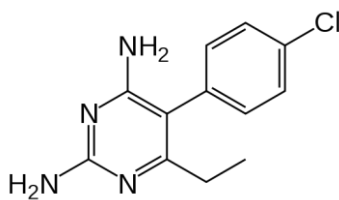
**2****3**

- ❖ 8-aminoquinolinas: la primaquina (**4**) es el único producto comercial de este tipo. Ataca los esquizontes e hipnozoítos hepáticos y cuando se asocia a las drogas esquizonticidas eritrocíticas se logra una curación radical de *P. vivax* y *P. ovale*. Tiene también acción esterilizante sobre los gametocitos de *P. falciparum* de la sangre. Se absorbe rápidamente por el intestino y se fija muy poco en los tejidos, siendo eliminada con rapidez por degradación metabólica, para desaparecer del organismo, casi completamente, en 24 horas ^[24].

**4**

- **Diaminopirimidinas:** en éste grupo se incluyen dos productos: pirimetamina y trimetoprima ^[24].

Pirimetamina (**5**): actúa sobre las formas eritrocíticas y potencia la acción de otras drogas esquizotónicas en la sangre, asociación que se hace principalmente con sulfadoxina, usándose en el tratamiento de la infección por *P. falciparum* resistente a la cloroquina. La absorción se hace con relativa rapidez por el intestino y se excreta por la orina hasta 2 semanas después de la administración ^[24]. La trimetoprima actúa de la misma forma que la pirimetamina, pero es más útil como bacteriostático que como antipalúdico ^[28].

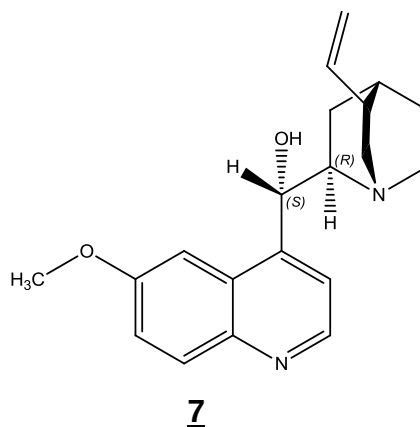
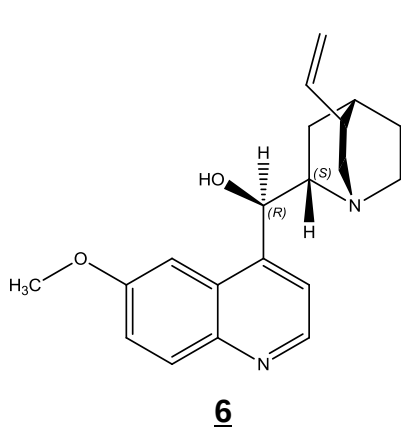
**5**

- **Hidroximetilquinolinas:** a este grupo pertenecen el compuesto natural conocido como quinina (**6**), la quinidina (**7**) que es un isómero de la quinina y el producto sintético, mefloquina (**8**) ^[24].

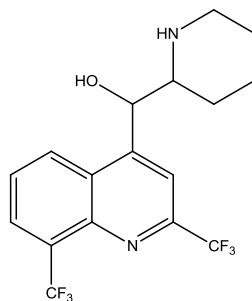
❖ La quinina (**6**) es un alcaloide extraído de una planta del género *Cinchona* y se utiliza en el tratamiento de infecciones causadas por *P. falciparum* resistentes a las 4-aminoquinolinas. Actúa sobre el ciclo eritrocítico del *Plasmodium* y es de acción rápida, se absorbe por el intestino y se distribuye por la mayor parte de los líquidos del organismo y en el líquido cefalorraquídeo (L.C.R.) donde la concentración es de aproximadamente el 7% de la del plasma. Es metabolizada en el hígado y se excreta por la

orina, parte sin modificar y parte como un metabolito hidroxilado. Después de 48 horas es poca la cantidad que permanece en el organismo ^[24].

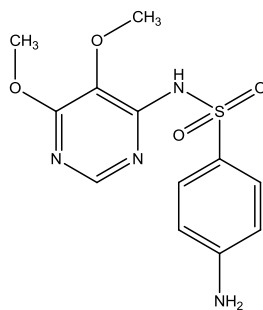
- ❖ Quinidina (7): es un diastereoisómero de la quinina, que también tiene actividad antimalárica. Sin embargo, la quinidina tiene efectos secundarios semejantes a la quinina, especialmente cardíacos, como arritmias y reacciones de hipersensibilidad por lo cual no es recomendada como alternativa a la quinina, a menos que no se disponga de ella ^[24].



- ❖ Mefloquina (8): es un producto sintético del mismo grupo, poco tóxico y que se administra en dosis única. Se absorbe rápidamente pero la eliminación es lenta por la orina, como droga no modificada y en forma de metabolito. Su vida media es más larga que la de las otras drogas antimaláricas, en promedio 3 semanas. Es un esquizonticida de acción prolongada contra el *P. falciparum* resistente a las 4-aminoquinolinas y a la combinación de sulfas con pirimetamina. También es altamente efectiva contra las formas circulantes *P. vivax*, *P. malariae*, pero no tiene acción gametocida, ni contra las formas hepáticas. En general es bien tolerada, pero cuando se da en dosis elevadas se observan efectos adversos como mareos, náuseas, vómito, diarrea y dolor abdominal ^[24].

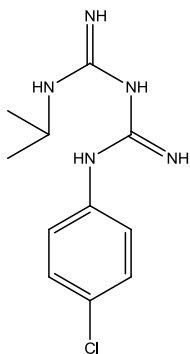
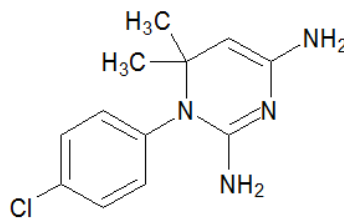
**8**

- **Sulfonamidas:** las sulfas como sulfadoxina (**9**), sulfalene, sulfadiazina y sulfadimetoxina tienen acción antimalárica y actúan únicamente contra los esquizontes sanguíneos, principalmente de *P. falciparum*. Se sabe que las sulfas tienen menor efecto sobre el *P. vivax*. La más empleada es la sulfadoxina que se asocia con la pirimetamina. Es de absorción rápida, pero se excreta con lentitud. La eliminación se hace entre 100 y 200 horas ^[24].

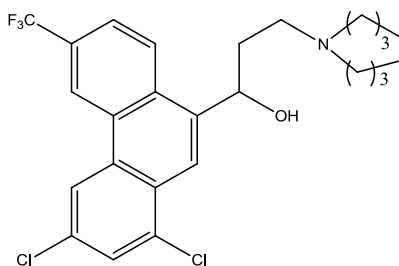
**9**

- **Biguanidas:** en este grupo se encuentra la cloroguanida o proguanil (**10**), que se absorbe rápidamente por el intestino, llega a la máxima concentración a las 4 horas y se excreta lentamente por el riñón ^[24]. Fue desarrollada como antagonista del ácido fólico y su forma activa es el cicloguanil (**11**) ^[25]. Posee actividad esquizonticida ante el *P. falciparum* y suprime los ataques agudos

causados por el *P. vivax*, pero dado que no ataca las formas exoeritrocíticas puede ocurrir reincidencia de la enfermedad al interrumpir el uso del fármaco ^[12].

**10****11**

- **Hidroximetilfenantrenos:** la halofantrina (**12**) es el producto más experimentado y el único comercial de éste grupo, el cual se administra por vía oral cada 6 horas en un solo día. Sin embargo su efectividad ha sido variable y se ha detectado resistencia cruzada con la mefloquina. No tiene actividad contra los parásitos en el hígado ni contra los gametocitos. Generalmente es bien tolerada, solamente se han encontrado efectos menores y reversibles tales como náuseas, dolor abdominal, diarrea, brote cutáneo y prurito ^[24].

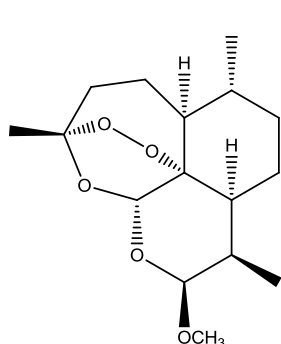
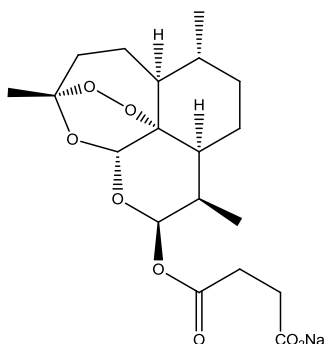
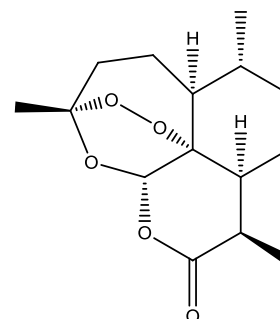
**12**

- **Endoperóxidos:** el arteméter (**13**), artesunato de sodio (**14**) y la artemisinina (**15**) corresponden a éste tipo de compuestos que tienen gran actividad como

esquizonticidas sanguíneos. Tienen utilidad en el tratamiento de la malaria severa causada por *P. falciparum*, especialmente para las cepas resistentes a la cloroquina.

La artemisinina (**15**) es un potente esquizonticida eritrocítico que se extrae de la hierba china *Artemisia annua* y hace desaparecer los parásitos más rápidamente que la cloroquina y la quinina. Recientemente se le encontró también actividad gametocida al artesunato de sodio ^[24].

Las artemisininas son generalmente bien toleradas en las dosis utilizadas para tratar la malaria. Los efectos secundarios son similares a los síntomas de la malaria: náuseas, vómitos y mareos, leves anomalías en la sangre también se han observado ^[29]. Los parásitos recurrentes no son resistentes a las artemisininas pero evaden su corta duración de acción, por ello no están indicadas para la monoterapia y son administradas en combinación con otros compuestos de acción más prolongada (ACT) ^[32].

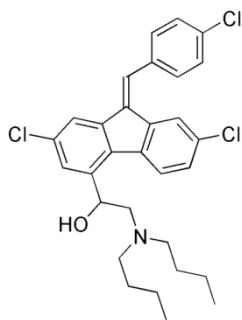
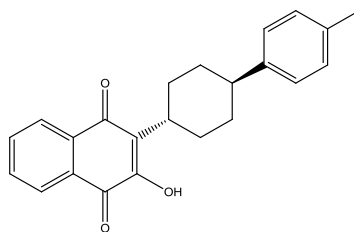
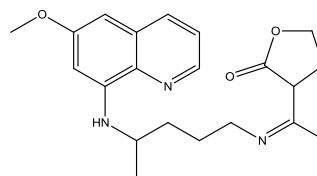
**13****14****15**

- **Antibióticos:** algunos antibióticos tienen actividad antimalárica como la tetraciclina, doxiciclina, minociclina, clindamicina, pero son de acción lenta sobre las formas asexuadas de la sangre, por lo cual se deben asociar a otros

antimaláricos de acción rápida como quinina, AQ o CQ. Los antibióticos más evaluados son la clindamicina y las tetraciclinas, principalmente doxiciclina y minociclina ^[24].

La clindamicina: es un eficiente esquizonticida eritrocítico de acción lenta, que posee efectos secundarios fuertes. La tetraciclina actúa lentamente contra las formas sexuales de todas las especies de *Plasmodium* ^[24].

- **Otros medicamentos:** existen otros compuestos con actividad antimalárica como por ejemplo: pironaridina, hidroxi-piperaquina, dabequina, lumefantrina (**16**), atovaquona (**17**), aablaquina (**18**) y menoctona ^[24].

**16****17****18**

II.7. DEGRADACIÓN DE LA HEMOGLOBINA Y FORMACIÓN DEL PIGMENTO MALÁRICO.

El parásito de la malaria requiere de aminoácidos para la síntesis de sus proteínas. Las tres fuentes de aminoácidos son la síntesis *de novo*, la importación a partir del plasma y la digestión de hemoglobina. La hemoglobina es una proteína muy abundante en el citoplasma de los eritrocitos y sirve como la principal fuente de aminoácidos para el parásito ^[33]. Su digestión ocurre en la vacuola digestiva del parásito en el estado de trofozoíto; ésta tiene un pH ácido (pH 5,0 – 5,4) y contiene las enzimas proteasas que degradan la hemoglobina a pequeños péptidos, los cuales posteriormente son hidrolizados hasta los aminoácidos individuales que son utilizados para el crecimiento y maduración del parásito. Éste último proceso ocurre fuera de la vacuola ^[34].

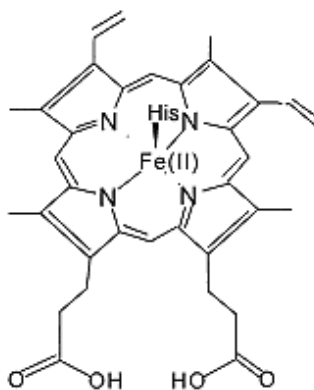


Figura 2.5. Grupos heme ^[34].

Por otra parte, también se liberan grandes cantidades de grupos heme (Figura 2.5) en la digestión de la hemoglobina de los glóbulos rojos infectados. El hierro es oxidado de Fe(II) a Fe(III) a través de un mecanismo que aún no ha sido totalmente explorado, pero se presume que envuelve al O₂ como oxidante ^[35]. La especie que se produce es conocida como hematina (Figura 2.6) que debe ser liberada como desecho

tóxico para el parásito, pues es una molécula lipofílica que se puede intercalar fácilmente en la membrana y causar cambios en su permeabilidad, organización lipídica e inducir la peroxidación lipídica en la membrana, promoviendo la lisis de la célula o inhibiendo sus proteasas ^[36, 37].

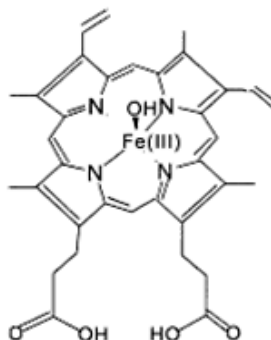


Figura 2.6. Hematina (Hidroxiferriprotoporfirina IX) ^[34]

La hematina es eliminada, al menos en parte, convirtiéndola en una sustancia altamente insoluble al pH de la vacuola digestiva, llamada hemozoína o pigmento malárico, a través de un proceso conocido como biomineralización o biocristalización. Los estudios de difracción de rayos X han demostrado que la hemozoína es química, espectroscópica y cristalográficamente idéntica a la β -hematina sintética, ferriprotoporfirina IX [Fe(III)PPIX], la cual se ha demostrado recientemente que es un dímero cíclico de la hematina, en la que el grupo propionato de cada molécula de Fe(III)PPIX se coordina al Fe(III) de la molécula adyacente, mientras que los dímeros se unen a través de los puentes de hidrógeno de los grupos de ácido propiónico (Figura 2.7). ^[34 – 37]

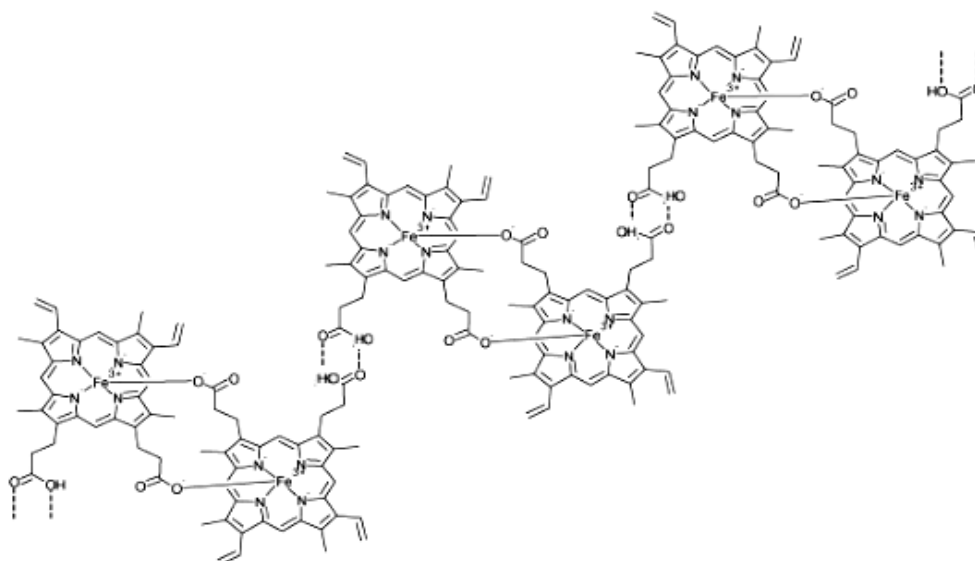


Figura 2.7. Estructura molecular de la hemozoína / β -hematina. ^[35]

El proceso a través del cual se forma la hemozoína es común en la naturaleza y describe la deposición de materiales inorgánicos de bajo peso molecular dentro o fuera de las células de los seres vivos. No es un proceso enzimático y procede de las matrices orgánicas producidas, es decir, los organismos vivos forman cristales de gran peso molecular a través de la biocristalización^[38]. En 1996, Sullivan *et al.* ^[39], demostraron que la HRP II (proteína 2 rica en histidina) puede promover la formación de la β -hematina y sugirieron que era la responsable de la formación de la hemozoína en el parásito de la malaria. Sin embargo, quedó poco claro, pues la autocatálisis sólo puede ocurrir una vez que el proceso ha comenzado y la iniciación puede ser a través de los lípidos, las proteínas, posiblemente HRP II, o ambos. Pandey *et al.* ^[40] señalaron que ni el proceso soportado por los lípidos, ni por HRP II, por separado, son lo suficientemente rápidos como para tener en cuenta en la formación de hemozoína *in vivo* y propusieron que ambos están involucrados en un proceso de dos pasos. Por otro lado, los estudios de electroforesis de gel no mostraron evidencia de proteínas asociadas a los lípidos y el Western Blot no mostró evidencia de la presencia de HRP II o de la proteína PfCRT, Plasmodium falciparum Chloroquine Resistance Transporter, de la vacuola digestiva; lo

cual argumenta en contra de la participación de proteínas en la formación de la hemozoína; no obstante, éstas no pueden ser excluidas del todo pues queda la posibilidad de que alguna proteína desconocida esté asociada a la nanoesfera lipídica, propuesta por Pisciotto y colab.^[41], en niveles bajos y esté involucrada en la nucleación de la hemozoína^[42].

Actualmente se sabe que el primer paso en la formación del pigmento malárico es la eliminación del agua de la acuaferriprotoporfirina IX [$\text{H}_2\text{O}-\text{Fe(III)PPIX}$] la cual es la forma de hidroxiferriprotoporfirina IX (Figura 1.6) que se espera se encuentre presente al pH de la vacuola digestiva. Los datos obtenidos recientemente por microscopía electrónica en la formación de la hemozoína en el *P. falciparum* proporcionan pruebas irrefutables de que su formación está asociada a los lípidos. El crecimiento in vitro de la β -hematina en condiciones biomiméticas, indicó la excepcional eficiencia de un ambiente lipídico, especialmente cuando la Fe(III)PPIX es directamente introducida en o cerca de la interfase entre el cuerpo lipídico y la solución acuosa. La velocidad a la que esto ocurre sugiere que la interfase lípido/agua es suficiente para provocar la formación de la hemozoína *in vivo*. En efecto, los cuerpos llamados nanoesferas lipídicas pueden ser producidos por el organismo con el único propósito de la formación de la hemozoína a partir de la desintoxicación del heme. Los estudios de simulación indican que la baja constante dieléctrica del medio lipídico promueve el autoensamblaje del cristal de hemozoína.^[38,41]

A pesar de estos avances en la comprensión de la formación de la hemozoína, la nucleación de sus cristales todavía sigue siendo poco conocida, a pesar de la reciente evidencia alusiva a la nucleación epitaxial por la superficie de los lípidos. La figura 2.8 muestra un esquema que describe la forma en que se entiende hasta ahora el proceso de la formación de la hemozoína^[42].

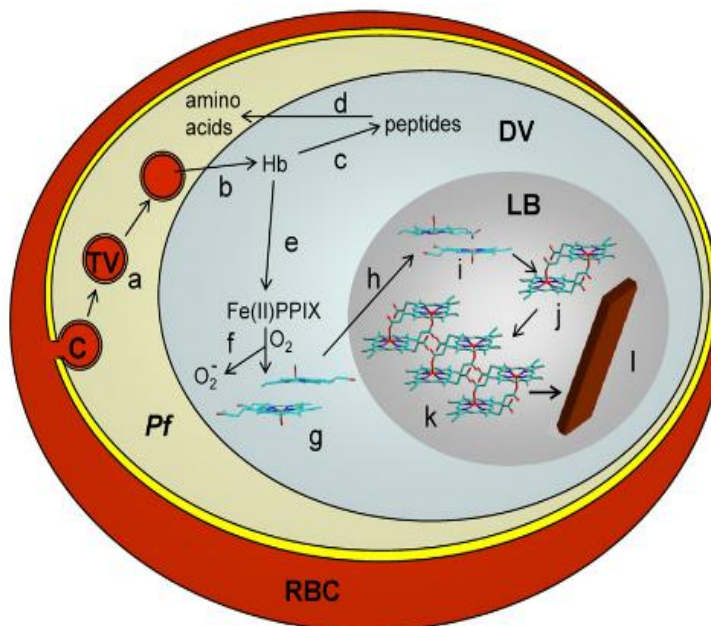


Figura 2.8. Representación esquemática del proceso propuesto para la formación de la hemozoína ^[35].

