

Síntesis y evaluación como antimaláricos de derivados del ácido tieno-[2,3-b]quinolina 2-carboxílico

Jaime Charris*, María Solana, José Domínguez, Gricela Lobo,
Arthur Barazarte, Neira Gamboa, Juan Rodrigues, Melina Monasterios,
Jorge Angel y Biagina Migliore

¹Laboratorio de Síntesis Orgánica. ²Laboratorio de Bioquímica. ³Laboratorio de Química Medicinal, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Aptdo. 47206, Los Chaguaramos, 1041-A, Caracas, Venezuela. ⁴Laboratorio de Síntesis Orgánica y Diseño de Fármacos, Dpto. de Química, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia.

Recibido: 14-02-06 Aceptado: 30-11-06

Resumen

Una serie de derivados del ácido tieno-[2,3-b]quinolina 2-carboxílico **27-35** fueron sintetizados y evaluados por su capacidad para inhibir la formación de β -hematina y la hidrólisis de la hemoglobina *in vitro*. El compuesto más activo en estos ensayos fue evaluado por su eficacia para modificar el curso de la parasitemia en ratones infectados con *Plasmodium berghei*. Los compuestos **18**, **31** y **32** fueron los más efectivos como inhibidores de la proteólisis de la hemoglobina, sin embargo, su efecto como inhibidores de la formación de la β -hematina fue poco significativa. La inhibición de la proteólisis de la hemoglobina fue máxima para el compuesto **31** (99%), así como su actividad *in vivo*, sugiriendo estos resultados que el mecanismo de acción antimalárica para **31**, podría relacionarse con su capacidad de inhibir las proteasas hemoglobinolíticas, que participan en la proteólisis de la hemoglobina. La presencia de grupos metil en las posiciones 5 y 8 de la quinolina es esencial para su actividad antimalárica.

Palabras clave: β -hematina; malaria; *P. berghei*; proteasas; quinolinas, tiofeno.

Synthesis and evaluation as antimalarial of thieno-[2,3-b]-quinoline 2-carboxylic acid derivatives

Abstract

A series of thieno-[2,3-b]quinoline 2-carboxylic acid analoges **27-35** were prepared and evaluated for their activity to inhibit β -hematin formation and hemoglobin hydrolysis *in vitro* and *in vivo*. The positive compound was evaluated for their efficacy in rodent *Plasmodium berghei*. Compounds **18**, **31** and **32** were the most effective as inhibitors of hemoglobin proteolysis, however, their effects as inhibitors of β -hematin formation was not significative. Inhibition of hemoglobin proteolysis *in vitro* was maximal for compound **31** (99%), as well as *in vivo* activity, which suggests that antimalarial activity of this compound could be related with inhibition of the hemoglobolytic proteases. The presence of methyl groups attached to positions 5 and 8 of the quinoline template is essential for antimalarial activity.

Key words: β -hematin; malaria; *P. berghei*; proteases; quinoline; thiofeno.

* Autor para la correspondencia. E-mail: charrisj@ucv.ve

Introducción

El paludismo o malaria es la enfermedad tropical de mayor prevalencia, con altas tasas de morbilidad y mortalidad, con graves repercusiones económicas y sociales a nivel mundial. Esta es una enfermedad parasitaria que permanece endémica en más de 90 países en vía de desarrollo, en los que se reportan entre 300 y 500 millones de nuevos casos y alrededor de un millón de muertes cada año (1, 2). La situación con respecto al control y tratamiento de la malaria se ha ido deteriorando con la aparición de cepas resistentes del vector (anopheles), a los insecticidas de acción residual y al desarrollo de cepas del parásito resistentes a las drogas de uso clínico más comunes, de tal manera que existe una necesidad urgente por encontrar nuevos agentes químicos naturales o sintéticos, activos contra cepas del *Plasmodium* resistentes a las drogas convencionales (3).