El citoplasma (C) de los eritrocitos (RBC) es ingerido por el parásito y transportado a la vacuola digestiva (DV) a través de vasículas (TV) de membrana doble. Una vez transportado a la vacuola digestiva (b), la hemoglobina (Hb) presente en el citoplasma es digerida por distintas proteínas para producir péptidos (c), los cuales son exportados de la vacuola digestiva (d) y degradados hasta aminoácidos. Los grupos heme (Fe(II)PPIX) liberados de la hemoglobina (e) son oxidados (f), posiblemente por oxígeno molecular, generando Fe(III)PPIX y el anión superóxido. En solución acuosa Fe(III)PPIX dimeriza probablemente para formar un dímero π - π (g), el cual es transportado (h) a un cuerpo lipídico (LB) denominado nanoesfera lipídica. Dentro de ese medio se forma un dímero "precursor de la hemozoína" (i) que se convierte en el dímero hemozoína (j). En ausencia de enlaces de hidrógeno que se formen con el solvente, estos dímeros pueden comenzar a ensamblar núcleos de hemozoína por la unión de enlaces de hidrógeno entre sí (k) para finalmente formar el cristal de la hemozoína (l).

II.8.MECANISMO DE ACCIÓN DE LA CLOROQUINA.

El primer caso de resistencia a la cloroquina fue reportado en Sur América para 1961 e independientemente al Sudeste de Asia en 1962. La resistencia a la CQ se propagó progresivamente a partir del primer foco y ahora ésta droga es inútil en la mayoría de las zonas endémicas. La resistencia no se debe a la inactivación, descomposición o neutralización de la cloroquina, pero si se debe a las múltiples mutaciones de la proteína transportadora en la membrana de la vacuola digestiva del parásito PfCRT ^[38].

En 1967, se sugirió que las 4-aminoquinolinas eran antimaláricos inhibidores de la formación de hemozoína. Hoy, la acción esquizonticida en la sangre de éstas, es atribuida principalmente a la inhibición de la biocrystalización de la hemozoína ^[38]. Los mecanismos propuestos para la acción del medicamento se agrupan en 3 categorías principales ^[36].

1. El enlace directo del fármaco a los monómeros heme o dímeros en solución, lo cual interfiere con la formación de la hemozoína ^[36].
2. La inhibición enzimática de una proteína que cataliza la cristalización de la hemozoína ^[36].
3. La quimisorción de la droga sobre la forma cristalina de la hemozoína, lo que conduce a la inhibición de la incorporación nuevo heme ^[36].

La primera propone la formación de un complejo droga-heme que limita la extensión de un presunto 'polímero de heme'; sin embargo, como la hemozoína no es un polímero de coordinación, el crecimiento de una cadena no puede ser detenido en un solo sitio. La segunda propuesta sugiere la presencia de una proteína que transforma el heme en hemozoína, pero los estudios *in vitro*, en ausencia de proteínas, demuestran inhibición

del crecimiento de la hemozoína. Finalmente, se tiene que un complejo CQ - hemozoína no puede estar enlazado covalentemente ^[36]. El actual conocimiento acerca del mecanismo de acción parece utilizar varios aspectos de cada uno de estos mecanismos previos. Aunque aún no se ha establecido con certeza, se ha demostrado que las 4-aminoquinolinas se unen a la hemozoína a través de un complejo heme-droga en el cual el anillo aromático de la quinolina interactúa vía complejo π con el núcleo de la porfirina. Este complejo limita el crecimiento de la hemozoína, bloqueando así la extensión de la misma. El resultado de ésta es que la concentración del heme tóxico se acumula a niveles que conducen a la muerte del parásito ^[25].

La acumulación en la vacuola digestiva de la CQ se basa en el hecho de que ésta es una base débil diprótica ($pK_{a1}= 8$ y $pK_{a2}= 10,2$) y dado que el fluido extracelular del parásito está a $pH= 7.4$, la CQ en su forma no protonada puede atravesar las membranas de los eritrocitos invadidos y moverse con el gradiente de pH para acumularse en grandes cantidades dentro de la vacuola ^[25, 37]. La cloroquina y los antimaláricos quinolínicos inhiben el proceso de formación de la hemozoína al bloquear las fases de formación del cristal. Algunos estudios sugieren una correlación entre la constante de unión a la β -hematina de estos antimaláricos y su habilidad para inhibir la biocristalización, dejando ver que estos compuestos median su actividad por su unión a la β -hematina (forma dimérica), más que a la hematina, con lo cual se postula que ésta unión interfiere en el equilibrio de la reacción de formación del dímero y de ésta forma inhibe la biocristalización ^[34]. Varios estudios han sugerido que la estructura del complejo formado entre la quinolina y la β -hematina está dada por interacciones π y que tal estructura consiste de una molécula de la quinolina y dos de heme (dímero) las cuales se aproximan a manera de sándwich ^[37].

El lugar de los lípidos en la cristalización del heme tiene importantes implicaciones en la inhibición de la formación de la hemozoína, pues los nuevos descubrimientos predicen que ésta pudiese tener lugar en un ambiente bifásico lípido/agua. Las bases



débiles como las quinolinas se acumulan en gran concentración en la vacuola digestiva ácida. Warhust y colaboradores han mostrado recientemente que hay una alta proporción de CQ como droga libre en la fase acuosa de la vacuola y que su proporción de acumulación lipídica como droga libre es mucho más pequeña y constante, casi 1000 veces, a pesar de las variaciones en el pH, lo cual afecta la proporción de acumulación acuosa. Bray y Ward también notaron que las constantes de alta lipofilicidad entre un grupo diverso de quinolinas fue relacionado con bajas concentraciones de inhibición en los parásitos resistentes a la CQ. Una gran parte del rompecabezas de la resistencia del *P. falciparum* ha sido la falta de relación de la resistencia contra las quinolinas activas en comparación con su lipofilicidad, como ocurre con las células cancerígenas resistentes a multidroga^[41].



II.8.1. RELACIÓN ESTRUCTURA - ACTIVIDAD DE ANÁLOGOS DE LA CLOROQUINA.

Buscando los componentes estructurales necesarios para conseguir el nuevo agente antimalárico que supere los problemas de resistencia y mantenga una excelente bioactividad y baja o nula toxicidad, las evidencias permiten proponer un modelo detallado de relación estructura-actividad. Así, el núcleo de las 4-aminoquinolinas (Figura 2.9) provee, por sí solo, una estructura acomplejante del grupo heme, pero eso no es suficiente para la inhibición de la formación de la hemozoína; el cloro en la posición 7 interviene en la inhibición de la formación de hemozoína pero, probablemente, tiene poca influencia en la fuerza de asociación con el heme. Por su parte, la cadena lateral aminoalquílica es un requerimiento para la fuerte actividad antiplasmódica, que probablemente ayuda a la acumulación del compuesto en la vacuola y, en algunos casos, parece aumentar la fuerza de asociación con el heme. Los cambios en la longitud de la cadena lateral diaminoalquílica tienen poca influencia sobre la actividad contra las cepas sensibles a la CQ, pero una influencia profunda contra las cepas resistentes, lo cual parece indicar que los cambios en dicha cadena pueden superar la resistencia a la CQ sin modificar la estructura del fragmento 4-amino-7-cloroquinolínico. Por su tamaño y propiedades, el grupo 7-cloro se ha identificado como una característica necesaria para la inhibición de la formación de la β -hematina, sobre otros grupos electroatrayentes. Sin embargo, no posee una actividad antiplasmódica lo suficientemente fuerte, lo cual puede indicar que una reducción en la densidad electrónica de las posiciones 5 u 8 del anillo quinolínico, o ambas, es la clave para la actividad ^[37].

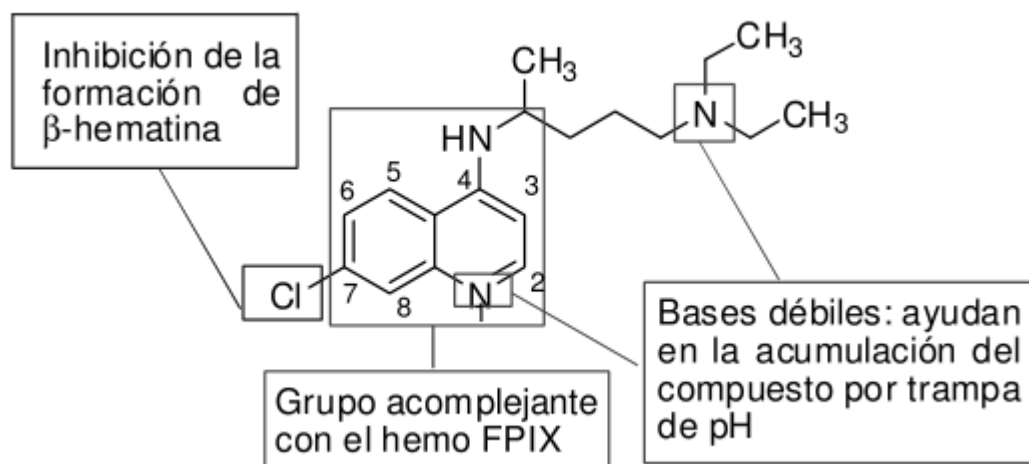


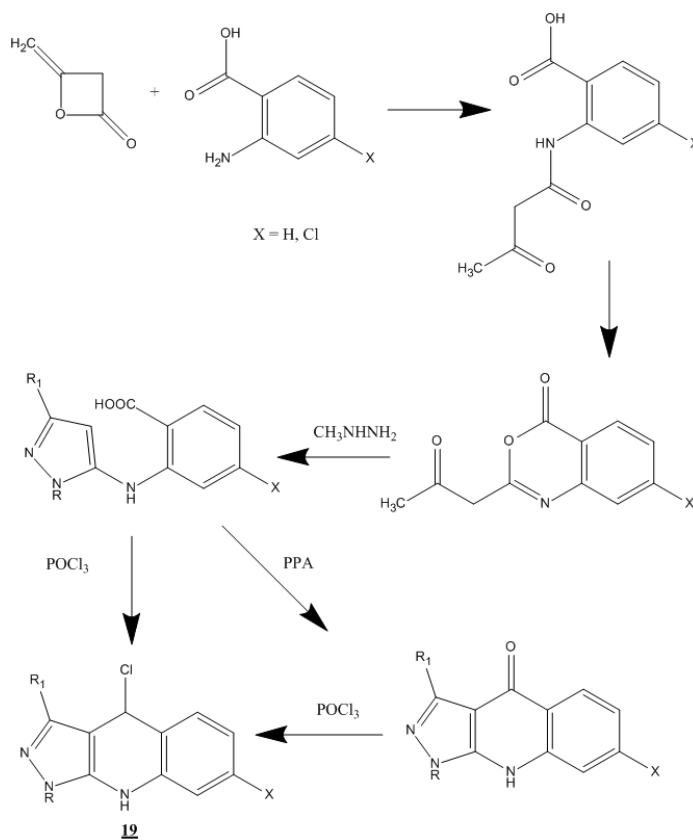
Figura 2.9. Relación estructura –actividad de la cloroquina ^[37].

La estrategia de sintetizar compuestos formados por la combinación de activos conocidos también se utiliza para tratar de contrarrestar la resistencia en los parásitos. Con ella se crean compuestos híbridos que reúnen lo mejor de las propiedades de, al menos, dos moléculas diferentes. En el caso de los híbridos de la CQ, se toma el segmento 4-aminoquinolínico y otro fragmento, generalmente heterocíclico que debe poseer también alguna actividad biológica. Para obtener un compuesto híbrido que sea activo, es necesario que no pueda difundirse rápidamente desde la vacuola, como sucede con las 4-aminoquinolinas, y por ende, no ocurra una disminución de su acumulación dentro del parásito. Debido al costo y a la dificultad para obtener antimaláricos modernos, los compuestos híbridos han resurgido en las últimas dos décadas como los más estudiados en la búsqueda de antiplasmódicos que superen la resistencia ^[37].

III. ANTECEDENTES.

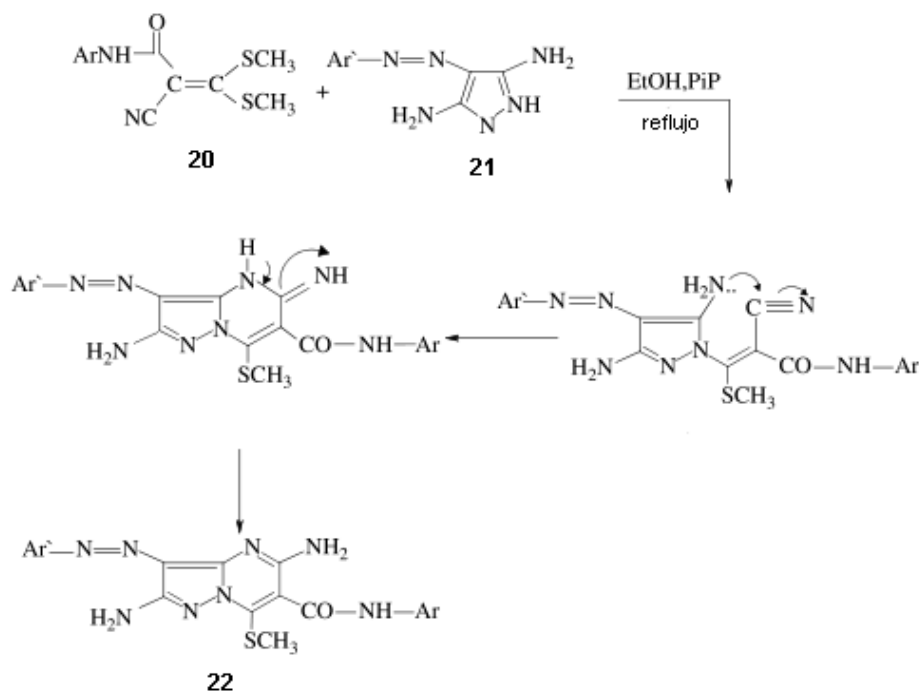
III.1. SÍNTESIS PREVIAS.

Stein, R. y colaboradores ^[43], se interesaron en combinar las características del anillo pirazol, una quinolina sustituida y una cadena “antimalárica” en una molécula para probarlo como antimalárico. El intermediario clave (Esquema 3.1) fue la 4-cloro-1H-pirazolo[3,4-b]quinolina (**19**) en la cual el átomo de Cl podía ser reemplazado por las aminas propicias para impartir actividad antimalárica, lo que representa un intermediario de interés para el compuesto planteado como objetivo del presente trabajo, por ser un compuesto de estructura pirazólica semejante a la propuesta.



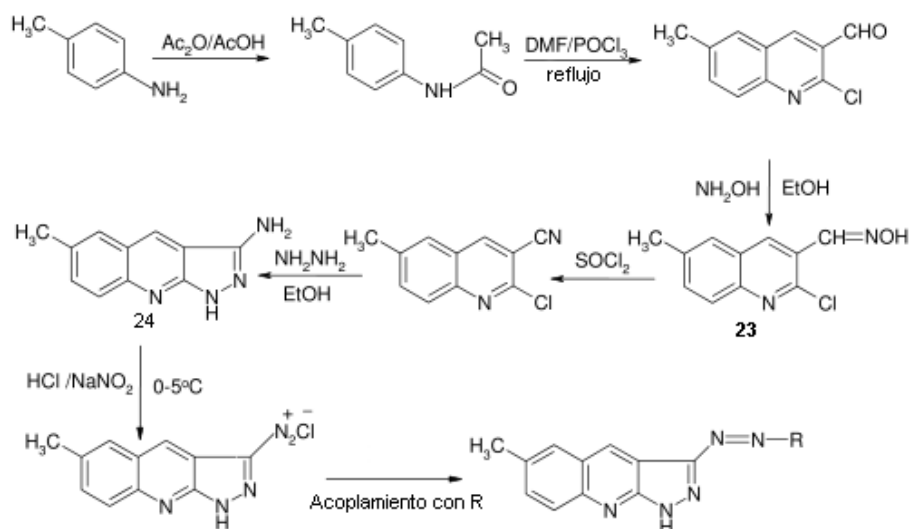
Esquema 3.1. Síntesis de Stein, R. y colaboradores.

Helal, M. y colaboradores ^[44], ofrecieron una nueva ruta (Esquema 3.2) para la síntesis de metilsulfanilarilazopirazol[1,5-a]pirimidinas (**22**) por la reacción de ditiacetalcetonas (**20**) con 3,5-diaminopirazoles (**21**). Lo que muestra una evidencia análoga a la anterior, a partir de la cual se pueden obtener pirazoles de estructura semejante a la deseada y en un solo paso.



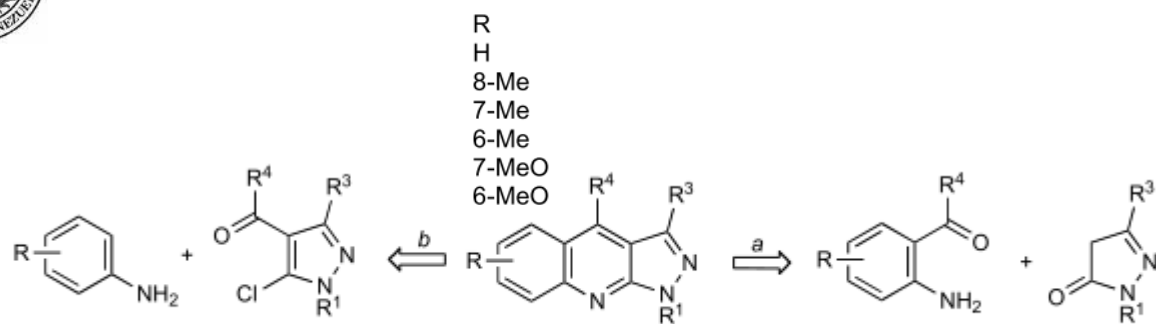
Esquema 3.2. Síntesis de Helal, M. y colaboradores

Thakor, S. y colaboradores ^[45]; sintetizaron la 3-amino-6-metil-1H-pirazolo[3,4-b]quinolina (**24**) como intermediario de diazo compuestos objetivo de su investigación. Ésta fue preparada (Esquema 3), por la eliminación del hidroxilo de la 2-cloro-6-metil-3-quinolincarboxaldehído oxima (**23**), con cloruro de tionilo seguido de la ciclación con el hidrato de hidracina en etanol, para obtener un centro semejante al planteado en éste trabajo.

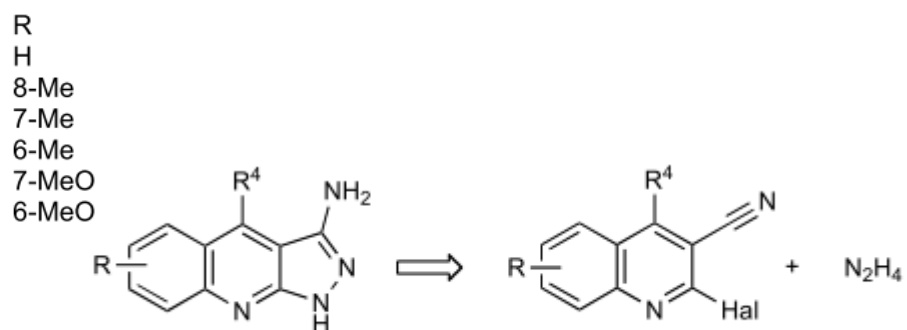


Esquema 3.3. Síntesis de Thakor, S. y colaboradores.

Afghan, A. y colaboradores^[46]; sintetizaron 1H-pirazol[3,4-b]quinolinas empleando varias estrategias. La reacción (Esquema 3.4, ruta a) de una 1H-pirazol-5(4H)ona con un orto-aminoaril aldehído o cetona, es una de ellas. Otra alternativa (Esquema 3.4, ruta b) corresponde a la construcción del anillo de la piridina a partir de la condensación de 5-halo-4-acilpirazol con una anilina. Otra ruta utilizada corresponde a la reacción (Esquema 3.5) de 2-cloro-3-cianoquinolinas con hidracina. Éste estudio permite resumir las vías a partir de las cuales se pueden obtener compuestos intermediarios pirazoloquinolínicos (Esquema 3.4) utilizando aldehídos y/o cetonas, o anilinas sustituidas, como la p-toluidina, y halo-acilpirazoles. Alternativamente (Esquema 3.5), se reporta el uso de hidracina para la construcción de pirazoles unidos a anillos quinolínicos.



Esquema 3.4. Síntesis de Afghan, A. y colaboradores (estrategia 1).



Esquema 3.5. Síntesis de Afghan, A. y colaboradores (estrategia 2).



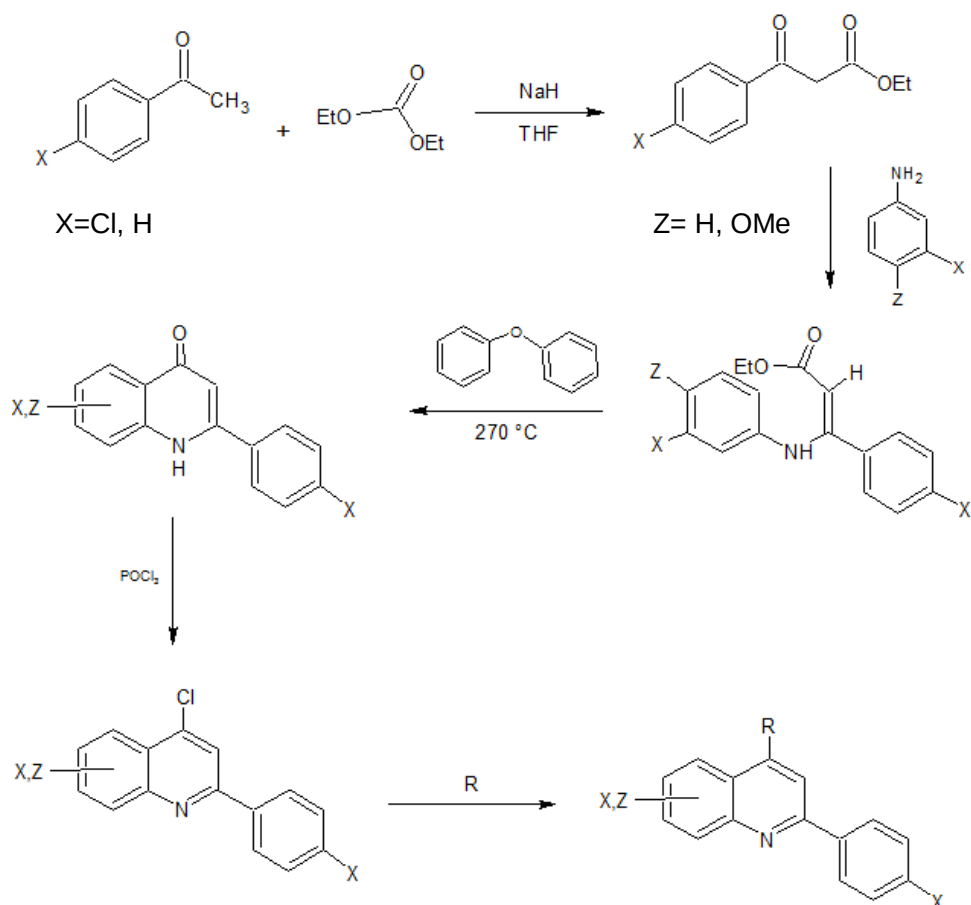
III.2. SÍNTESIS PREVIAS REALIZADAS EN EL LABORATORIO.

Gutiérrez, J.; Guzmán, W. y Márquez, C. ^[47]; sintetizaron un grupo de 2-fenil-4-aminoquinolinas (Esquema 3.6), haciendo reaccionar la 4-cloroacetofenona con carbonato de dietilo para obtener el 4-clorobenzoilacetato de etilo el cual se hizo reaccionar por condensación con la 3-cloroanilina para producir el anilinoacrilato correspondiente. Luego, éste fue ciclado en difeniléter obteniéndose los isómeros clorados de la quinolona y por reacción con el oxiclورو de fósforo, se formaron las cloroquinolinas isoméricas sustituidas, las cuales reaccionaron con las cadenas diamínicas de tipo $H_2NC_3H_7NR_2$, donde R eran grupos metilo y etilo, para obtener las 4-aminoquinolinas finales.

Villanueva, S.; Guzmán, W. y Márquez, C. ^[48]; análogamente al trabajo anterior, sintetizaron un grupo de 2-fenil-4-aminoquinolinas, pero con la variante de partir de la acetofenona sin sustituir, de manera que el grupo fenilo en la posición 2 de la quinolina no tuviese ningún sustituyente.

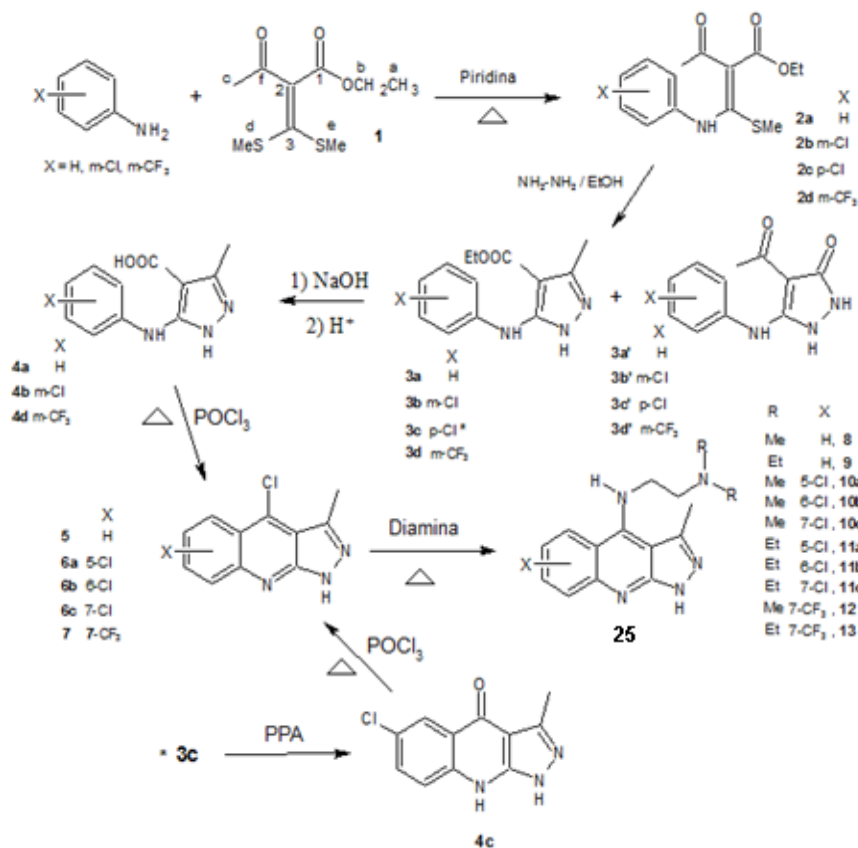
Canino, L.; Guzmán, W. y Márquez, C. ^[49]; realizaron un trabajo análogo al anterior, sintetizando 4-aminoquinolinas con la variante de que el núcleo quinolínico no posee un sustituyente cloro en posición 7 sino un grupo metoxi en posición 6, el cual corresponde a Z en el esquema 6.

Torres, C.; Guzmán, W. y Márquez, C. ^[50]; basándose en el trabajo anterior, sintetizaron 4-aminoquinolinas de la misma naturaleza del trabajo anterior, bajo el mismo procedimiento mostrado en el esquema 6, pero variando las cadenas alquílicas sustituidas, utilizando para ello la etilendiamina, la 1,4 – butilendiamina y la 3-dimetilaminopropilamina.

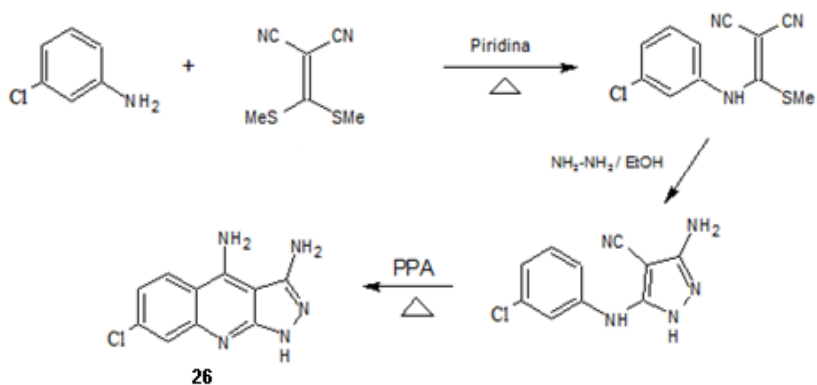


Esquema 3.6. Síntesis general realizada previamente.

Guzmán, W y col. ^[51]; sintetizaron un grupo de compuestos (Esquema 3.7), del tipo 6-cloro-3-metilpirazoloquinolina con cadenas diamínicas en el carbono C-4 y sustituyentes como el átomo de cloro y trifluorometilo en el anillo bencenoide de la estructura **(25)**, al igual que la 3,4-diamino-7-cloro-1H-pirazolo-[3,4-b]-quinolina **(26)** (Esquema 3.8), los cuales poseen una estructura muy semejante a la propuesta como objetivo de éste trabajo, principalmente el mostrado en el Esquema 3.8. Sin embargo, el Esquema 3.7 resulta útil para el estudio previo de la ruta sintética a seguir, dado que se utilizará el cianoacetato de etilo como compuesto de partida, en lugar del acetoacetato de etilo.



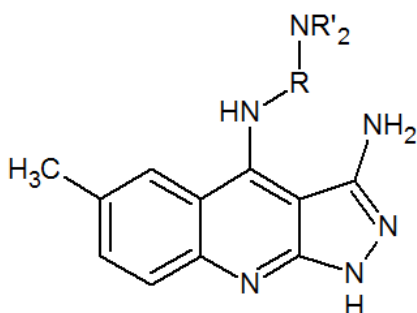
Esquema 3.7. Síntesis de Guzmán, W y colaboradores (estrategia 1)



Esquema 3.8. Síntesis de Guzmán, W y colaboradores (estrategia 2)

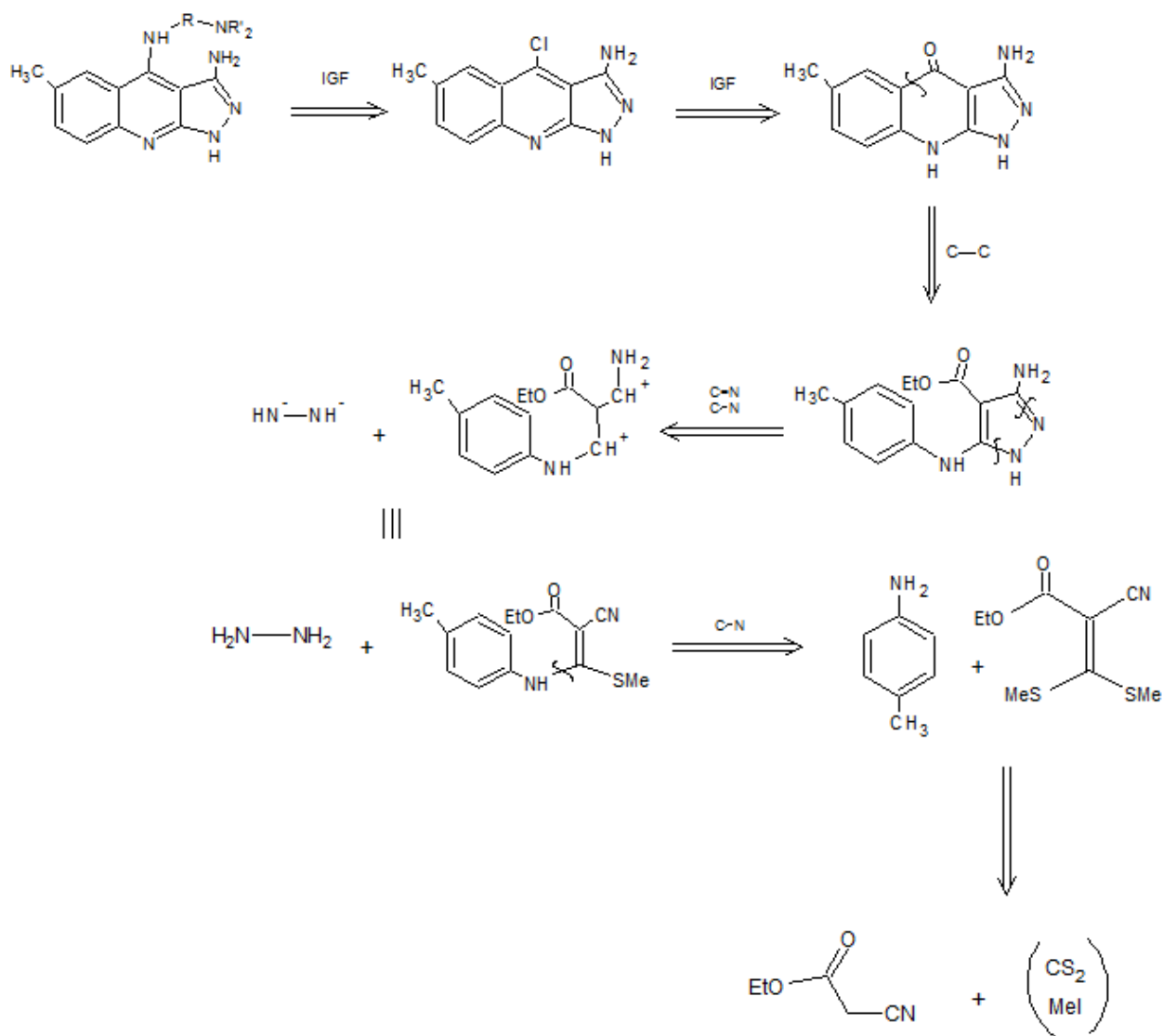
IV. OBJETIVO.

Obtener un grupo de compuestos cuya primordial acción biológica sea la inhibición de la cristalización de la hematina. Para ello se propone la síntesis de un grupo de compuestos del tipo 3-amino-4-dialquilaminoalquil-6-metilpirazoloquinolina, cuya estructura general es la siguiente:



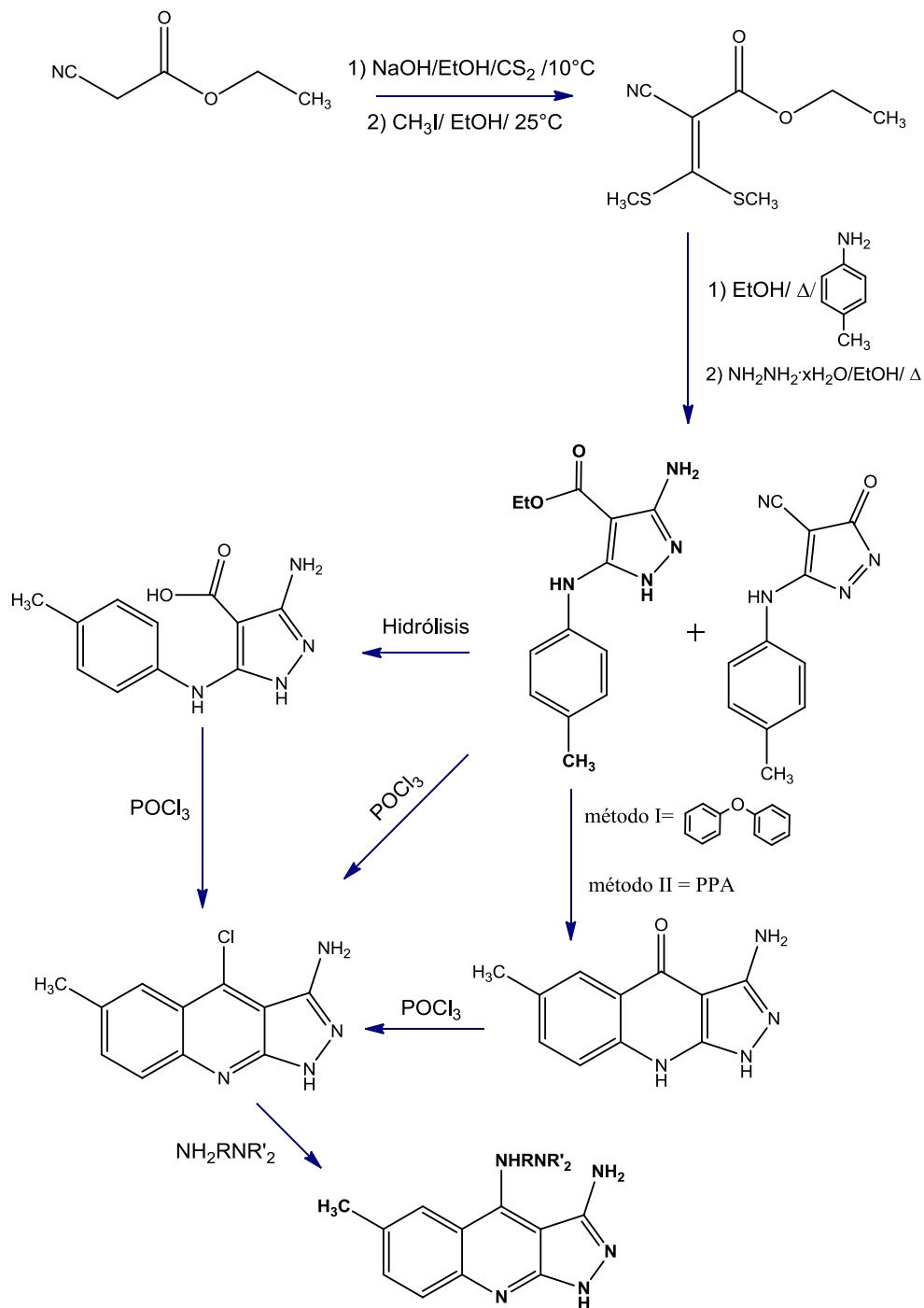
R = alquil 2C – 4C

R' = H, Et



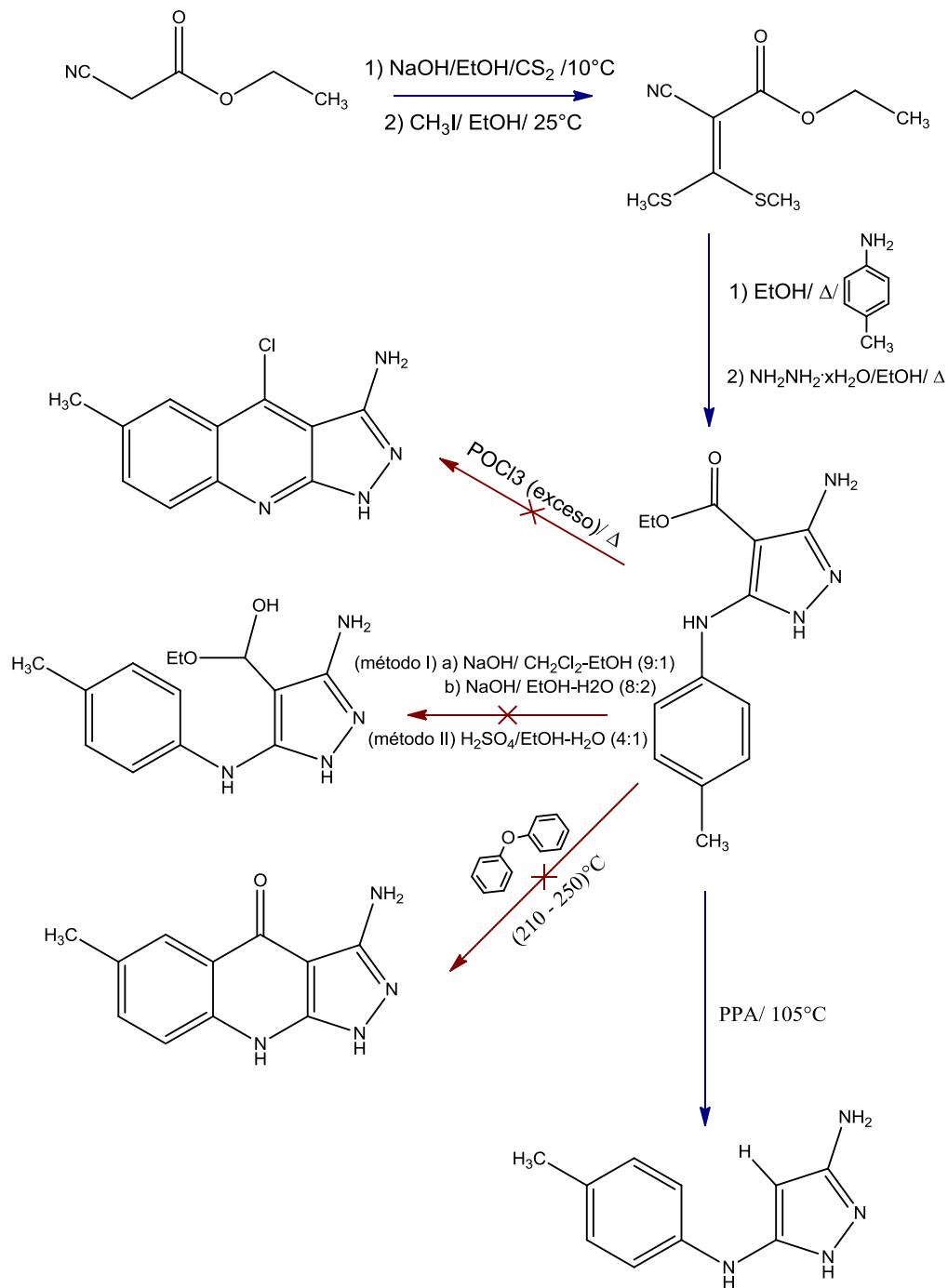
Esquema 5.1. Retrosíntesis de la propuesta.