La estrategia para el desarrollo de nuevas drogas, se fundamenta básicamente en la identificación de sistemas enzimáticos en el parásito, esenciales en procesos biológicos claves y el desarrollo de moléculas que afecten específicamente esos blancos de acción, lo cual pudiese conducir a la disponibilidad de drogas más efectivas para el tratamiento de la malaria (4, 5). El potencial antimalárico de drogas que contengan como núcleo básico un anillo de quinolina, ha generado gran interés desde hace mucho tiempo (6). Enfoques recientes dirigidos a la reducción y/o disminución lenta del potencial de acción para drogas con el núcleo base de la quinolina, ha incluido el desarrollo de estructuras con este núcleo incorporándosele otros fragmentos químicos conocidos, que la provean de una acción dual o el empleo de las denominadas drogas dobles, que pudiesen hipotéticamente inhibir la formación de la hemozoina y otros blancos de acción en el *Plasmodium*. Este enfoque se puede ejemplificar por la inhibición de la proteasa cisteínica, basados en el desarrollo de agentes con el núcleo de la mefloquina y la cloroquina (7), estructuras

con el núcleo de la cloroquina como inhibidores de aminopeptidasas neutras en el parásito (8), inhibidores de las plasmepsinas con el núcleo de la primaquina (9), e inhibidores de enzimas antioxidantes, tal como la glutatión reductasa, conjugada con un fragmento de 4-aminoquinolinas (10, 11).

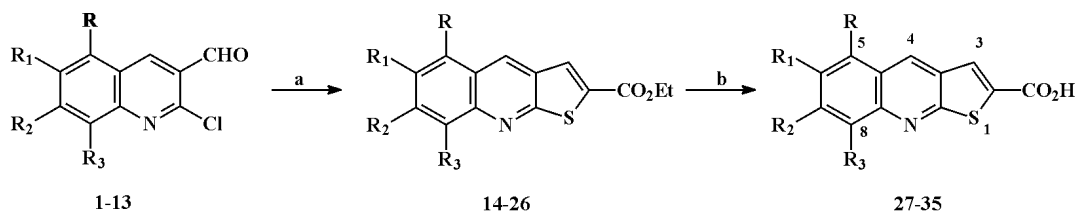
Siguiendo esta línea, nuestra investigación en el área de la química medicinal, está dirigida al desarrollo de agentes sencillos provistos de una máxima actividad anti-infecciosa, que actúen sobre múltiples blancos de acción en el agente causante de la enfermedad (12-14). Dentro de este contexto, uno de nuestros enfoques es el de hibridizar fragmentos electrófilos con estructuras conocidas con mínimos requerimientos para su actividad biológica. La meta es enlazar a estas moléculas, residuos de cisteína de biomoléculas, explotando el fuerte carácter nucleofílico del grupo tiol, el cual permite la S-alkilación/ arilación ó S-acilación/ acetilación/-sulfonación de residuos de cisteína.

En este trabajo se describen los resultados correspondientes a la síntesis y a la actividad biológica *in vitro* e *in vivo* de derivados de ácido tieno-[2,3-b]quinolina 2-carboxílico, los cuales pueden ser considerados como modelo en la preparación de nuevos agentes antimaláricos potenciales (Esquema 1).

Materiales y Métodos

1. Química

Los puntos de fusión fueron tomados en un aparato para punto de fusión marca Fischer-John y están sin corregir. Los espectros de infrarrojo fueron determinados en un espectrofotómetro marca Shimadzu modelo 470, usando discos de KBr. Los espectros de resonancia magnética nuclear ^1H NMR y ^{13}C NMR, fueron realizados en un espectrómetro marca JEOL Eclipse 270 MHz y los desplazamientos son reportados tomando como referencia el cloroformo o dimetilsulfóxido residual. Los espectros de masas fueron toma-



a: $\text{HSCH}_2\text{CO}_2\text{Et}$, Na, EtOH, Δ ; b: NaOH/H₂O, Δ ; HCl

No	R	R ₁	R ₂	R ₃
14	H	H	H	H
15	H	CH ₃	H	H
16	H	H	CH ₃	H
17	H	H	H	CH ₃
18	CH ₃	H	H	CH ₃
19	H	OCH ₃	H	H
20	H	H	OCH ₃	H
21	H	OCH ₃	OCH ₃	H
22	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H
23	H	Cl	H	H
24	H	H	Cl	H
25	H	Cl	Cl	H
26	H	Br	H	H

Esquema 1. Síntesis de derivados del ácido tieno-[2,3-*b*]quinolina 2-carboxílico **27-35**.