V.2. RUTA SINTÉTICA PROPUESTA



Esquema 5.2. Ruta sintética propuesta.

V.3. RUTA SINTÉTICA.



Esquema 5.3. Ruta sintética.



V.4. MATERIALES.

V.4.1. Reactivos.

Tabla 5.1. Reactivos utilizados

Reactivo	Fórmula	Marca
Cianoacetato de etilo	$C_5H_7O_2N$	Aldrich
Disulfuro de carbono	CS_2	Merck
Hidróxido de potasio	KOH	Fischer Scientific
Hidróxido de sodio	NaOH	Riedel de Häen
Yoduro de metilo	CH_3I	Fluka A.G.
p-Toluidina	C_7H_9N	Aldrich
Hidrato de hidracina	$NH_2NH_2 \cdot xH_2O$	Aldrich
Oxícloruro de fósforo	$POCl_3$	Merck
Ácido polifosfórico	PPA ($HO(PO_2OH)_nH$)	Aldrich
Difeniléter	Ph_2O	Riedel de Häen
Ácido sulfúrico	H_2SO_4	Merck
Bicarbonato de sodio	$NaHCO_3$	Riedel de Häen
Sulfato de calcio anhidro	$CaSO_4$	Fischer Laboratory Chemical
Sulfato de magnesio anhidro	$MgSO_4$	Aldrich



V.4.2. Solventes.

Tabla 2. Solventes utilizados.

Solvente	Fórmula	Tratamiento
Dioxano	$C_4H_8O_2$	Secado con tamices moleculares, Na y $MgSO_4$ anhidro
Éter etílico*	$(CH_3CH_2)_2O$	--
Etanol	CH_3CH_2OH	Destilado
Diclorometano	CH_2Cl_2	Destilado
Metanol	CH_3OH	Destilado
Acetato de etilo	$CH_3COOC_2H_5$	Destilado
Hexano	C_6H_{14}	Destilado

*Grado analítico, no fue necesario destilarlo.



V.5. MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN.

- A.** Puntos de fusión: fueron determinados en un aparato marca Electrothermal® y no fueron corregidos.
- B.** Cromatografía de capa fina (C.C.F): se utilizó como adsorbente una mezcla sílica gel CAMAG con 5% de CaSO_4 y sílica gel DGF con indicador de luz ultravioleta (254 nm) en proporción 4:1; con un espesor de 0,25 mm sobre placas de vidrio de 20 x 5 cm de dimensión.
- C.** Cromatografía de columna (C.C): se utilizó como adsorbente sílica gel Scharlau con tamaño de partícula 70 -230 mesh ASTM (0,06 – 0,2) mm y sílica gel S marca Riedel de Häen AG (0,032 – 0,63) mm para cromatografía de columna a presión media (C.C.P.M)
- D.** Espectros de infrarrojo (IR): se realizaron en espectrofotómetros marca Perkin Elmer, FT-IR, modelo 1310 y modelo Spectrum RXI. Las frecuencias están dadas en cm^{-1} .
- E.** Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de protones ($\text{RMN-}^1\text{H}$) y de carbono ($\text{RMN-}^{13}\text{C}$): se realizaron en un equipo marca JEOL, modelo ECLIPSE de 270 MHz para ^1H y 67,8 MHz para ^{13}C . Los desplazamientos químicos (δ) están reportados en ppm, a campo bajo la señal del TMS y se emplean las siguientes abreviaturas:

s: singlete

d: doblete

t: triplete

c: cuadruplete

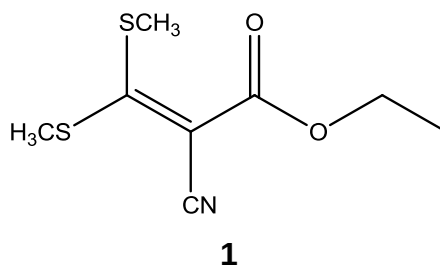
m: multiplete

M: multiplicidad

J: constante de acoplamiento

V.6. MÉTODOS DE SÍNTESIS.

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



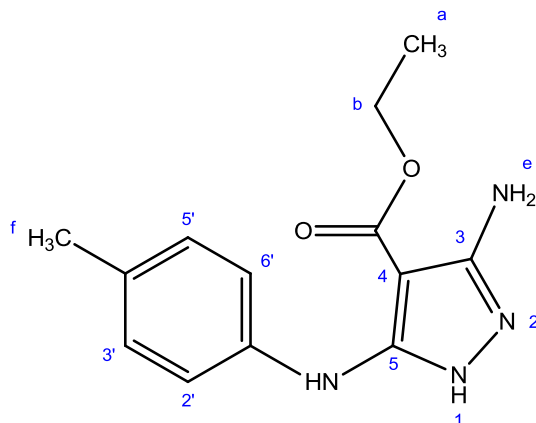
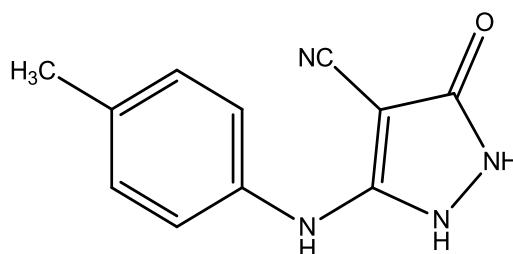
Procedimiento general^[52]: En un balón de 2 bocas se mezclaron 0,02moles (56,1056 g/mol) de hidróxido de potasio (KOH) pulverizado y 10mL de dioxano, provisto de un agitador magnético y colocado en un baño de hielo-agua a 10 °C. En un embudo de adición se agregaron 0,01mol (113,11 g/mol; 1,0063 g/mL) de cianoacetato de etilo y 0,01 moles (76,139 g/mol; 1,261 g/mL) de disulfuro de carbono (CS₂), disueltos en 5mL de dioxano, los cuales fueron agregados a la mezcla anterior, gota a gota. Una vez culminada la adición se mantuvo la agitación y se retiró el baño de hielo-agua hasta observar la formación de un sólido amarillo, que no fue caracterizado, éste fue filtrado a través de un embudo Buchner y lavado con 10mL de éter etílico.

El sólido amarillo filtrado, fue colocado en un beacker y disuelto en 15 mL de etanol (EtOH), luego se le agregó yoduro de metilo (CH₃I) en exceso y se colocó bajo agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos y posteriormente, se removió el solvente por evaporación a presión reducida. Se agregó agua para disolver la sal de potasio formada, se filtró el sólido insoluble por gravedad y se recristalizó de una mezcla etanol-agua. En algunos casos fue necesario el uso de carbón activado para eliminar impurezas coloreadas.

Modificación del procedimiento anterior ^[53]: Se mezclaron 0,5 moles de CS₂; 0,5 moles de cianoacetato de etilo y 50 mL de EtOH en un balón de 2 bocas sumergido en un baño de agua fría. Se adicionó, gota a gota, 1 ml de una solución de NaOH (1N) disuelto en la mínima cantidad de agua necesaria. Al finalizar la adición se removió el baño de agua fría y se continuó agitando hasta que ya no se observó la aparición de un sólido amarillo. Dicho sólido fue filtrado en un embudo Buchner y lavado con 5mL de etanol al 95% frío. El siguiente paso de la reacción se mantuvo igual.

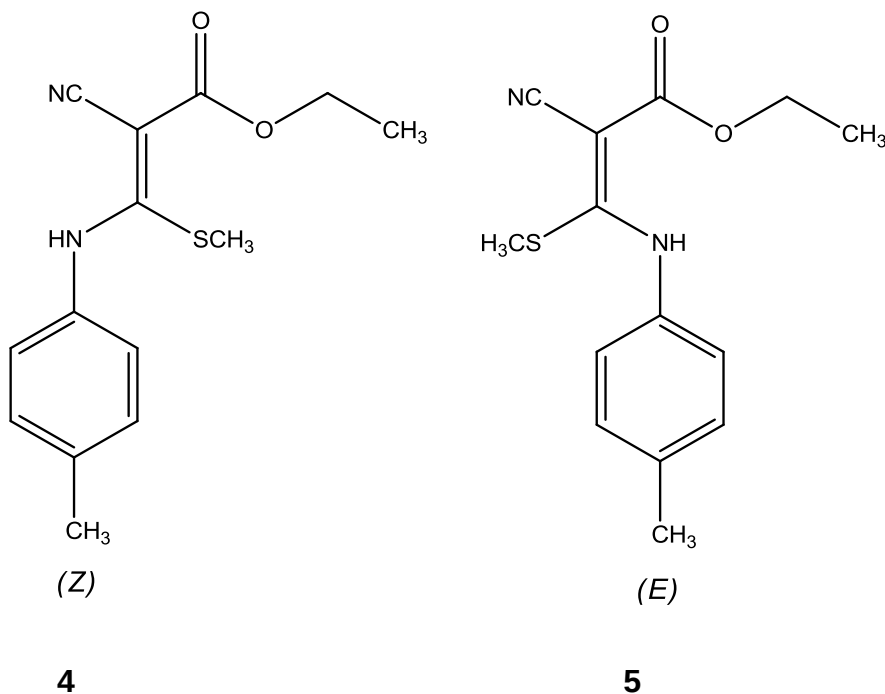
Se obtuvo 7,398 g (217, 31 g/mol) de un sólido blanco cristalino, rendimiento: 76,11%, cuyo punto de fusión es de (58 – 59) °C. IR (película líquida) $\nu_{\text{máx.}}$: 2213, 1703, 1485, 1368, 1026, 911 cm⁻¹ (espectro 1).

- Síntesis del 3-amino-5-(*p*-toluidin)-1*H*-pirazolo-4-carboxilato de etilo **2**:

**2****3**

En un balón de 50 mL provisto de un condensador de reflujo y un agitador magnético, se agregó 1 mmol (217, 31 g/mol) del 2-ciano-3,3-bis(metiltio)acrilato de etilo **1** junto a 1 mmol (107,2 g/mol; 1,05 g/mL) de *p*-toluidina, disueltos en 5mL de etanol. La mezcla homogénea se calentó a reflujo hasta observar la desaparición, en C.C.F., casi total, del acrilato de partida, utilizando como eluyente una mezcla de diclorometano (CH₂Cl₂) – hexano (C₆H₁₄) en una relación 3:2; luego se dejó enfriar la

reacción a temperatura ambiente. El producto no fue aislado, debido al fuerte mal olor del metiltiol desprendido y a que podría tratarse de una mezcla de isómeros (E/Z)- 2-ciano-3-(metiltio)-3-(*p*-toluidin)acrilato de etilo **4** y **5** difícil de separar.

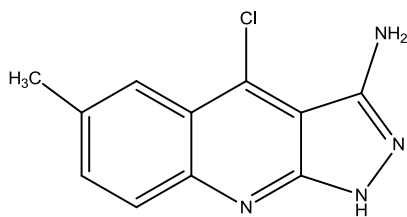


En el balón que contenía la reacción anterior, una vez a temperatura ambiente, se agregó un par de gotas de hidrato de hidracina ($\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$). La mezcla se calentó a reflujo, en constante agitación, hasta la desaparición de los compuestos de partida, a través del seguimiento por C.C.F., eluida con una mezcla de acetato de etilo (AcOEt) – C_6H_{14} en una relación 3:1. En algunos casos fue necesario agregar un par de gotas más del hidrato de hidracina. Luego se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregó agua al crudo de la reacción, precipitando un sólido beige que fue filtrado por succión, obteniéndose 5,848 g (260,29 g/mol; 98,54%) de producto. Éste fue purificado mediante C.C. con una mezcla de CH_2Cl_2 – EtOH (0,5% de etanol) y una segunda vez

por C.C.P.M con la misma mezcla de solventes. Su punto de fusión fue de (175 – 178) °C. IR (CHCl_3) $\nu_{\text{máx}}$: 3173, 1673, 1598, 1578, 1552, 1116 cm^{-1} (Espectro 2). RMN- ^1H (270 Hz, DMSO-d_6 , δ): 1,27 (t, 3H; Ha); 2,19 (s, 3H, Hf); 4,21 (c, 2H; Hb); 5,96 (s, 2H, NH); 7,01 (d, 2H; H-3', H-5'); 7,37 (d, 2H, H-2', H-6'); 7,87 (s, 1H, NH); 11,07 (s, 1H, NH) ppm (Espectro 3).

La 4-ciano-5-(*p*-toluidin)-3-pirazolona **3**, que se esperaba como producto, no pudo aislarse en cantidad suficiente para ser identificada.

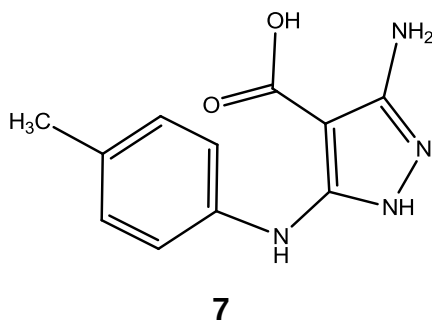
- Intento de síntesis de la 3-amino-4-cloro-6-metil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]quinolina **6**:

**6**

En un balón de 50 mL provisto de un condensador de reflujo y un agitador magnético, se agregó 0,2 mmoles de 3-amino-5-(*p*-toluidin)-1*H*-pirazolo-4-carboxilato de etilo **2** y oxiclورو de fósforo (POCl_3) en exceso. La mezcla fue calentada bajo reflujo durante el tiempo necesario para observar la desaparición de la mayor cantidad de **2** a través de C.C.F, eluida en una mezcla de CH_2Cl_2 – MeOH (0,2% en MeOH). Posteriormente, se dejó enfriar a temperatura ambiente, se agregó al crudo de la reacción una mezcla de agua-hielo y luego fue neutralizada con bicarbonato de sodio (NaHCO_3) sólido. Se obtuvo un sólido marrón que fue filtrado y la solución se extrajo con 3 porciones de 5mL de acetato de etilo (AcOEt). La capa orgánica se secó con sulfato de calcio anhidro (CaSO_4), se filtró y se evaporó el solvente a presión reducida.

El sólido filtrado resultó ser el éster de partida que quedó sin reaccionar y el sólido obtenido en la capa orgánica mostró una gran cantidad de manchas al analizarlo por C.C.F. y debido a los bajos rendimientos de éste, no fue purificado.

- Intento de síntesis del ácido 3-amino-5-(*p*-toluidin)-1*H*-pirazolo-4-carbóxico **7**:



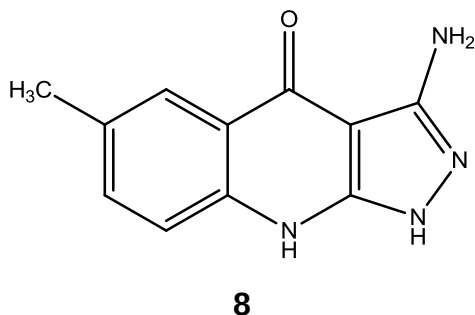
Hidrólisis Básica en ausencia de agua ^[54]: En un balón provisto de un agitador magnético se colocó una solución de CHCl_2 -MeOH (9:1), a la cual se agregó 0,2 mmoles de **2**, junto a 0,4 mmoles de NaOH y se calentó a reflujo durante 5 horas. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se le agregaron unas gotas de agua, dejándose bajo agitación de un día para otro. Se filtró el sólido obtenido y la solución fue evaporada a presión reducida. A través de una C.C.F comparativa se determinó que el sólido obtenido fue el mismo éster **2** de partida.

Hidrólisis Básica: Se colocaron 0,2 mmoles de 3-amino-5-(*p*-toluidin)-1*H*-pirazolo-4-carboxilato de etilo **2**, 0,8 mmoles (39,997 g/mol) de NaOH y 20 mL de una mezcla de etanol-agua (8:2) en un balón de reacción de 50 mL, provisto de un agitador magnético y un condensador. Se calentó a reflujo durante 4 horas y luego se dejó agitando a temperatura ambiente durante 2 días. Se adicionó agua al crudo de reacción y se neutralizó con ácido clorhídrico (HCl) al 5% hasta pH neutro. Se filtró por gravedad el

sólido fino de color marrón que precipitó y luego se evaporó a presión reducida la solución acuosa restante. Del sólido filtrado obtenido, se extrajo un sólido más claro en CH_2Cl_2 que presentó un espectro de IR (Espectro 4) mediante el cual no se pudo identificar el producto de interés; el sólido disuelto resultó ser una sal.

Hidrólisis Ácida: Se agregó 0,2 mmoles del éster **2**, en un balón de 50 mL que contenía 5 mL de EtOH- H_2O (4:1) y 5 gotas de ácido sulfúrico (H_2SO_4). Se colocó en agitación y reflujo durante 4 horas y media, luego se dejó agitando a temperatura ambiente durante 72 horas. Se agregó agua al crudo de la reacción y se neutralizó con NaHCO_3 sólido; precipitó un sólido que fue filtrado por gravedad (insoluble en agua) y se extrajo la solución con 3 porciones de 5mL de AcOEt. Las porciones de capa orgánica se unieron y se evaporó el solvente por presión reducida, sin obtener ningún sólido. Al hacer el análisis por C.C.F. se encontró que en el sólido obtenido correspondía al éster de partida **2**.

- Intento de síntesis de la 3-amino-6-metil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]quinol-4(9*H*)-ona **8**:



Reacción con difeniléter: En un balón de 50 mL, provisto de un agitador magnético y un condensador, se agregó 1 mL de difeniléter que fue calentado a 210 °C. Se agregó el éster **2** y se dejó en calentamiento durante aproximadamente 1 hora y cuarto, luego se dejó agitando a temperatura ambiente durante 72 horas. Posteriormente, se agregaron

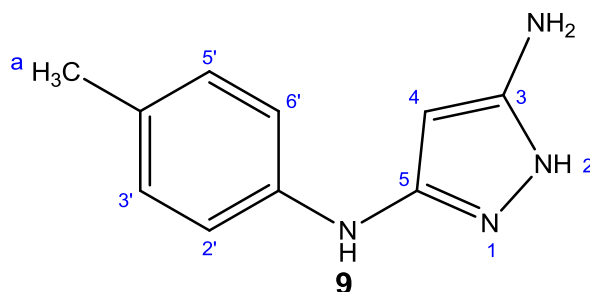


15 mL de hexano y precipitó un sólido que fue filtrado por succión, cuya C.C.F comparativa demostró que se trataba del reactivo de partida **2**. Se repitió el procedimiento aumentando la temperatura y el tiempo de reacción sin obtener resultados diferentes.

Reacción con Ácido Polifosfórico (PPA): En un balón de 50 mL provisto de un condensador de reflujo y un agitador magnético, se agregó PPA en exceso y se calentó hasta temperaturas que fueron de 70 a 200 °C, luego se añadió el éster de partida **2** y se mantuvo bajo reflujo hasta observar que la mayor cantidad de éste se había consumido. Se dejó enfriar a temperatura ambiente, luego se agregó al crudo de la reacción una mezcla de agua-hielo y se neutralizó con NaHCO_3 sólido. Se obtuvo un sólido marrón que fue filtrado por succión y la solución fue extraída con 3 porciones de 5 mL de AcOEt. El solvente de la capa orgánica fue secado con CaSO_4 anhidro y evaporado a presión reducida; el crudo obtenido (Espectro 5) fue purificado en C.C. empleando como eluyentes: hexano, hexano-diclorometano, diclorometano, diclorometano-metanol y metanol; hasta aislar los 3 productos mayoritarios que se podían observar a través de la C.C.F., cuyos espectros de IR (Espectro 6) son iguales, sin evidenciarse presencia del producto de interés.

Se modificaron las cantidades del éster **2** inicial, la temperatura y los tiempos de reacción, en búsqueda de mejores resultados. Asimismo, se realizó el procedimiento calentando paulatinamente la mezcla de PPA y el éster de partida **2**; también se realizaron extracciones con 3 porciones de 5 mL de CH_2Cl_2 y luego con 3 porciones de 5 mL de AcOEt, de la solución acuosa resultante y en otras oportunidades se realizaron re-extracciones de las capas acuosa y orgánica. Sin obtener resultados muy diferentes.

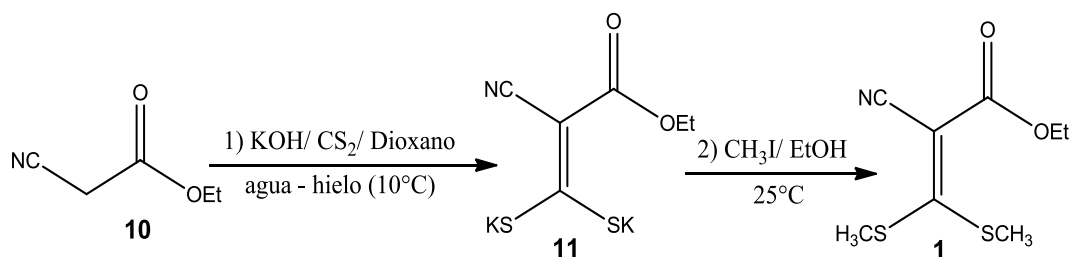
- Posible síntesis del 3-amino-5-(*p*-toluidin)-1*H*-pirazol **9** :



Para la reacción a (100 – 105) °C; 1,2 mmol del éster de partida **2** , a reflujo, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, se obtuvo 90 mg del crudo extraído de la capa orgánica. De éste se obtuvo un sólido incoloro cristalino (propuesto como **9**; 188,23 g/mol) purificado a través de C.C. (CH₂Cl₂ – MeOH al 1%). **R**= 19,61%, cuyo punto de fusión es (158-160)°C. IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$: banda ancha (1610 – 1420) cm⁻¹ (Espectro 7). RMN-¹H (270 Hz, DMSO-d₆, δ): 2,16 (s, 3H, CH₃), 4,89 (s, 1H, H-4), 6,92 (d, 2H, H-3', H-5'), 7,15 (d, 2H, H-2', H-6'), 7,89 (s, 1H, NH) ppm (Espectro 8).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

El primer paso de la ruta sintética propuesta corresponde a la obtención del 2-ciano-3,3-bis(metiltio)acrilato de etilo **1**, para lo cual se siguió la metodología propuesta por Söderback^[52] (Esquema 6.1), en la cual la primera etapa de la reacción ocurre a partir del metileno activo: cianoacetato de etilo **10**, una base fuerte (KOH) y el disulfuro de carbono (CS₂) a bajas temperaturas, formando el 2-ciano-3-etoxi-3-oxoprop-1-eno-1,1-ditiolato de potasio **11**, de color amarillo.



Esquema 6.1. Síntesis del 2-ciano-3,3-bis(metiltio)acrilato de etilo.

La reacción ocurre vía formación del carbanión por acción de la base sobre el metileno activo de **10** lo cual favorece el ataque nucleofílico al CS₂. Dado que el carbono α al carbono carbonílico de **10** posee dos protones ácidos que reaccionan con la base, se favorece la formación del doble enlace y en consecuencia, de la respectiva sal de potasio **11**; la cual no fue aislada debido a su naturaleza higroscópica. Sin embargo, se observó cualitativamente que la cantidad de sal formada no era la esperada, en principio debido a que el KOH se adhería a las paredes del balón y eso podría interferir con la interacción eficiente entre los reactivos. En consecuencia, fue necesario probar algunas modificaciones que pudiesen mejorar los rendimientos de la reacción, las cuales se encuentran resumidas en la Tabla 6.1.



Tabla 6.1. Síntesis del 2-ciano-3,3-bis(metiltio)acrilato de etilo **1**, reacción de Söderback.

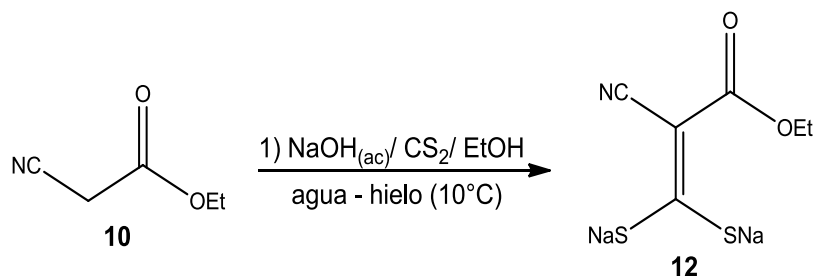
Reacción	CAE (mol)	CS ₂ (mol)	KOH (mol)	Solvente	Tiempo paso 1 (h:m)	Tiempo paso 2 (h:m)	Rendimiento (%)
A1	0,01	0,01	0,02	Dioxano	1:00	0:30	48,34
A2	0,05	0,05	Exceso	Dioxano	2:00	1:00	37,48
A3	0,01	0,01	0,02	Dioxano- éter etílico	1:40	0:50	78,64
A4	0,02	0,02	0,04	Dioxano- éter etílico	2:00	1:00	57,38
A5	0,03	0,03	0,06	Dioxano- éter etílico	2:00	0:50	38,64
A6	0,01	0,01	0,02	Dioxano seco	1:15	0:40	53,75

CAE= cianoacetato de etilo

Se observa que al agregar un exceso de base (reacción A2), el rendimiento de la reacción disminuye; pero aunque al utilizar éter etílico como solvente junto a dioxano (reacción A3) el rendimiento mejora considerablemente, las condiciones no fueron reproducibles al intentar repetirlas a una escala mayor, por lo cual se intentó

nuevamente la reacción con los compuestos que quedaron sin reaccionar del primer paso (antes de la metilación), en lo que se denominó una ‘reacción continua’. Sin embargo, eso tampoco fue viable al duplicar las cantidades iniciales de los reactivos. Como última estrategia, se intentó secar los solventes y exponer lo menos posible al ambiente el KOH, de forma de evitar la presencia de agua en la reacción; pero eso aún no fue suficiente para mejorar los resultados.

El segundo paso de la secuencia transcurrió idealmente, con la rápida formación del producto y su fácil aislamiento, todas las veces que se intentó, lo cual significa que el rendimiento total de la secuencia refleja el rendimiento del primer paso. Por lo que se consideró modificar la primera parte de la reacción (Esquema 6.2).



Esquema 6.2. Modificación de la reacción de Söderback.

La modificación de la reacción de Söderback reportada por Henriksen^[53] introduce no sólo el cambio de la base a utilizar, sino también la forma en la que ésta se usa. Bajo estas condiciones, el NaOH se encuentra disuelto en la mínima cantidad de agua necesaria y en lugar de adicionarse los demás reactivos a ésta solución, es la base la que se añade. Esto representa, en general, un mejor manejo de las condiciones de reacción y de los reactivos, bajo el ambiente del laboratorio, lo cual se reflejó en los mejores rendimientos para la obtención del 2-ciano-3-etoxi-3-oxoprop-1-eno-1,1-



ditiolato de sodio **12**, de color amarillo intenso. Aunque éste producto tampoco fue aislado por tratarse también de una sal higroscópica que tiende a descomponerse en el tiempo, se puede observar en los resultados de la Tabla 6.2, como el rendimiento general no sólo aumenta sino que también se mantiene, al duplicar las cantidades de los reactivos, aun cuando la segunda parte de la reacción se mantuvo bajo el mismo procedimiento. Además, la nueva estrategia mejoró los tiempos de reacción, disminuyéndolos considerablemente, por lo cual resultó la forma más adecuada para obtener el acrilato **1** de interés.

Tabla 6.2. Síntesis del 2-ciano-3,3-bis(metiltio)acrilato de etilo **1** a partir de la modificación de la reacción de Söderback.

Reacción	CS ₂ (mol)	CAE (mol)	NaOH(ac) 1N (mL)	Tiempo paso 1 (h:m)	Tiempo paso 2 (h:m)	Rendimiento (%)
B1	0,007	0,005	0,5	0:23	0:15	67,40
B2	0,01	0,01	1,0	1:00	0:50	76,10
B3	0,05	0,05	4,0	0:40	0:40	76,11

CAE= cianoacetato de etilo

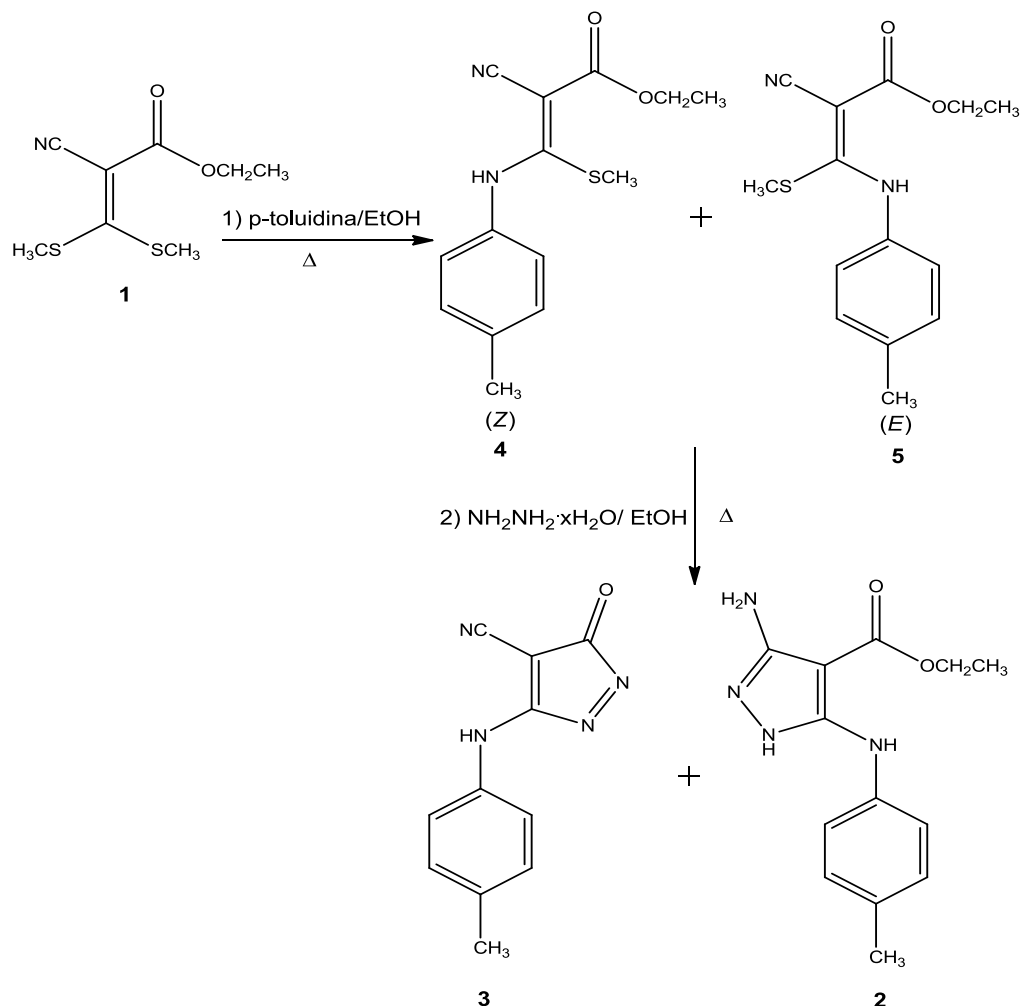
El producto **1**, obtenido con un 76% de rendimiento, fue purificado por recristalización en una mezcla de metanol-agua, resultando un sólido blanco cristalino cuyo punto de fusión fue de (58 – 59)°C, mientras que el reportado^[52] es de (58,5 – 59)°C . En el espectro IR (Espectro 1) se puede observar claramente la señal del nitrilo



en 2213cm^{-1} , la banda de tensión carbonílica en 1703cm^{-1} , las bandas de tensión para los enlaces $\text{C}=\text{CS}_2$ en 1464cm^{-1} , 1026cm^{-1} y 911cm^{-1} , las cuales corresponden bien con las reportadas^[52] para el compuesto en 2217cm^{-1} , 1700cm^{-1} , 1485cm^{-1} , 1020cm^{-1} y 910cm^{-1} ; respectivamente.

El segundo paso de la ruta sintética propuesta (Esquema 6.3) corresponde a la reacción entre el acrilato **1**, obtenido anteriormente y la *p*-toluidina, en etanol, para producir, probablemente, los isómeros (*E/Z*)-2-ciano-3-(metiltio)-3-(*p*-toluidin)acrilato de etilo, **4** y **5**, los cuales no fueron aislados debido al fuerte mal olor del metiltiol que se desprende durante la reacción y la posible complicación en su separación. Para ésta reacción se utilizaron los reactivos en una relación estricta 1:1, de forma que se asegurara la sustitución por una sola molécula de *p*-toluidina. A partir del monitoreo por C.C.F., se observó la ausencia casi total del acrilato de partida y total de la amina, así como la presencia de dos manchas adicionales, para determinar el fin de la reacción. Como segundo paso se agregó un par de gotas de hidrato de hidracina a la solución de la reacción y se volvió a calentar a reflujo, realizando el continuo seguimiento por C.C.F. para determinar la cantidad de $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ necesaria.

Aunque se esperaba la formación del 3-amino-5-(*p*-toluidin)-1*H*-pirazolo-4-carboxilato de etilo **2** y de la 4-ciano-5-(*p*-toluidin)-3-pirazolona **3**, ésta última no pudo aislarse en una cantidad significativa para ser caracterizada, por lo cual en caso de haberse formado debió ser en una proporción muy pequeña, lo que indica que **2** es el producto principal de la reacción.



Esquema 6.3. Síntesis del 3-amino-5-(*p*-toluidin)-1*H*-pirazolo-4-carboxilato de etilo y la 4-ciano-5-(*p*-toluidin)-3-pirazolona.

En la reacción entre la *p*-toluidina y el acrilato **1**, al parecer el isómero favorecido es el (*E*)-2-ciano-3-(metiltio)-3-(*p*-toluidin)acrilato de etilo **5**, probablemente debido a una interacción vía puente de hidrógeno entre el oxígeno carbonílico y el hidrógeno del grupo amino (Figura 6.1); lo cual favorecería la colocación de los grupos en esa forma.

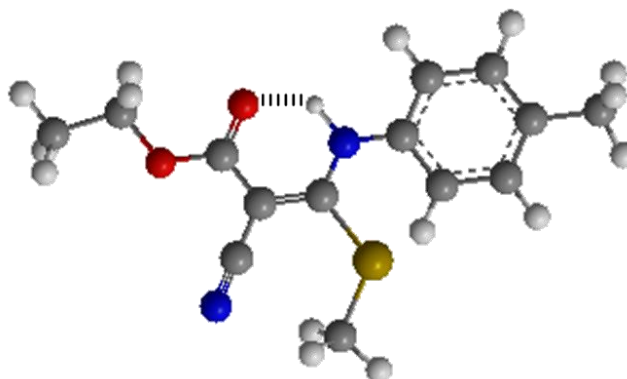
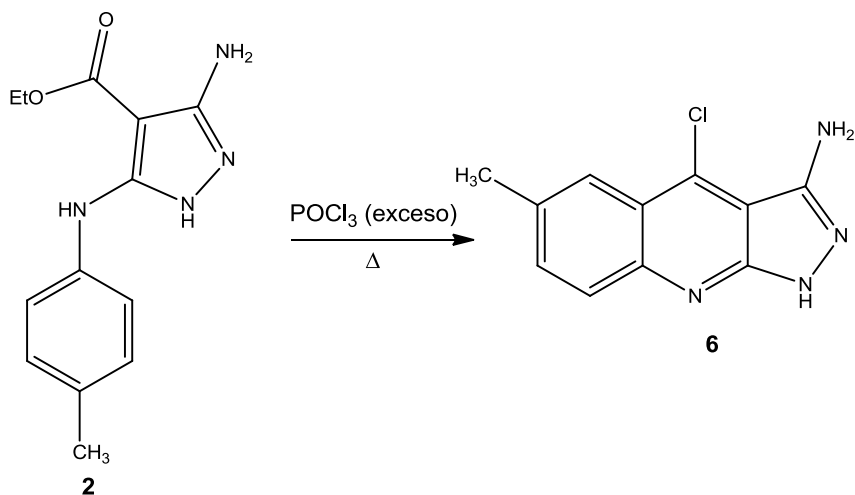


Figura 6.1. Interacción vía puente de hidrógeno en el isómero 5

Esa misma interacción en el isómero *E* del anilino acrilato, favorecería la deslocalización de los electrones del doble enlace y del nitrógeno hacia el carbono carbonílico, aumentando la densidad electrónica sobre él, haciéndolo menos susceptible a un ataque nucleofílico. Por lo tanto, el ataque de la hidracina al carbono del nitrilo se vería favorecido, conduciendo a la formación del anillo pirazólico.

El sólido beige aislado fue purificado en dos partes, una primera por C.C. y las fracciones intermedias que contenían los productos de interés se purificaban mediante C.C.P.M., utilizando en ambos casos la mezcla de solventes CH_2Cl_2 – EtOH (0,5% de etanol). El producto obtenido mostró un punto de fusión de $(175 - 178)^\circ\text{C}$. En el espectro de IR destacan las señales del enlace NH entre $3200 - 2900\text{ cm}^{-1}$ y la señal del carbonilo en 1673 cm^{-1} . Del espectro de RMN- ^1H (DMSO- d_6) destacan las señales del triplete a 1,27 ppm ($J = 6,67\text{ Hz}$) y del cuádruplete a 4,21 ppm ($J = 6,67\text{ Hz}$), correspondientes a los protones del etilo del grupo éster; el patrón de sustitución aromática con un doblete en 7,01 ppm ($J = 7,91\text{ Hz}$) asignado a H-3' y H-5' que son equivalentes y, otro en 7,37 ppm ($J = 7,67\text{ Hz}$) asignado a H-2' y H-6', también equivalentes; el singlete en 2,19 ppm fue asignado al metilo del anillo aromático; el

singlete a 5,96ppm que integra para 2H y corresponde al NH₂ del pirazol, el singlete en 7,87ppm correspondiente al protón NH sobre el anillo bencénico y el singlete que también integra 1H en 11,07ppm que corresponde al NH del anillo pirazol.



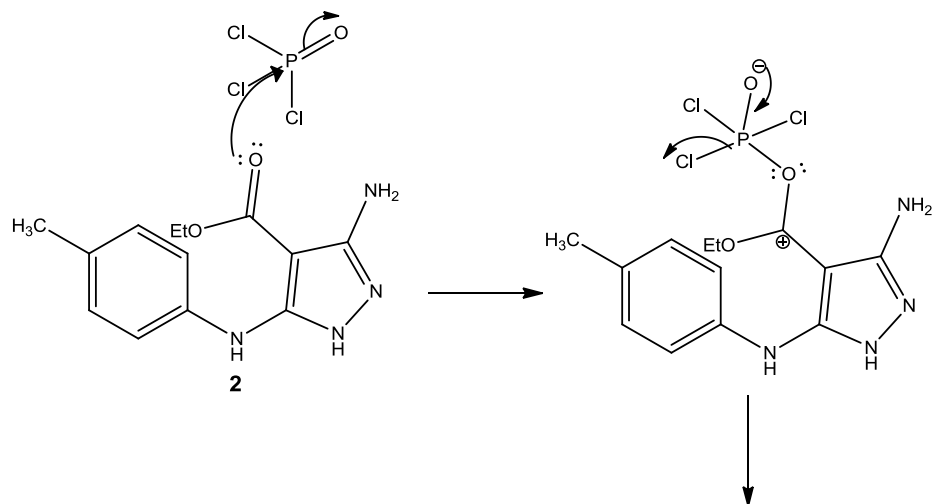
Esquema 6.4. Intento de síntesis de la 3-amino-4-cloro-6-metil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]quinolina.

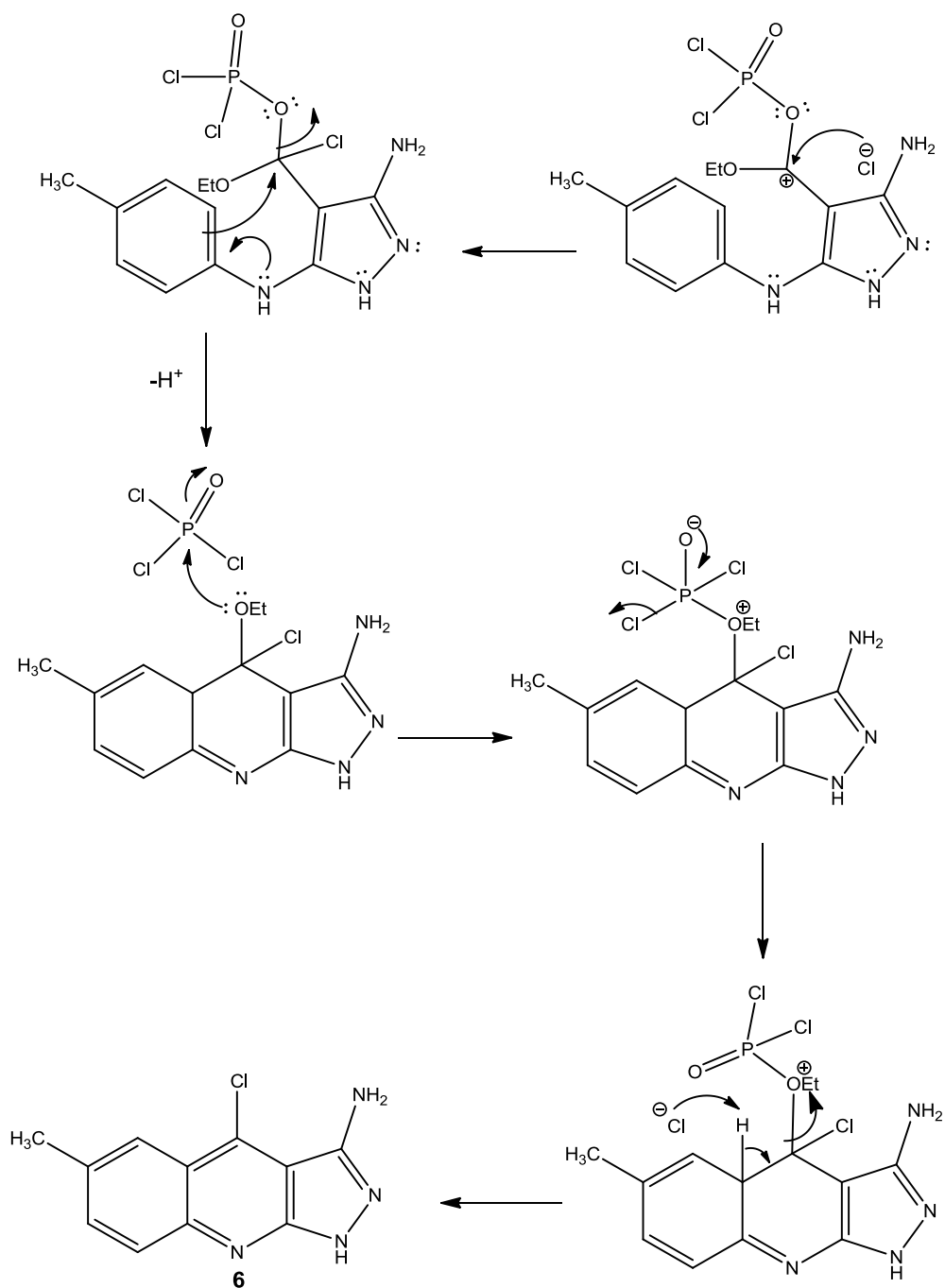
Para el tercer paso de la ruta sintética se probaron varias estrategias. La primera de ellas (Esquema 6.4) se trató de la reacción entre el éster **2** y el POCl₃ para obtener la 3-amino-4-cloro-6-metil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]quinolina **6**. Sin embargo, el sólido crudo que se obtuvo mostraba una amplia cantidad de manchas al ser analizado por C.C.F., lo cual podría deberse a descomposición del producto o del sustrato. Además los rendimientos resultaron ser muy bajos (Tabla 6.3), disminuyeron al aumentar el tiempo de reacción, incluso utilizando el POCl₃ recién destilado y aún más cuando se duplicaron las cantidades del reactivo de partida **2**.