dos en un espectrómetro marca VARIAN modelo Saturno 2000 GC a 70eV. Los análisis elementales fueron realizados por el servicio de análisis de la Universidad de Málaga, Málaga, España y los resultados analíticos están dentro del rango de $\pm 0,4\%$ del valor calculado. La pureza de los compuestos fue monitoreada a través de placas de cromatografía de capa fina Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck)®. Todos los solventes fueron destilados y secados con el uso de desecantes convencionales. Los reactivos primarios son marca Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI, USA. Las quinolinas **1-13**, fueron sintetizadas siguiendo el método previamente reportado (15). Aunque los compuestos **14-26** no se les reporta los datos de análisis elemental, sus transformaciones a los compuestos **27-35** confirmaron sus estructuras.

1.1. *Procedimiento general para la síntesis de derivados tieno-[2,3-*b*]quinolina 2-carboxilato de etilo **14-26***

Una mezcla de sodio metálico (3 mmol), 8 mL de etanol seco, se agitó mecánicamente hasta que desapareció completamente el sodio metálico, seguidamente se adicionó mercaptoacetato de etilo (1,3 mmol) y se continuó la agitación por 10 min, a esta mezcla se adicionó las quinolinas **1-13** (1,3 mmol). La solución resultante se refluxó por 12 h, finalizada la reacción el solvente fue eliminado a presión reducida, al residuo se adicionó agua-hielo (8 mL), el sólido resultante se colectó por filtración, se secó y se recrystalizó de etanol.

1.1.1. *Tieno-[2,3-*b*]quinolina 2-carboxilato de etilo **14**.*

Rendimiento 83%; p.f. 129-130°C; ir (KBr) cm^{-1} : 3083, 1710, 1590, 1203; ^1H NMR CDCl_3 δ ppm: 1,43(t, 3H, CH_3 , J:7,2 Hz), 4,43(c, 2H, CH_2 , J:7,2Hz), 7,59(dd, 1H, H_5 , J:7,9, 1,2 Hz), 7,82(dd, 1H, H_8 , J:7,2, 1,2 Hz), 8,07(s, 1H, H_4), 8,00(d, 1H, H_6 , J:8,2 Hz), 8,10(s, 1H, H_4), 8,21(d, 1H, H_7 , J:8,1 Hz), 8,71(s, 1H, H_3). ^{13}C NMR: 14,36, 62,26, 119,70, 126,81, 127,55, 130,24, 130,42, 131,75, 131,83, 133,99, 136,13, 146,58, 162,26, 163,92. EM IE e/z: M^+ 257 ($\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{S}$ 26%).

1.1.2. 6-metil-tieno-[2,3-*b*]quinolina 2-carboxilato de etilo **15**.

Rendimiento 43%; p.f. 160°C; ir (KBr) cm^{-1} : 3135, 1712, 1575, 1235; ^1H NMR CDCl_3 δ ppm: 1,43(t, 3H, CH_3 , J:7,2 Hz), 2,56(s, 3H, CH_3), 4,45(c, 2H, CH_2 , J:7,2Hz), 7,63(dd, 1H, H_7 , J:8,6, 1,9 Hz), 7,72(s, 1H, H_5), 8,03(d, 1H, H_8 , J:8,6 Hz), 8,07(s, 1H, H_4), 8,55(s, 1H, H_3). ^{13}C NMR: 14,39, 21,68, 62,07, 125,90, 127,15, 127,90, 128,13, 131,21, 132,25, 133,25, 134,79, 135,79, 147,01, 162,25, 163,70. EM IE e/z: M^+ 271 ($\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{NO}_2\text{S}$ 10%).

1.1.3. 7-metil-tieno-[2,3-*b*]quinolina 2-carboxilato de etilo **16**.