Tabla 6.3. Resultados del intento de síntesis con POCl_3

Reacción	Ester 2 (mmol)	Tiempo (h:m)	Rendimiento del crudo (%)
C1	0,2	4:00	29,16
C2	0,2	19:30	19,23
C3	0,4	20:00	3,30

La reacción con el POCl_3 podría ocurrir mediante el siguiente mecanismo para obtener la quinolina de interés **6**:





Sin embargo, en el caso del núcleo utilizado hay varios átomos que podrían interactuar con el POCl_3 , por lo que se pueden estar originando varios productos (Figura 6.2), haciendo la reacción poco viable desde el punto de vista del rendimiento. Además, aun cuando el tiempo de la reacción se aumenta considerablemente no se favorece ningún producto en particular, sino que la conversión del éster de partida **2** parece incluso ser menor. Dado que, al aumentar las cantidades de los reactivos de partida el rendimiento disminuye significativamente y la purificación de los productos obtenidos sería muy compleja, la estrategia fue descartada para éste paso de la ruta sintética.

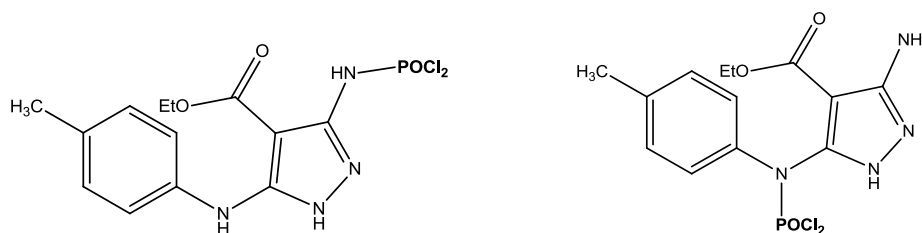
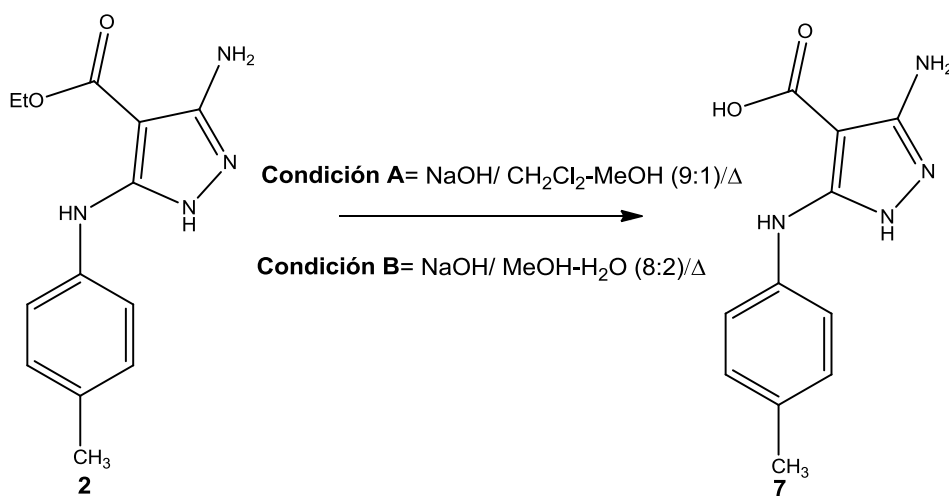


Figura 6.2. Posibles productos colaterales en la reacción con POCl_3 .

La segunda estrategia utilizada fue la hidrólisis básica de ésteres para obtener el ácido 3-amino-5-(*p*-toluidin)-1*H*-pirazolo-4-carbóxico **7**, la cual se realizó mediante dos condiciones. En la primera^[54] (Esquema 6.5, condición A) se utilizó una mezcla de CH_2Cl_2 -MeOH (9:1) como solvente e hidróxido de sodio sólido. Sin embargo, bajo éste procedimiento no se observó disminución del éster **2**, monitoreado por C.C.F, incluso agregando posteriormente unas gotas de agua y dejando la reacción bajo agitación de un día para otro. Por ello, se intentó la hidrólisis utilizando las condiciones tradicionales (Esquema 6.5, condición B), usando una mezcla de MeOH- H_2O (8:2) pero, al igual que en el caso anterior luego de varias horas de mantener la reacción bajo reflujo no se obtenía cambio aparente del éster **2** de partida, por lo cual se dejó la reacción bajo agitación durante varios días, hasta que se observó cambio en la C.C.F de la misma,

obteniéndose un sólido fino de color marrón que precipitó al neutralizar mezcla de reacción y un sólido blanco obtenido al evaporar el solvente a presión reducida.



Esquema 6.5. Intento de síntesis del ácido 3-amino-5-(*p*-toluidin)-1*H*-pirazolo-4-carbóxico.

Del sólido marrón obtenido se extrajo un sólido más claro, utilizando CH₂Cl₂, que en la C.C.F. mostró ser distinto al éster de partida **2**. Se realizó su espectro de IR (Espectro 4) donde destaca la banda de los enlaces N-H entre (3600-3200) cm⁻¹ una banda ancha entre (1700-1500) cm⁻¹ que pareciera indicar que se trata de una mezcla de productos. Sin embargo, no se puede concluir alguna otra cosa a partir de la evidencia. El resto del sólido aislado correspondió al éster de partida **2** sin reaccionar.

La salida del protón del N ubicado entre los dos anillos, favorecería la deslocalización de un par de electrones hacia el carbono carbonílico, disminuyendo el

carácter electrofílico de éste y por lo tanto, dificultando el ataque por el ión hidróxido (Figura 6.3).

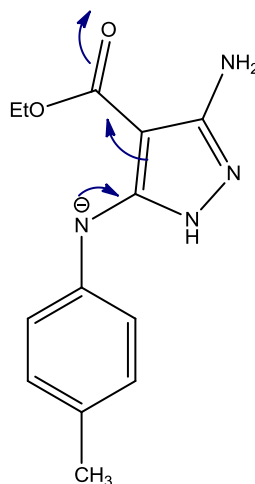
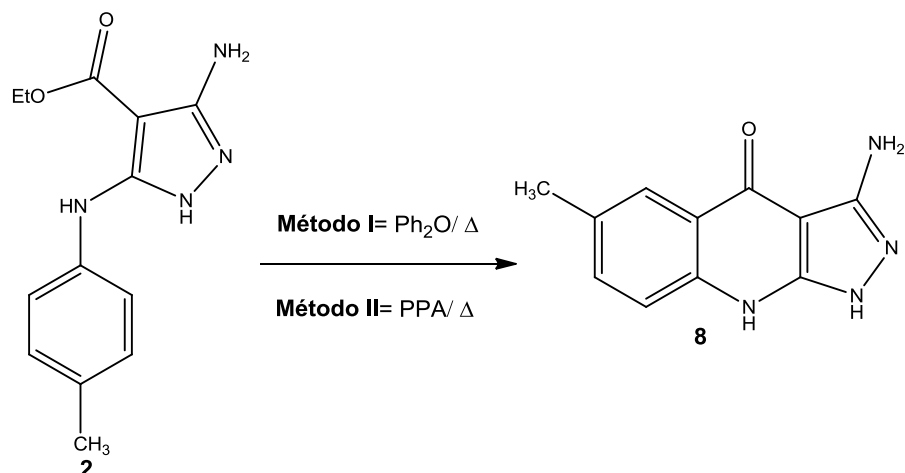


Figura 6.3. Deslocalización de la carga en el 3-amino-5-(*p*-toluidin)-1*H*-pirazolo-4-carboxilato de etilo.

Posteriormente, también se intentó la hidrólisis ácida del compuesto **2** utilizando H_2SO_4 en $\text{EtOH-H}_2\text{O}$ (4:1) y manteniendo la condición de reflujo durante 4 horas y media, sin observar cambio aparente de los reactivos, según su C.C.F., por lo que se dejó bajo agitación durante 2 días a temperatura ambiente. Al realizar el tratamiento posterior sólo se obtuvo un sólido que precipitó al neutralizar la reacción, el cual resultó ser el mismo éster **2** de partida, obteniéndose un 76% de recuperación del reactivo. Demostrando, una vez más, dificultad para realizar la hidrólisis del grupo éster del compuesto **2**. Análogamente al caso de la hidrólisis básica, pueden estar ocurriendo impedimentos electrónicos generados por los distintos átomos de la molécula susceptibles a protonarse en medio ácido.



Esquema 6.6. Intento de síntesis de la 3-amino-6-metil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]quinol-4(9*H*)-ona.

La siguiente estrategia utilizada (Esquema 6.6, método I) corresponde a la reacción del éster **2** con difeniléter (Ph_2O) para obtener la 3-amino-6-metil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]quinol-4(9*H*)-ona **8**. Para ello, se realizó la reacción a 210°C y a más de 250°C , obteniendo un sólido que por su C.C.F comparativa resultó ser el mismo éster **2** de partida; incluso al aumentar el tiempo de reacción de 1 hora y 15 min a 2 horas se obtuvieron el 77% y 84% de recuperación del reactivo de partida, respectivamente. También se intentó dejar la reacción agitando a temperatura ambiente durante 3 días, luego del calentamiento y aun así, el resultado no fue distinto. Por lo que se descartó ésta condición.



Tabla 6.4. Resultados del intento de síntesis de la 3-amino-6-metil-1*H*-pirazolo[3,4-*b*]quinol-4(9*H*)-ona, usando PPA.

Reacción	Ester 2 (mmol)	T (°C)	Tiempo (h:m)	Rendimiento del crudo C.O. (%)
C1	0,4	95	1:30	45,24
C2	0,5	70	20:00	17,43
C3	0,5	85	24:00	89,92*
C4	0,2	140	4:00	38,18
C5	0,4	160	3:20	56,52
C6	0,4	200	2:00	52,94
C7	1,0	165	3:35	58,08
C8	1,2	100	1:30	31,47
C9	1,0	105	2:30	22,97

C.O.: capa orgánica; *Gran proporción de éster de partida **2** sin reaccionar

La última estrategia probada (Esquema 6.6, método II), también para procurar la obtención de la quinolona **8**, consistió en la reacción del éster **2** con ácido polifosfórico (PPA) a distintas temperaturas, tiempos de reacción y a partir de distintas cantidades de reactivo de partida, como se resume en la Tabla 6.4. en la mayoría de las ocasiones excepto en C4, se obtuvo, al agregar agua a la reacción, un sólido que en su C.C.F. mostraba una gran proporción del reactivo de partida **2**; mientras que de la extracción

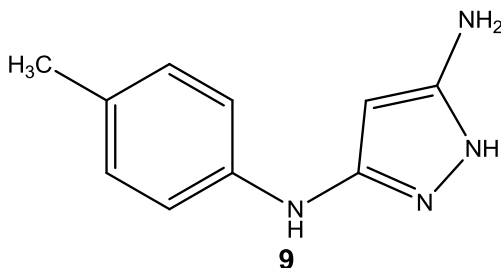
de la capa orgánica se obtuvo un aceite que en su C.C.F mostraba 3 productos principales, los cuales fueron separados mediante C.C., utilizando como eluyentes, en orden de polaridad ascendente: hexano, hexano-diclorometano, diclorometano, diclorometano- metanol y metanol.

Las primeras 3 reacciones de la Tabla 6.4 se realizaron mezclando los reactivos de partida y luego calentando progresivamente hasta obtener la temperatura de reacción indicada; en los casos siguientes el proceso se realizó calentando primero el PPA hasta la temperatura indicada y luego se añadió el éster de partida **2**. El crudo de la capa orgánica para la reacción C1 fue analizado por su espectro de IR (Espectro 5) donde destacan las bandas intensas a 1580cm^{-1} y 1500cm^{-1} que podrían indicar la presencia del compuesto de interés **8**.

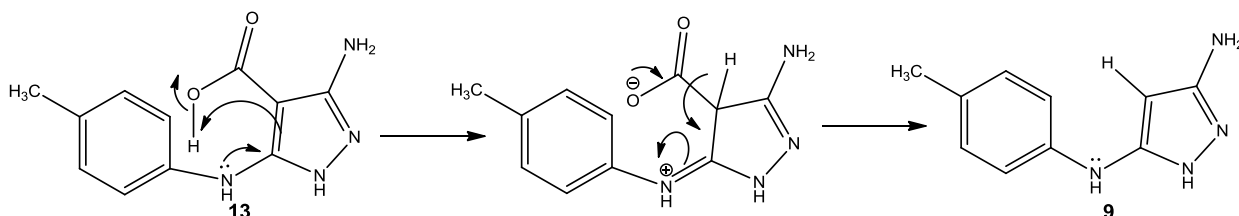
De los casos de C2 y C3 se pudo establecer que la temperatura utilizada no era la más apropiada para llevar a cabo la reacción, ya que el éster de partida **2** no se disolvía bien, lo cual explica el muy bajo rendimiento de C2 y en el caso de C3, se realizó la extracción de la solución acuosa sin filtrar el sólido, lo que condujo a tener en ella gran cantidad del reactivo **2** sin reaccionar. Sin embargo, se notó que las reacciones realizadas a las temperaturas más altas producían crudos de reacción que mostraban más manchas en su C.C.F., lo cual parecía indicar descomposición a medida que se aumenta mucho la temperatura. Aun así, de la unión de las capas orgánicas de C5, C6 y C7 y su purificación a través de C.C. se obtuvieron los compuestos correspondientes a las 3 manchas mayoritarias que se observaban, los cuales se analizaron a través de su espectro de IR (Espectro 6), el cual resultó ser igual para todas ellas. Sin embargo, se puede observar la ausencia de las bandas de interés respecto al espectro de IR realizado al crudo de la reacción, mostrando más característica alifática que aromática, por lo cual los compuestos aislados no

corresponden al compuesto de interés **8** y éste, en caso de estarse produciendo, sería en poca proporción respecto a otros productos colaterales y/o de descomposición del compuesto inicial.

Por último, se reprodujeron las primeras condiciones de reacción (C1), pero con mayor cantidad del reactivo de partida **2**, tal como se observa para el caso de C8 y C9. La unión de los crudos de reacción obtenidos de éstas por extracción de la solución acuosa con AcOEt y su purificación a través de C.C. con una mezcla de CH₂Cl₂- MeOH (1% en MeOH), produjo un sólido cristalino incoloro, con un rendimiento del 19,61% (calculado en base a la obtención de **9**), cuyo punto de fusión fue (158-160)°C y demostró tener un alto grado de pureza según su C.C.F.; su espectro de IR (Espectro 7) muestra un grupo de bandas intensas entre (1610 – 1420)cm⁻¹ que pueden deberse a los dobles enlaces aromáticos. El espectro de RMN-¹H (DMSO-d₆) (Espectro 8) presenta claramente el patrón de sustitución aromática que integra para 4 protones con un doblete en 7,15 ppm (J= 8,42Hz) asignado a H-2' y H-6' y, otro en 6,92 ppm (J= 8,42) asignado a H-3' y H-5'. Esto indica que el producto no corresponde al compuesto ciclado, destacando también que sólo se observa un singlete en 2,16 ppm que integra para 3H, el cual corresponde al metilo del anillo aromático y no se encuentran señales del etilo presente en el compuesto de partida. Adicionalmente, se observan: un singlete a 7,89 ppm y otro a 4,89 ppm, ambos integrando para un protón. En base a estas evidencias, se propone la estructura **9**, como el producto obtenido en éste caso.



En este sentido, se propone que el mecanismo de reacción puede ir a través de una descarboxilación, en la cual el éster de partida **2** pasaría primero por el ácido correspondiente **13** y dado que se encuentra en un medio fuertemente ácido se protonaría alguno de los sitios más propensos para ello, favoreciendo la reacción intramolecular mostrada en el Esquema 6.7, que permitiría obtener el 3-amino-5-(*p*-toluidin)-1*H*-pirazol **9**:



Esquema 6.7. Posible mecanismo de descarboxilación del 3-amino-5-(*p*-toluidin)-1*H*-pirazolo-4-carboxilato de etilo.

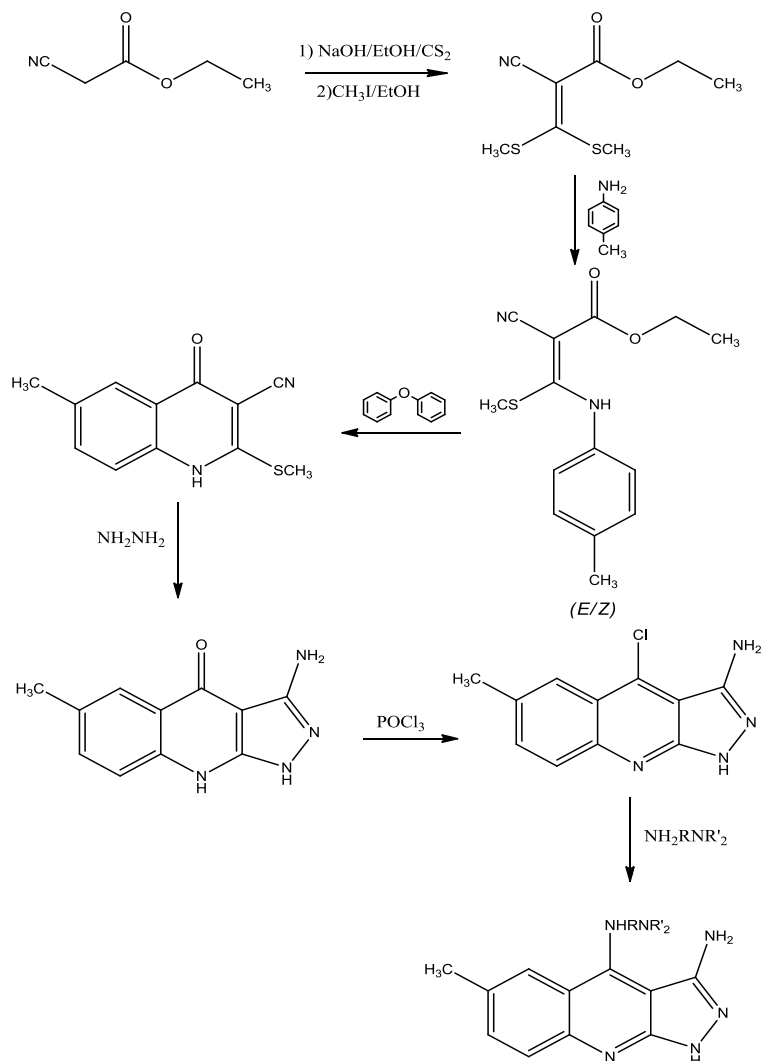


VII. CONCLUSIÓN

- El método sintético utilizado para la obtención del 2-ciano-3,3-bis(metiltio)acrilato de etilo fue el más adecuado proporcionando un rendimiento del 76,1%.
- El isómero más favorecido en la sustitución del 2-ciano-3,3-bis(metiltio)acrilato de etilo es el (*E*)- 2-ciano-3-(metiltio)-3-(*p*-toluidin)acrilato de etilo.
- El producto favorecido en el segundo paso de la ruta sintética es el 3-amino-5-(*p*-toluidin)-1*H*-pirazolo-4-carboxilato de etilo. El cual se obtuvo con un rendimiento del 98%.
- El paso determinante de la ruta sintética es la ciclación del 3-amino-5-(*p*-toluidin)-1*H*-pirazolo-4-carboxilato de etilo, la cual no se logró a partir de ninguna de las estrategias planteadas.
- El 3-amino-5-(*p*-toluidin)-1*H*-pirazolo-4-carboxilato de etilo no sufre reacciones de hidrólisis básica o ácida, en las condiciones utilizadas, debido a los impedimentos electrónicos que se generan.
- En la reacción del 3-amino-5-(*p*-toluidin)-1*H*-pirazolo-4-carboxilato de etilo en ácido polifosfórico, se propone la obtención del 3-amino-5-(*p*-toluidin)-1*H*-pirazol con un rendimiento del 19,61%. El cual parece favorecerse respecto a la reacción de ciclación e impidió la obtención del compuesto final propuesto como objetivo del trabajo.

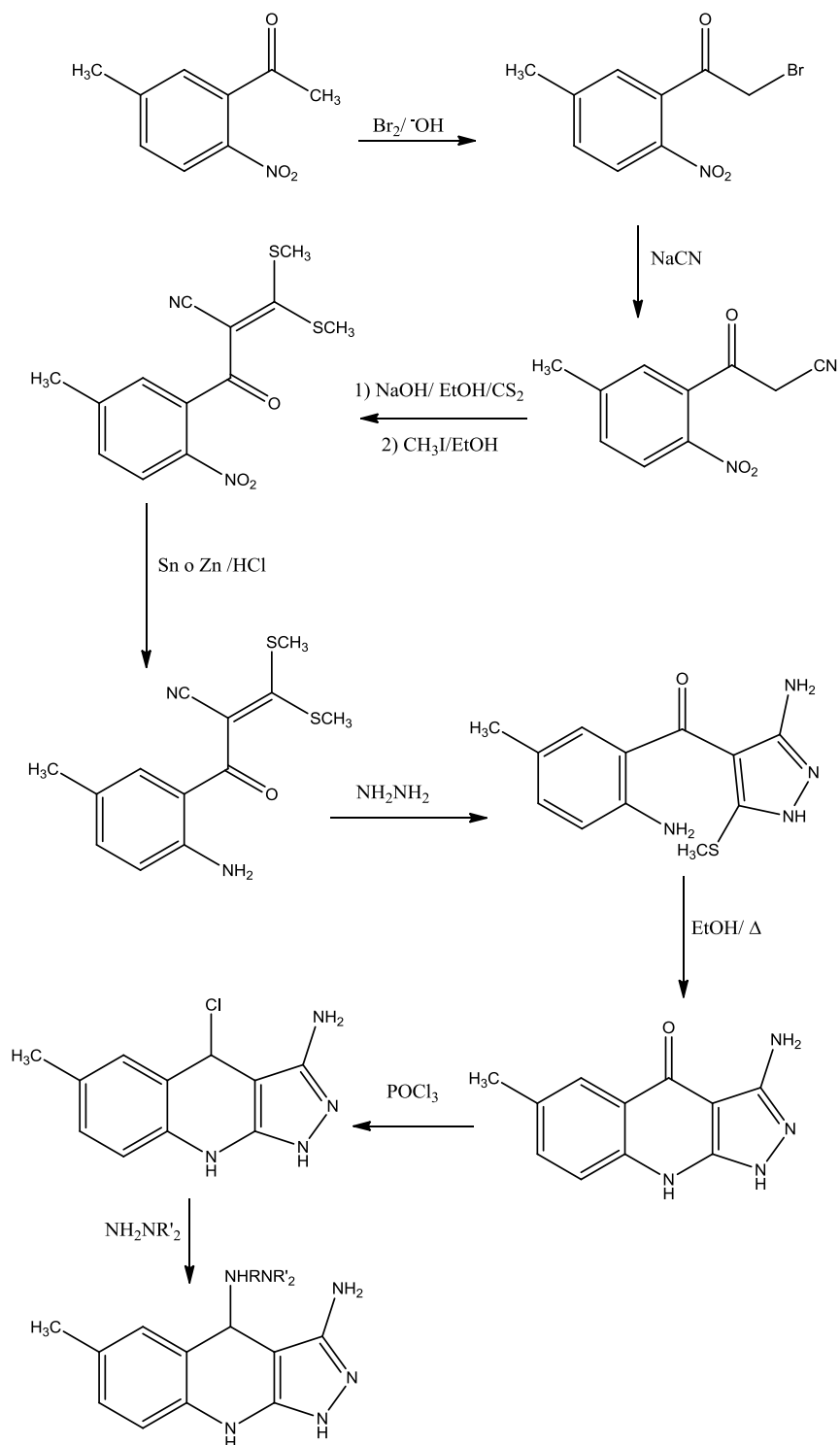
VIII. RECOMENDACIONES

En consecuencia a lo difícil que fue el paso de la ciclación del 3-amino-5-(*p*-toluidin)-1*H*-pirazolo-4-carboxilato de etilo, se deben considerar rutas sintéticas donde se forme el anillo quinolínico primero (Esquema 8.1) o donde los grupos N-H no puedan causar interferencias (Esquema 8.2). En base a esto se proponen las siguientes rutas sintéticas alternativas:



Esquema 8.1. Ruta sintética, propuesta 1.

RECOMENDACIONES



Esquema 8.2. Ruta sintética, propuesta 2.



VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Royal Perth Hospital.[En línea] **2006**, [Citado el: 8 de septiembre de 2010]
<http://www.rph.wa.gov.au/malaria/spanish/historia.html>
2. Administración nacional de laboratorios e institutos de salud. [En línea] [Citado el: 12 de septiembre de 2010]
<http://www.anlis.gov.ar/inst/consulta/infecciosas/malaria/malaria.htm>.
3. Medline Plus. [En línea] **2010**, [Citado el: 24 de septiembre de 2010]
<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000621.htm>
4. Boletín epidemiológico, semana no.42, **2011**. Ministerio del Poder Popular para la Salud, año LIX, págs. 15- 19.
5. Boletín epidemiológico, semana no. 43, **2010**. Ministerio del Poder Popular para la Salud, año LIX, págs. 14-16.
6. Hay, S.; Guerra, C.; Tatem, A.; Noor, A.; Snow, R. "The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future". *Lancet Infect. Dis.* **2004**, 4 (6) 327-336.
7. Breman, J. "The ears of the hippopotamus: manifestations, determinants, and estimates of the malaria burden". *Am. J. Trop. Med. Hyg*, **2001**, 64 (1-2), 1-11.



8. Fidock, D. A.; Rosenthal, P. J.; Croft, S. L.; Brun, R.; Nwaka, S. "Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening". *Nature Rev. Drug Discov.*, **2004**, 3, 509 – 520.

9. Towie, N. "Malaria breakthrough raises spectre of drug resistance". *Nature*, **2006**, 440 (7086), 845 – 968.

10. World malaria report **2009**. Ginebra, Organización Mundial de la Salud.

11. AUCKER, Lilley. Farmacología en enfermería (2da. Edición). Ediciones Harcourt S.A., España, **2000**, págs. 581.

12. GOODMAN, Louis S.; GILMAN, Alfred. Las bases farmacológicas de la terapéutica (9na. Edición). Mc. Graw Hill Interamericana S.A., España, **2001**, págs. 1025, 1033.

13. Pfizer. [En línea] **2010** [Citado el: 12 de octubre de 2010]
https://www.pfizer.es/salud/prevencion_habitos_saludables/salud_viajero/paludismo_malaria.html

14. OAKS, Stanley C. Jr.; MITCHELL, Violaine S.; PEARSON, Greg W.; CARPENTER, Charles C. "Malaria: Obstacles and opportunities". *The National Academy of Sciences*, Washington, D.C., **1991**, pág. 22.

15. Departamento de salud del estado de New York. [En línea] **2003**. [Citado el: 12 de octubre de 2010]
http://www.health.state.ny.us/es/diseases/communicable/malaria/fact_sheet.htm



16. Carretero, M. "Quimioprofilaxis de la malaria". *Offarm*, **2003**, 22 (8), 136 – 138.
17. GUERRANT, Richard L.; WALKER, David y WELLER, Peter F. Enfermedades infecciosas tropicales. Ediciones Harcourt, S.A., España, **2002**. Pág 362.
18. Tulane University. "Malaria" [En línea] **2008**. [Citado el: 16 de septiembre de 2010] <http://www.tulane.edu/~wiser/protozoology/notes/malaria.html#epi>
19. Organización Mundial de la Salud. Estadísticas sanitarias mundiales **2010**, págs. 16,82.
20. Ruppel S.,Ellen. "Resurgence of a deadly disease". [En línea] **1997**. The atlantic online. [Citado el: 16 de septiembre de 2010] <http://www.theatlantic.com/past/docs/issues/97aug/malaria.htm>
21. U.S. global health policy. "The global malaria epidemic". [En línea] **2010** [Citado el: 12 de octubre de 2010] <http://www.kff.org/globalhealth/upload/7882-02.pdf>.
22. Boletín epidemiológico, semana no.52, **2010**. Ministerio del Poder Popular para la Salud, año LIX, págs. 14- 18.
23. Laboratory identification of parasites of public health concern. [En línea] **2009**. [citado el: 16 de septiembre de 2010] <http://dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Malaria.htm>
24. BOTERO, David y RESTREPO, Marcos. Parasitosis humanas, Capítulo 6 (4ta. Edición). Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), Colombia, **2003**, págs. 165 -167, 196 – 197, 198.



25. LEMKE, Thomas L.; WILLIAMS, David A. Foye's principles of medicinal chemistry (sixth edition). Lippincot Williams & Wilkins, U.S.A, **2008**, págs 1087 – 1088, 1096, 1100.

26. Kaur, K.; Jain, M.; Reddy, R. P.; Jain, R. "Quinolines and structurally related heterocycles as antimalarials". *Eur. J. Med. Chem*, **2010**, 45, 3245 – 3264.

27. Organización mundial de la salud. [En línea] **2010**. [Citado el: 12 de octubre de 2010] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/es/index.html>

28. SACARLA J. y col. "Últimos avances en el desarrollo de la malaria". *Evid. Pediatr.* **2008**; 4:2.

29. ARANA B., Paula y col. "Poniendo en claro. La malaria". *Ambiociencias*. Octubre, **2010**; 6. 4-14.

30. FLÓREZ, Jesús. Farmacología humana (4ta. Edición). Masson, S. A., España, **2004**, pág. 1269.

31. Taylor, W.; Robert, J. "Antimalarial drug toxicity: a review". *Drug Safety*, **2004**, 27 (1), 25 – 61.

32. Travassos, M. A.; Lauter, M. K. "Resistance to antimalarial drugs: molecular, pharmacological and clinical considerations". *Pediatr. Res.*, **2009**, 65 (5 Pt 2): 64R-70R.

33. Tulane University. "Biochemistry of *Plasmodium*" [En línea] **2008**. [Citado el: 16 de septiembre de 2010] <http://www.tulane.edu/~wiser/malaria/fv.html#hemozoin>



34. Garavito, G.; Arteaga, L.; Acebey, L. "La biocrystalización del heme como potencial diana farmacológica en el desarrollo de fármacos para el tratamiento de la malaria". *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **2002**, 31, 85 – 95.
35. Egan, T. J. "Haemozoin formation". *Mol. Biochem. Parasit.*, **2008**, 157, 127 – 136.
36. Pagola, S.; Stephens, P. W.; Scott B., D.; Kosar, A. D.; Madsen, S. K. "The structure of malaria pigment β -haematin". *Nature*, **2000**, 404 (6775), 307 – 310.
37. Kouznetsov, V. V.; Amado T., D. F. "Antimaláricos: construcción de híbridos moleculares de la cloroquina". *Univ. Scient.*, **2008**, 13 (3), 306 – 320.
38. Hempelmann, E. "Hemozoin biocrystallization in *Plasmodium falciparum* and the antimalarial activity of crystallization inhibitors". *Parasitol. Res.*, **2007**, 100, 671-676.
39. Sullivan, D.J.; Gluzman, I.Y.; Golberg, D.E. "Plasmodium hemozoin formation mediated by histidine-rich proteins". *Science*, **1996**, 271(5246), 219 – 222.
40. Pandey, A. V.; Babbarwal, V. K.; Okoyeh, J. N.; Joshi, R. M.; Puri, S. K.; Singh, R. L.; Chauhan, V. S. "Hemozoin formation in malaria: a two-step process involving histidine-rich proteins and lipids". *Biochem. bioph. res. co.*, **2003**, 308 (4), 736 – 743.
41. Pisciotta, J. M.; Sullivan, D. "Hemozoin: oil versus water". *Parasitol. Int.*, **2008**, 57(2), 89 – 96.



42. Egan, T. J. "Recent advances in understanding the mechanism of hemozoin (malaria pigment) formation". *J. Inorg. Biochem.*, **2008**, 102, 1288 – 1299
43. Stein, R. G.; Biel, J. H. y Singh, T. "Antimalarials. 4-substituted -1H-pyrazolo[3,4-b]quinolines". *J. Med. Chem.*, **1970**, 13(1), 153 – 155.
44. Helal, M. H.; Elgemeie, G. H.; Masoud, D. M. "Preparation and characterization of novel methylsulfanylpirazolopyrimidines as heterocyclic dyes from ketene dithioacetals". *Pigm. Resin Technol.*, **2007**, 36 (5), 306- 311.
45. Thakor, S; Patel,D.;Patel, M. y Patel, R. "Synthesis and antibacterial activity of a novel pyrazolo[3,4-b]quinoline based heterocyclic azo compounds and their dyeing performance". *Saudi Pharmaceut. J.*, **2007**, 15(1). 48- 54.
46. Afghan, A.; Baradarani, M. y Joule, J. "Efficient synthesis of 1,3- unsubstituted 1H-pyrazolo[3,4-b]quinolines". *ARKIVOC*, **2009**, (ii), 20- 30.
47. Gutiérrez, J.; Guzmán, W.; Márquez, C. "Síntesis de un grupo 2-fenil-4-aminoquinolinas con posible actividad antimalárica". (2001). Trabajo Especial de Grado.
48. Villanueva, S.; Guzmán, W.; Márquez, C. "Síntesis de un grupo de 2-fenil-4-dialquilaminoalquilaminoquinolinas y su actividad inhibitoria de la polimerización del heme". (2002). Trabajo Especial de Grado.
49. Canino, L.; Guzmán, W.; Márquez, C. "Síntesis de un grupo de 2-fenil-4-dialquilaminoalquilaminoquinolinas sustituidas con posible actividad antimalárica". (2003). Trabajo Especial de Grado.



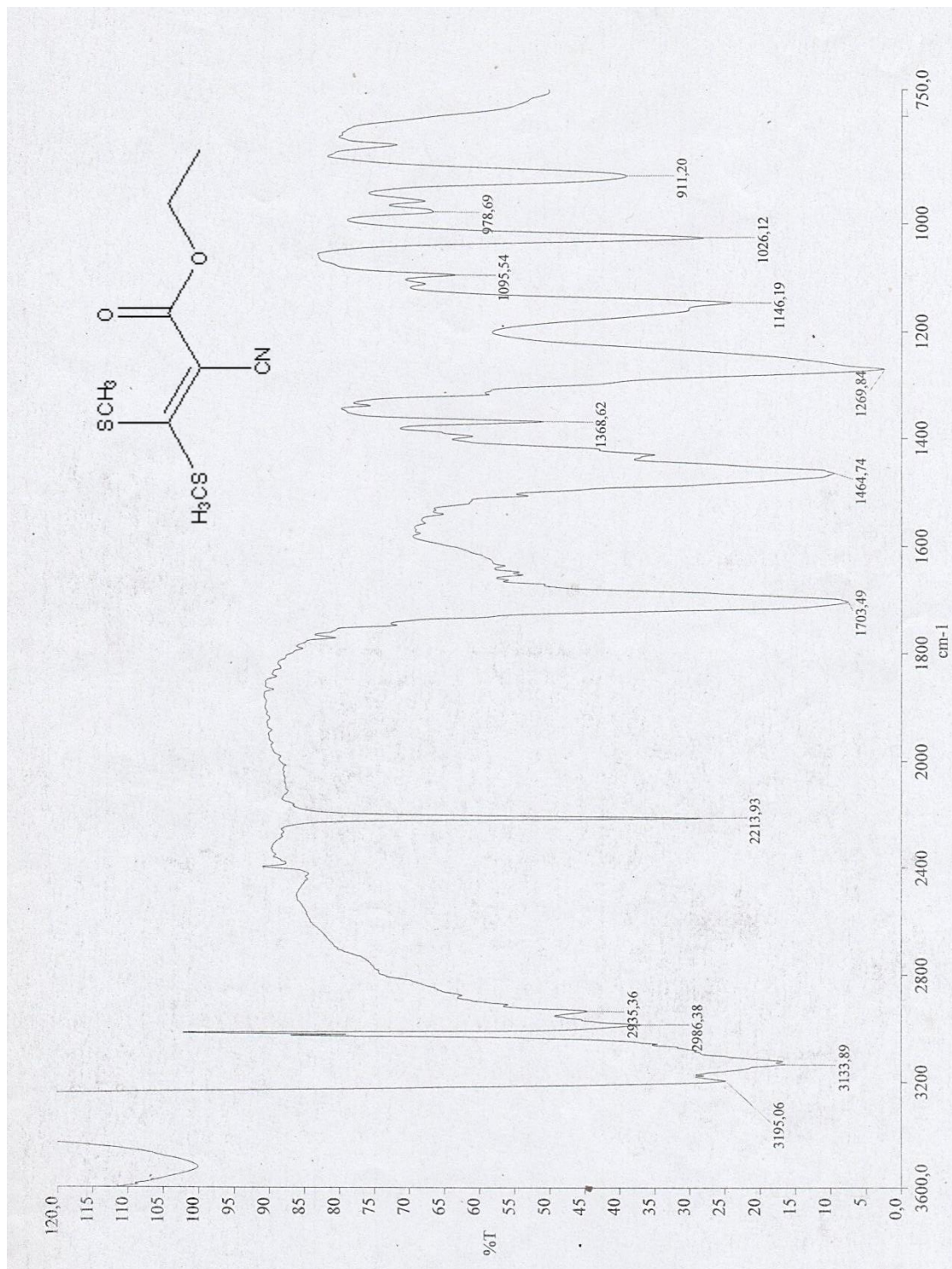
50. Torres, C.; Guzmán, W.; Márquez, C. "Síntesis de un grupo de compuestos del tipo 2-(4'-clorofenil)-4-aminoalquilamino-6-metoxiquinolinas con posible actividad antimalárica". (2003). Trabajo Especial de Grado.
51. Guzmán, W.; Márquez, C.; Gamboa de Domínguez, N.; Acosta M. E.; Meneses S.; Deharo E. "Síntesis y Actividad Antimalárica de un Grupo de Pirazoloquinolinas". (2010). *Revista Facultad de Farmacia Universidad Central de Venezuela*, **2011**, (74)(1) 29-40
52. JENSEN, Kai A. "Studies of Thioacids and their derivatives". *Act. Chem. Scand.* **1969**, 22, 1107- 1128.
53. HENRIKSEN, L. "Sodium 2-cyanoethylene-1,1-dithiolate tetrahydrate: a stable salt of cyanodithioacetic acid. A new preparative route to 2-cyanoketene S,S-, S,N- and N,N-acetals". *Act. Chem. Scand.* **1996**; 50: 432-437.
54. THEODOROU, Vassiliki y col. "A simple method for the alkaline hydrolysis of esters". *Tetrahedron Letters*, **2007**; 48, 8230 – 8233.