Rendimiento 37%; p.f. 165-166°C; ir (KBr) cm^{-1} : 3035, 1742, 1566, 1235; ^1H NMR CDCl_3 δ ppm: 1,42(t, 3H, CH_3 , J:7,2 Hz), 2,59(s, 3H, CH_3), 4,42(c, 2H, CH_2 , J:7,2Hz), 7,40(dd, 1H, H_6 , J:8,5, 1,7 Hz), 7,84(d, 1H, H_5 , J:8,6 Hz), 7,90(d, 1H, H_8 , J:1,7 Hz), 8,07(s, 1H, H_4), 8,59(s, 1H, H_3). ^{13}C NMR: 14,38, 22,24, 62,02, 124,02, 127,23, 127,90, 128,30, 128,45, 130,55, 132,73, 134,26, 141,35, 148,47, 162,55, 162,60. EM IE e/z: M^+ 271 ($\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{NO}_2\text{S}$ 23%).

1.1.4. 8-metil-tieno-[2,3-*b*]quinolina 2-carboxilato de etilo **17**.

Rendimiento 39%; p.f. 114-115 °C; ir (KBr) cm^{-1} : 3100, 1713, 1543, 1234; ^1H NMR CDCl_3 δ ppm: 1,43(t, 3H, CH_3 , J:7,2 Hz), 2,85(s, 3H, CH_3), 4,42(c, 2H, CH_2 , J:7,2Hz), 7,43(t, 1H, H_6 , J:7,2 Hz), 7,62(d, 1H, H_7 , J:8,2 Hz), 7,80(d, 1H, H_5 , J:8,2 Hz), 8,07(s,

1H, H_4), 8,52(s, 1H, H_3). ^{13}C NMR: 14,38, 18,39, 62,04, 125,67, 125,80, 126,68, 127,81, 130,43, 130,87, 133,17, 134,90, 136,55, 147,58, 162,65, 162,27. EM IE e/z: M^+ 271 ($\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{NO}_2\text{S}$ 7%).

1.1.5. 5,8-dimetil-tieno-[2,3-*b*]quinolina 2-carboxilato de etilo **18**.

Rendimiento 33%; p.f. 152-153°C; ir (KBr) cm^{-1} : 3135, 1720, 1550, 1244; ^1H NMR CDCl_3 δ ppm: 1,43(t, 3H, CH_3 , J:6,9 Hz), 2,73(s, 3H, CH_3), 2,82(s, 3H, CH_3), 4,57(c, 2H, CH_2 , J:6,9 Hz), 7,27(d, 1H, H_6 , J:7,9 Hz), 7,50(d, 1H, H_7 , J:7,9 Hz), 8,11(s, 1H, H_4), 8,77(s, 1H, H_3). ^{13}C NMR: 14,39, 18,38, 18,98, 61,99, 125,45, 125,95, 128,13, 129,66, 130,13, 130,44, 132,92, 134,47, 134,73, 147,90, 162,14, 162,67. EM IE e/z: M^+ 284 ($\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{NO}_2\text{S}$ 43%).

1.1.6. 6-metoxi-tieno-[2,3-*b*]quinolina 2-carboxilato de etilo **19**.

Rendimiento 53%; p.f. 169-170°C; ir (KBr) cm^{-1} : 3019, 1700, 1553, 1235; ^1H NMR CDCl_3 δ ppm: 1,42(t, 3H, CH_3 , J:6,9 Hz), 3,94(s, 3H, OCH_3), 4,44(c, 2H, CH_2 , J:6,9 Hz), 7,15(d, 1H, H_5 , J:2,7 Hz), 7,45(dd, 1H, H_7 , J:8,6, 2,7 Hz), 8,00(d, 1H, H_8 , J:8,6 Hz), 8,03(s, 1H, H_4), 8,50(s, 1H, H_3). ^{13}C NMR: 14,38, 55,64, 62,05, 104,81, 124,54, 126,81, 127,62, 129,75, 131,37, 135,00, 144,74, 157,23, 161,05, 162,51. EM IE e/z: M^+ 287 ($\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{NO}_3\text{S}$ 36%).

1.1.7. 7-metoxi-tieno-[2,3-*b*]quinolina 2-carboxilato de etilo **20**.

Rendimiento 68%; p.f. 172-173°C; ir (KBr) cm^{-1} : 3115, 1720, 1560, 1245; ^1H NMR CDCl_3 δ ppm: 1,42(t, 3H, CH_3 , J:7,2 Hz), 3,97(s, 3H, OCH_3), 4,44(c, 2H, CH_2 , J:7,2 Hz), 7,22(dd, 1H, H_6 , J:9,2, 2,5 Hz), 7,41(d, 1H, H_8 , J:2,5 Hz), 7,83(d, 1H, H_5 , J:9,2 Hz), 8,06(s, 1H, H_4), 8,54(s, 1H, H_3). ^{13}C NMR: 14,39, 55,74, 61,99, 105,60, 120,26, 121,52, 128,12, 129,48, 129,78, 132,83, 133,17, 150,02, 161,90, 162,67, 164,09. EM IE e/z: M^+ 287 ($\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{NO}_3\text{S}$ 43%).

1.1.8. *6,7-dimetoxi-tieno-[2,3-b]quinolina 2-carboxilato de etilo 21.*

Rendimiento 66%; p.f. 210-211°C; ir (KBr) cm^{-1} : 3035, 1735, 1590, 1248; $^1\text{H NMR}$ CDCl_3 δ ppm: 1,42(t, 3H, CH_3 , J:7,2 Hz), 4,03(s, 3H, OCH_3), 4,06(s, 3H, OCH_3), 4,41(c, 2H, CH_2 , J:7,2 Hz), 7,14(s, 1H, H_3), 7,42(s, 1H, H_8), 8,45(s, 1H, H_4), 8,56(s, 1H, H_3). $^{13}\text{C NMR}$: 14,40, 55,16, 56,31, 61,93, 105,09, 106,55, 121,87, 127,96, 129,70, 130,78, 133,01, 146,05, 149,72, 153,95, 161,72, 162,72. EM IE e/z: M^+ 318 ($\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{NO}_4\text{S}$ 12%).

1.1.9. *5,6,7-trimetoxi-tieno-[2,3-b]quinolina 2-carboxilato de etilo 22.*

Rendimiento 65%; p.f. 128-130°C; ir (KBr) cm^{-1} : 2998, 1755, 1584, 1248; $^1\text{H NMR}$ CDCl_3 δ ppm: 1,41(t, 3H, CH_3 , J:7,2 Hz), 3,98(s, 3H, OCH_3), 4,02(s, 3H, OCH_3), 4,11(s, 3H, OCH_3), 4,40(c, 2H, CH_2 , J:7,2 Hz), 7,24(s, 1H, H_3), 8,06(s, 1H, H_4), 8,81(s, 1H, H_3). $^{13}\text{C NMR}$: 14,40, 56,31, 61,43, 61,74, 61,96, 102,54, 117,87, 127,71, 128,42, 129,32, 132,96, 140,13, 146,35, 147,24, 157,45, 169,69, 163,51. EM IE e/z: (M^+ -15) 332 ($\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NO}_5\text{S} - \text{CH}_3$ 100%).

1.1.10. *6-cloro-tieno-[2,3-b]quinolina 2-carboxilato de etilo 23.*

Rendimiento 26%; p.f. 193-194°C; ir (KBr) cm^{-1} : 3035, 1720, 1593, 1248; $^1\text{H NMR}$ CDCl_3 δ ppm: 1,43(t, 3H, CH_3 , J:7,2 Hz), 4,43(c, 2H, CH_2 , J:7,2 Hz), 7,69(dd, 1H, H_7 , J:9,2, 2,2 Hz), 7,95(d, 1H, H_5 , J:2,3 Hz), 8,07(d, 1H, H_8 , J:9,2 Hz), 8,08(s, 1H, H_4), 8,55(s, 1H, H_3). $^{13}\text{C NMR}$: 14,33, 62,36, 124,00, 127,99, 127,67, 128,13, 128,67, 132,17, 133,17, 135,69, 137,07, 148,52, 162,30, 163,89. EM IE e/z: M^+ 292 ($\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{NO}_2\text{ClS}$ 27%).