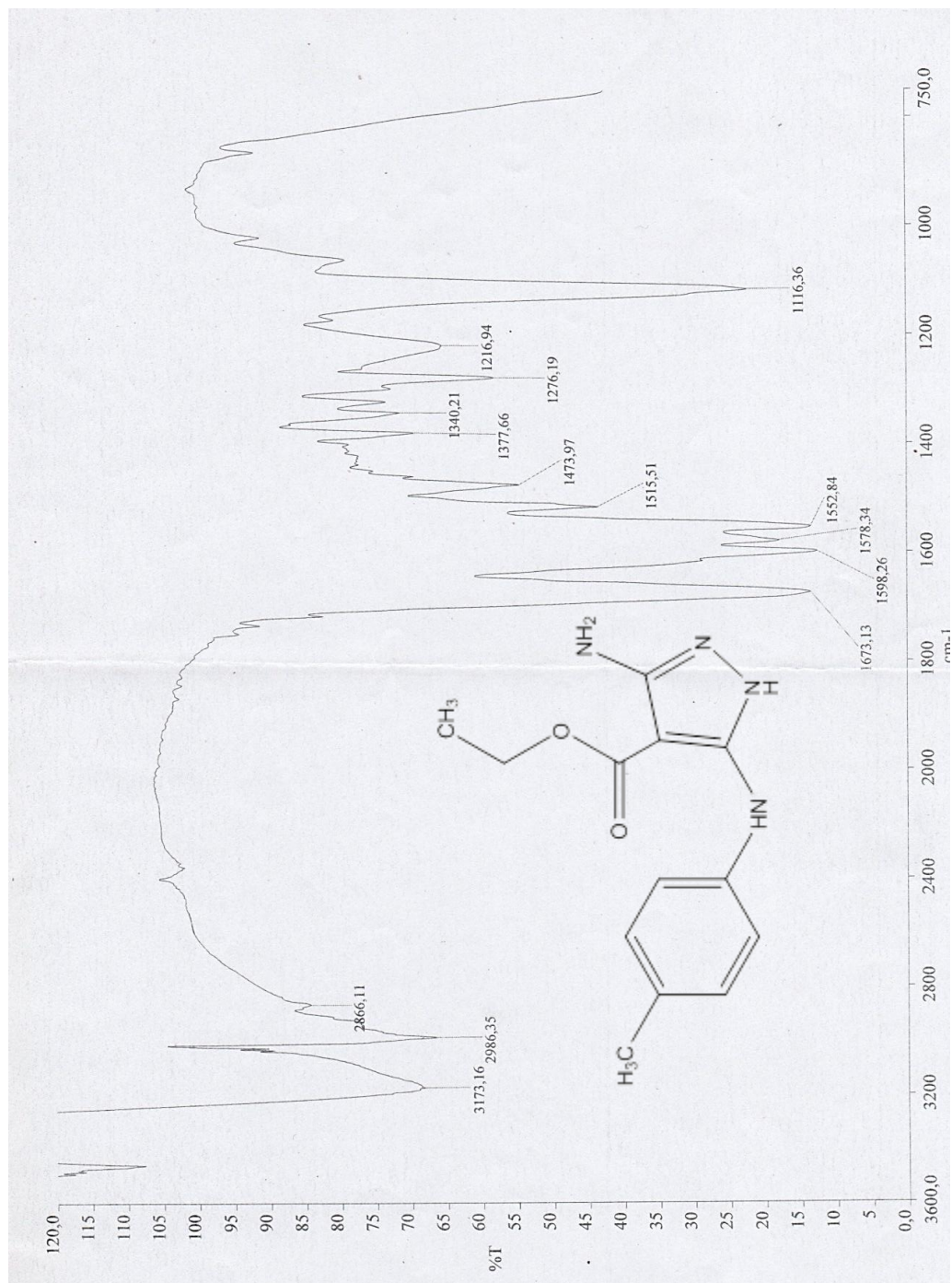
ANEXOS

X. ANEXOS

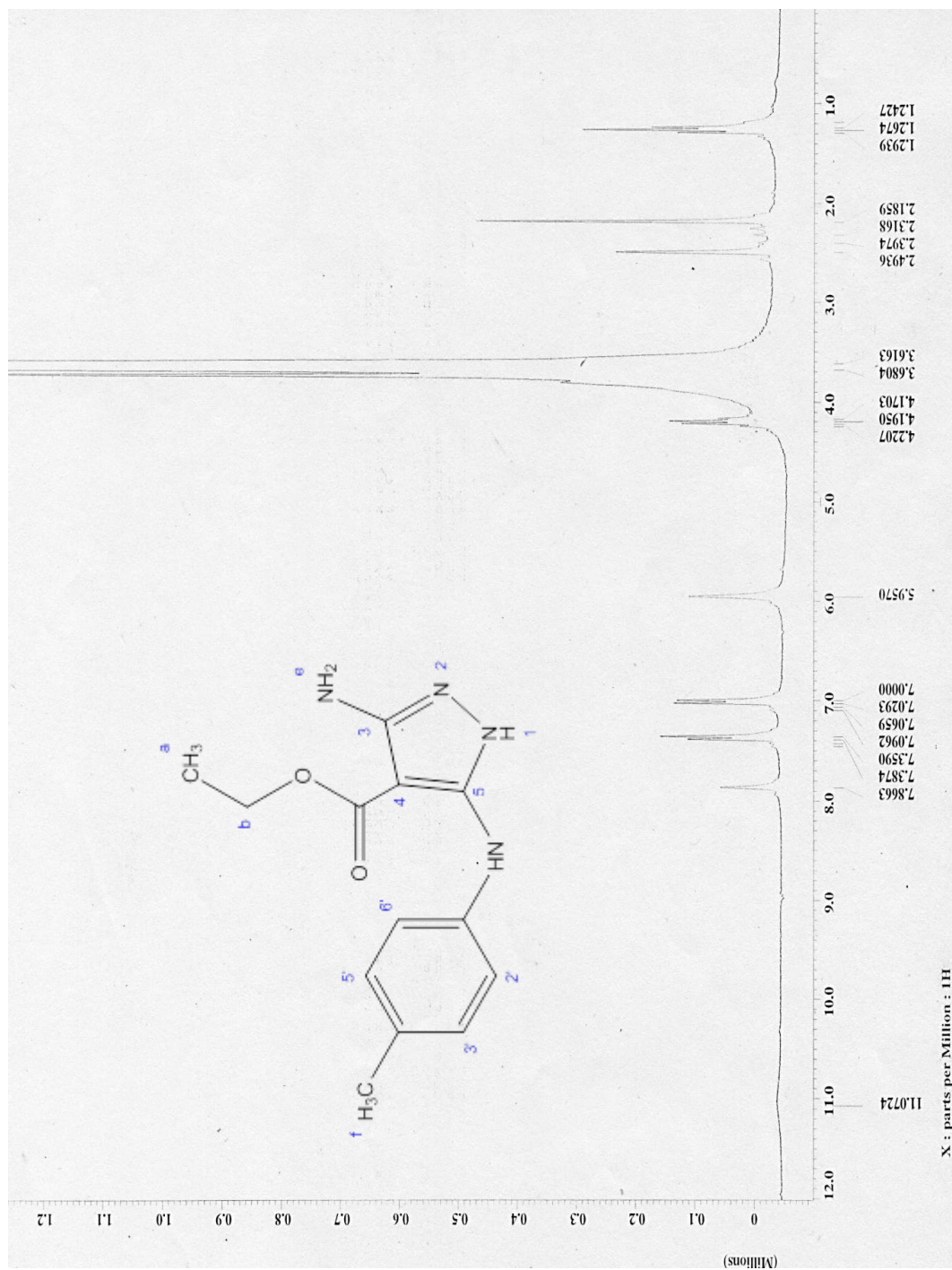
Espectro 1



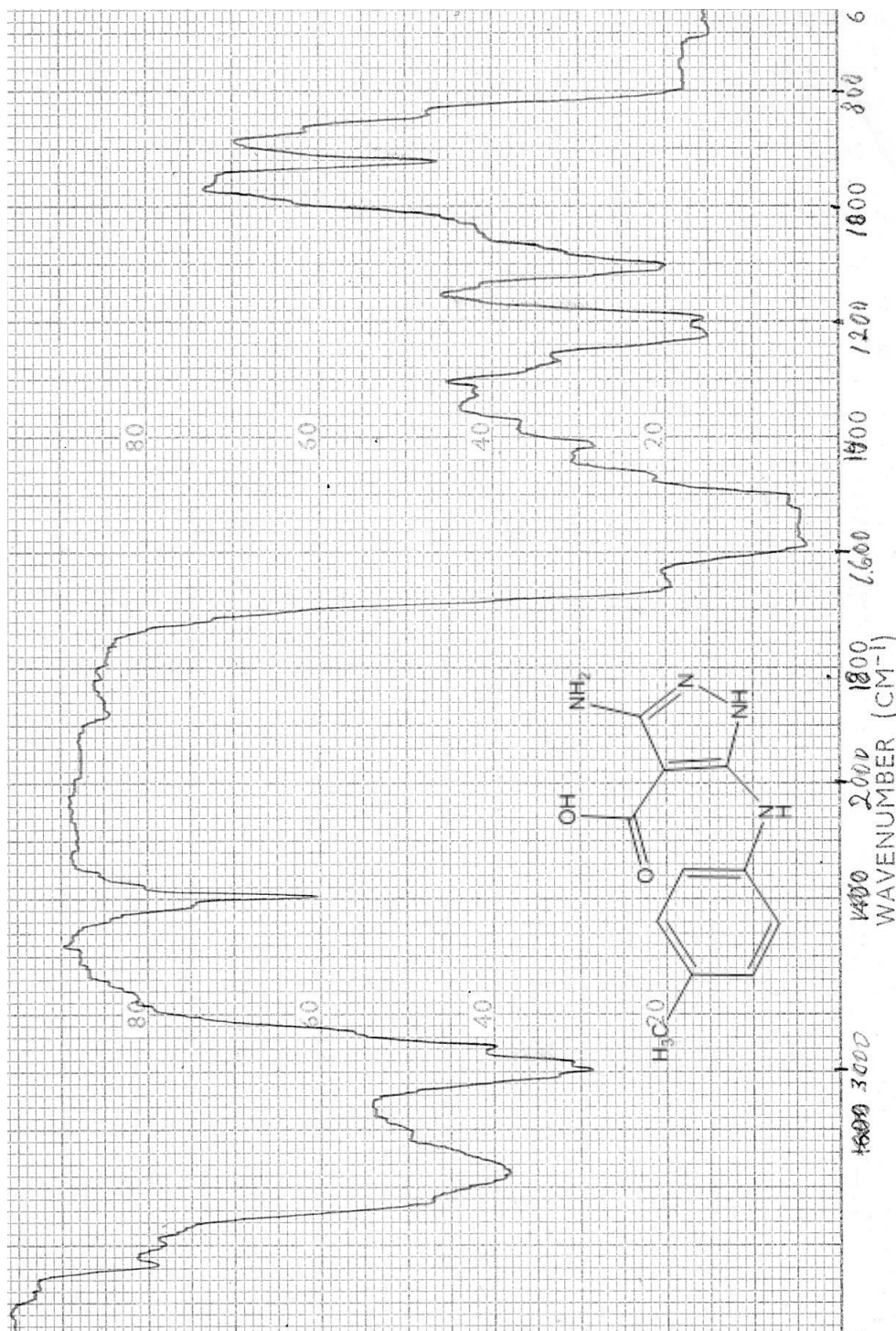
Espectro 2



Espectro 3

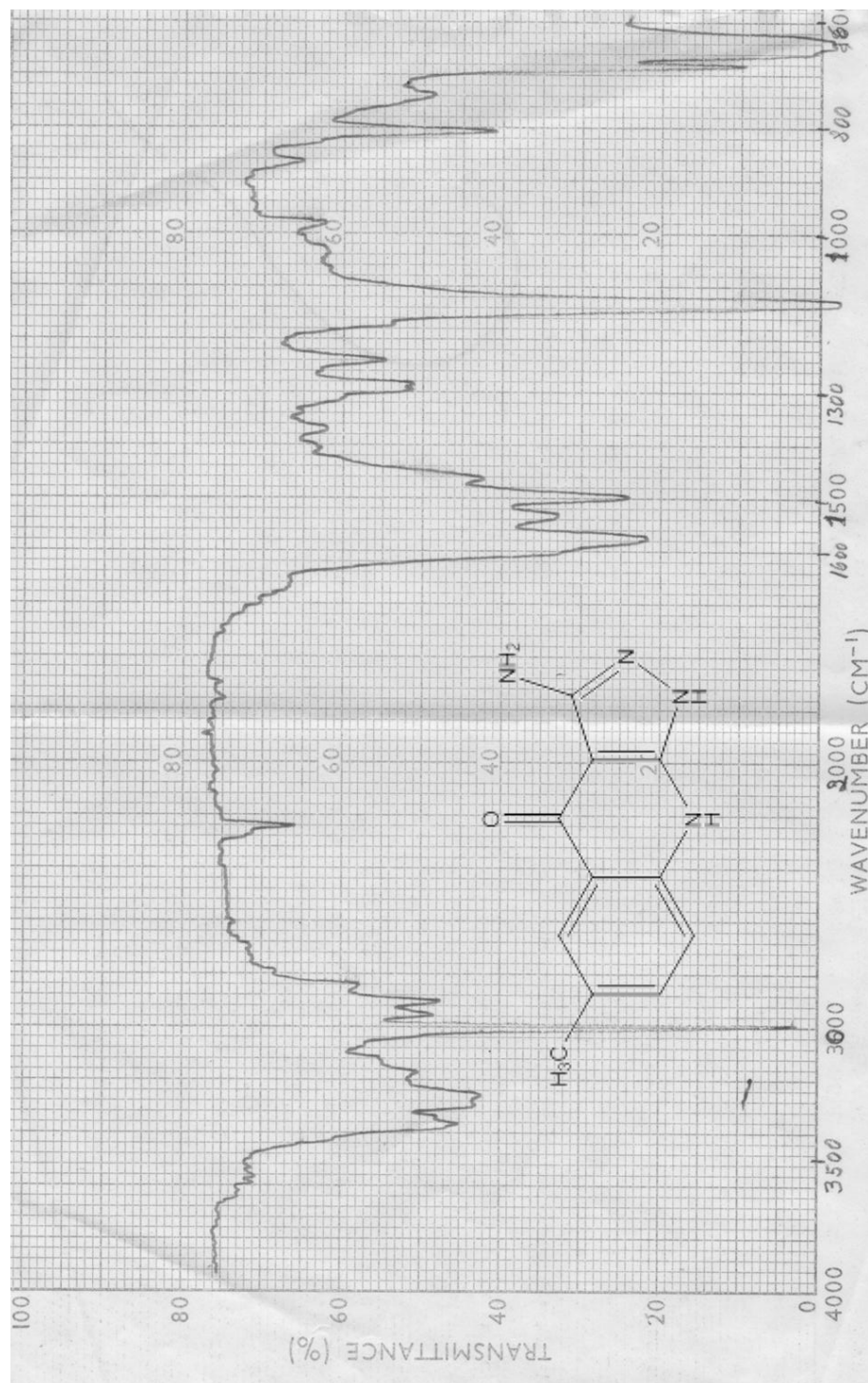


Espectro 4



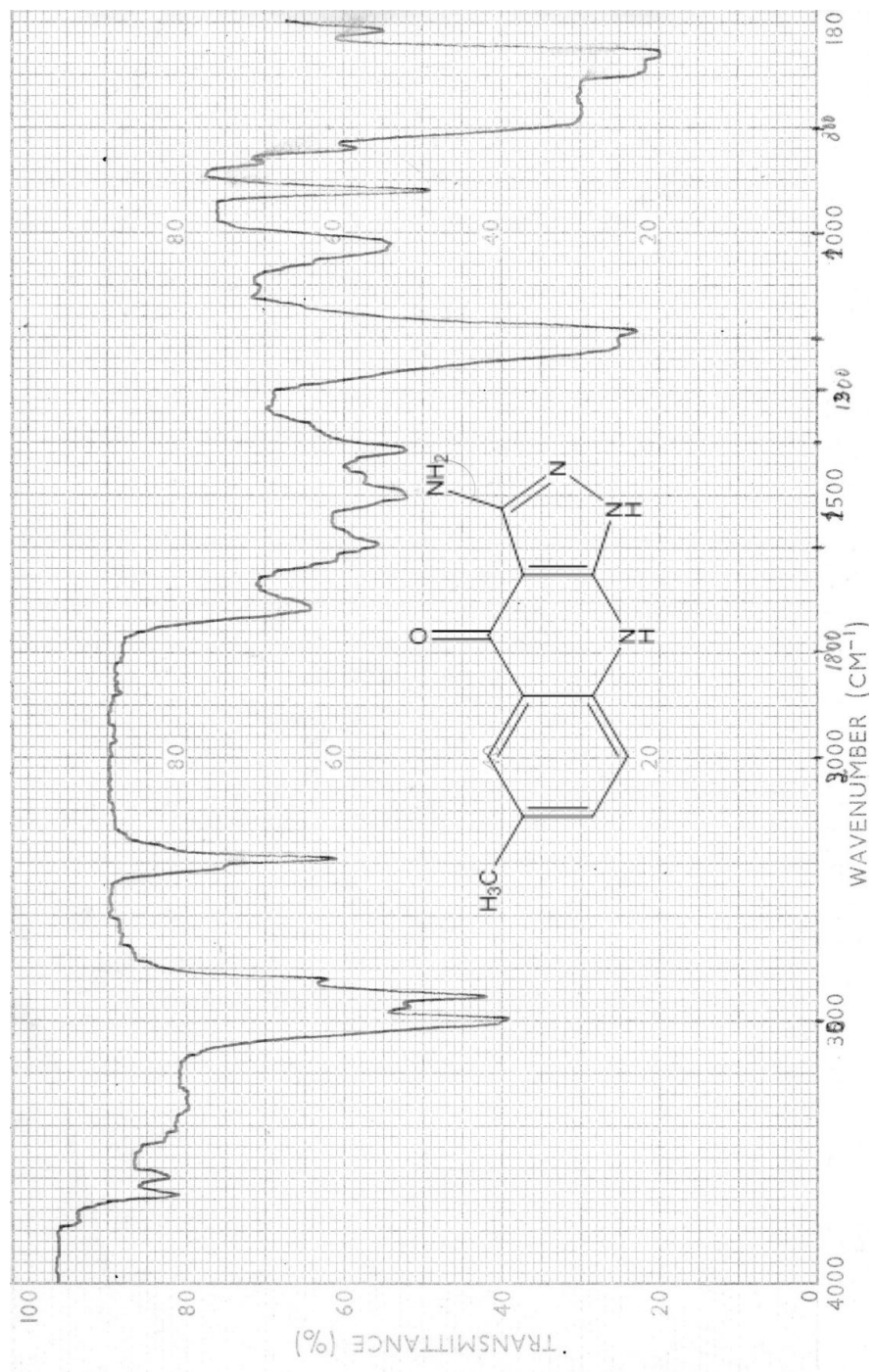


Espectro 5

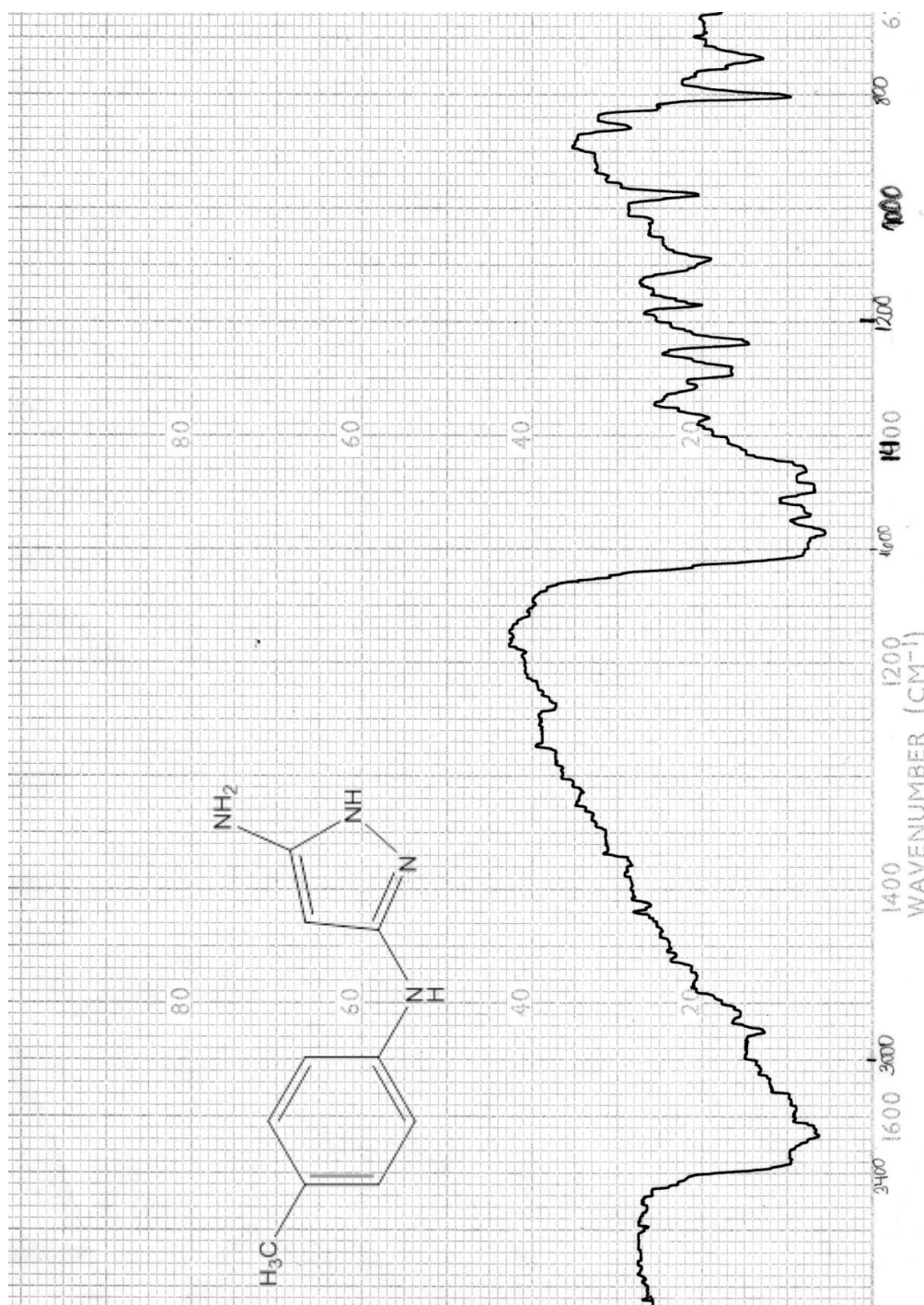




Espectro 6



Espectro 7





ANEXOS

Espectro 8