1.1.11. *7-cloro-tieno-[2,3-b]quinolina 2-carboxilato de etilo 24.*

Rendimiento 37%; p.f. 170-171°C; ir (KBr) cm^{-1} : 3005, 1736, 1625, 1198; $^1\text{H NMR}$ CDCl_3 δ ppm: 1,42(t, 3H, CH_3 , J:7,2 Hz), 4,42(c, 2H, CH_2 , J:7,2 Hz), 7,46(dd, 1H, H_6 ,

J:8,9, 2,0 Hz), 8,10(d, 1H, H_8 , J:2,0 Hz), 8,06(d, 1H, H_5 , J:8,9 Hz), 8,18(s, 1H, H_4), 8,58(s, 1H, H_3). $^{13}\text{C NMR}$: 14,37, 62,23, 124,09, 127,16, 127,42, 127,63, 129,85, 132,82, 134,45, 135,48, 136,57, 148,12, 162,29, 164,53. EM IE e/z: M^+ 292 ($\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{NO}_2\text{ClS}$ 6%).

1.1.12. *6,7-dicloro-tieno-[2,3-b]quinolina 2-carboxilato de etilo 25.*

Rendimiento 26%; p.f. 205-206°C; ir (KBr) cm^{-1} : 3015, 1715, 1612, 1218; $^1\text{H NMR}$ CDCl_3 δ ppm: 1,43(t, 3H, CH_3 , J:7,2 Hz), 4,45(c, 2H, CH_2 , J:7,2 Hz), 8,06(s, 1H, H_5), 8,08(s, 1H, H_8), 8,27(s, 1H, H_4), 8,54(s, 1H, H_3). $^{13}\text{C NMR}$: 14,41, 62,53, 105,09, 106,55, 121,87, 127,96, 128,01, 128,93, 129,70, 130,78, 133,01, 146,05, 161,72, 162,72. EM IE e/z: M^+ 327 ($\text{C}_{14}\text{H}_9\text{NO}_2\text{Cl}_2\text{S}$ 3%).

1.1.13. *6-bromo-tieno-[2,3-b]quinolina 2-carboxilato de etilo 26.*

Rendimiento 43%; p.f. 221-222°C; ir (KBr) cm^{-1} : 3095, 1740, 1653, 1203; $^1\text{H NMR}$ CDCl_3 δ ppm: 1,43(t, 3H, CH_3 , J:7,2 Hz), 4,43(c, 2H, CH_2 , J:7,2 Hz), 7,82(dd, 1H, H_7 , J:9,2, 2,2 Hz), 8,01(d, 1H, H_8 , J:9,2 Hz), 8,07(s, 1H, H_4), 8,13(d, 1H, H_5 , J:2,2 Hz), 8,54(s, 1H, H_3). $^{13}\text{C NMR}$: 14,36, 62,26, 119,70, 126,81, 127,55, 130,24, 130,42, 131,75, 131,83, 133,99, 136,13, 146,58, 162,26, 163,92. EM IE e/z: M^+ -15, 322 ($\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{NO}_2\text{BrS} - \text{CH}_3$ 100%).

1.2. *Procedimiento general para la síntesis de derivados de ácido tieno-[2,3-b]quinolina 2-carboxílico 27-35*

A una suspensión de cada uno de los ésteres **14-26** (0.5 mmol), en etanol (5 mL) se agregó hidróxido de sodio (2 mL) al 10%, la mezcla se sometió a reflujo hasta que no se observó material de partida (cromatografía de capa fina, usando como eluyente una mezcla hexano-acetato de etilo 1:2). Finalizada la reacción, el solvente se eliminó a presión reducida, al residuo resultante se adicionó agua-hielo (4 mL), la solución se acidificó con ácido clorhídrico concentrado hasta pH

ácido, el sólido resultante se filtró, se secó y se recristalizó de etanol.

1.2.1. *Ácido tieno-[2,3-*b*]quinolina 2-carboxílico 27.*

Rendimiento 79%; p.f. 278-279°C; ir (KBr) cm^{-1} : 2998, 2869, 1615, 1167; $^1\text{H NMR}$ DMSO d_6 δ ppm: 7,67(t, 1H, H_6 , J:7,8 Hz), 7,88(t, 1H, H_7 , J:7,8 Hz), 8,09(d, 1H, H_5 , J:8,7), 8,16(d, 1H, H_8 , J:8,7 Hz), 8,23(s, 1H, H_4), 9,04(s, 1H, H_3). Análisis elemental calculado para ($\text{C}_{12}\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$): C: 62,86, H: 3,08, N: 6,11; encontrado C: 62,80, H: 2,96, N: 5,83.

1.2.2. *Ácido 6-metil- tieno-[2,3-*b*]quinolina 2-carboxílico 28.*

Rendimiento 46%; p.f. 230-231°C; ir (KBr) cm^{-1} : 3057, 2854, 1615, 1168; $^1\text{H NMR}$ DMSO d_6 δ ppm: 2,54(s, 3H, CH_3), 7,73(dd, 1H, H_7 , J:8,7, 2,0 Hz), 7,94(d, 1H, H_5 , J:2,0 Hz), 8,02(d, 1H, H_8 , J:8,7), 8,19(s, 1H, H_4), 8,93(s, 1H, H_3). Análisis elemental calculado para ($\text{C}_{13}\text{H}_9\text{NO}_2\text{S}$): C: 64,18, H: 3,72, N: 5,76; encontrado C: 64,43, H: 3,72, N: 5,59.

1.2.3. *Ácido 7-metil- tieno-[2,3-*b*]quinolina 2-carboxílico 29.*

Rendimiento 63%; p.f. 236-237°C; ir (KBr) cm^{-1} : 3105, 2869, 1598, 1169; $^1\text{H NMR}$ DMSO d_6 δ ppm: 2,53(s, 3H, CH_3), 7,50(dd, 1H, H_6 , J:8,7, 2,0 Hz), 7,87(d, 1H, H_8 , J:2,0 Hz), 8,08(d, 1H, H_5 , J:8,7), 8,21(s, 1H, H_4), 8,98(s, 1H, H_3). Análisis elemental calculado para ($\text{C}_{13}\text{H}_9\text{NO}_2\text{S}$): C: 64,18, H: 3,72, N: 5,76; encontrado C: 64,16, H: 3,68, N: 5,83.

1.2.4. *Ácido 8-metil- tieno-[2,3-*b*]quinolina 2-carboxílico 30.*

Rendimiento 89%; p.f. 216-217°C; ir (KBr) cm^{-1} : 2999, 2879, 1618, 1227; $^1\text{H NMR}$ DMSO d_6 δ ppm: 2,78(s, 3H, CH_3), 7,55(t, 1H, H_6 , J:7,66 Hz), 7,72(d, 1H, H_5 , J:7,2 Hz), 8,00(d, 1H, H_7 , J:7,2), 8,22(s, 1H, H_4), 9,02(s, 1H, H_3). Análisis elemental calculado para ($\text{C}_{13}\text{H}_9\text{NO}_2\text{S}$): C: 64,18, H: 3,72, N: 5,76; encontrado C: 64,25, H: 3,80, N: 5,67.

1.2.5. *Ácido 5,8-dimetil-tieno-[2,3-*b*]quinolina 2-carboxílico 31.*

Rendimiento 76%; p.f. 282-283°C; ir (KBr) cm^{-1} : 3095, 2861, 1635, 1161; $^1\text{H NMR}$ DMSO d_6 δ ppm: 2,72(s, 6H, CH_3), 7,37(d, 1H, H_6 , J:7,2 Hz), 7,60(d, 1H, H_7 , J:7,2 Hz), 8,22(s, 1H, H_4), 9,12(s, 1H, H_3). Análisis elemental calculado para ($\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{S}$): C: 65,35, H: 4,31, N: 5,44; encontrado C: 65,33, H: 4,18, N: 5,61.

1.2.6. *Ácido 7-metoxi-tieno-[2,3-*b*]quinolina 2-carboxílico 32.*

Rendimiento 46%; p.f. 240-241°C; ir (KBr) cm^{-1} : 3129, 2859, 1638, 1217; $^1\text{H NMR}$ DMSO d_6 δ ppm: 3,93(s, 3H, OCH_3), 7,52(m, 2H, $H_{6,8}$), 8,00(d, 1H, H_8 , J:8,6 Hz), 8,20(s, 1H, H_4), 8,90(s, 1H, H_3). Análisis elemental calculado para ($\text{C}_{13}\text{H}_9\text{NO}_3\text{S}$): C: 60,22, H: 3,50, N: 5,40; encontrado C: 60,07, H: 3,53, N: 5,57.

1.2.7. *Ácido 6,7-dimetoxi-tieno-[2,3-*b*]quinolina 2-carboxílico 33.*

Rendimiento 39%; p.f. 245-246°C; ir (KBr) cm^{-1} : 3112, 2879, 1608, 1267; $^1\text{H NMR}$ DMSO d_6 δ ppm: 3,94(s, 3H, OCH_3), 3,97(s, 3H, OCH_3), 7,43(s, 1H, H_5), 7,49(s, 1H, H_8), 8,18(s, 1H, H_4), 8,80(s, 1H, H_3). Análisis elemental calculado para ($\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NO}_4\text{S}$): C: 58,12, H: 3,83, N: 4,84; encontrado C: 58,17, H: 3,80, N: 5,15.

1.2.8. *Ácido 5,6,7-trimetoxi-tieno-[2,3-*b*]quinolina 2-carboxílico 34.*

Rendimiento 67%; p.f. 261-262°C; ir (KBr) cm^{-1} : 3096, 2888, 1598, 1167; $^1\text{H NMR}$ DMSO d_6 δ ppm: 3,87(s, 3H, OCH_3), 3,96(s, 3H, OCH_3), 4,02(s, 3H, OCH_3), 7,24(s, 1H, H_3), 7,55(s, 1H, H_4), 8,69(s, 1H, H_3). Análisis elemental calculado para ($\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{NO}_5\text{S}$): C: 56,42, H: 4,10, N: 4,39; encontrado C: 56,59, H: 3,96, N: 4,93.

1.2.9. *Ácido 6-bromo-tieno-[2,3-*b*]quinolina 2-carboxílico 35.*

Rendimiento 77%; p.f. 300°C; ir (KBr) cm^{-1} : 2998, 2864, 1584, 1263; $^1\text{H NMR}$

DMSO d_6 δ ppm: 7,53(d, 1H, H_5 , J:2,3 Hz), 7,84(dd, 1H, H_6 , J:9,0, 2,3 Hz), 7,97(d, 1H, H_8 , J:9,0 Hz), 8,36(s, 1H, H_4), 8,72(s, 1H, H_3). Análisis elemental calculado para ($C_{12}H_6NO_2SBr$): C: 46,77, H: 1,96, N: 4,55; encontrado C: 46,83, H: 2,17, N: 4,32.

2. Biológica

2.1. Inhibición de la formación de β -hematina.

El ensayo de formación de β -hematina fue realizado siguiendo el procedimiento reportado por Baelmans (16). En los pozos de una microplaca de ELISA de 96 pozos se mezclaron, respetando el orden: 50 μ L de una solución de clorhidrato de hemina disuelto en DMSO (5,2 mg/mL), 50 μ L de los compuestos a evaluar disueltos en DMSO, a concentraciones entre 50 y 5 mM. Cada concentración fue ensayada por triplicado y se incluyeron controles con DMSO, H_2O y cloroquina como control positivo (12,5-0,5 mM). La formación de la β -hematina fue iniciada por la adición de un buffer acetato (100 μ L 0,2 M, pH 4,4). Las placas fueron incubadas a 37°C por 48 h, posteriormente centrifugadas (4000 RPM x 10 min, IEC-CENTRA, MP4R) y el residuo fue lavado dos veces con DMSO (200 μ L), disuelto en NaOH (200 μ L, 0,2 N). La lectura se realizó a una longitud de onda de 405 nm (Microplate Reader, BIORAD-550). Los resultados fueron expresados como porcentaje de inhibición de formación de β -hematina

2.2. Mantenimiento de la cepa de parásito

Ratones machos Balb-C, con peso entre 18-22 g, fueron mantenidos con una dieta comercial bajo condiciones aprobadas por el comité de ética de la Facultad de Farmacia-UCV. Una cepa de *Plasmodium berghei* (ANKA sensible a cloroquina), fue usada para infectar los ratones por vía intraperitoneal usando un inóculo de 1×10^6 eritrocitos infectados, diluidos en buffer fosfato (PBS, 10 mM, pH 7,4, 0,1 mL). La parasitemia fue monitoreada a través de examen

microscópico de extendido de sangre teñidos con Giemsa.

2.3. Extractos de parásitos

La sangre de los animales infectados con un alto nivel de parasitemia (**50%**), se colectó por punción cardíaca usando una jeringa heparinizada, y se centrifugó a (500g x 10 minutos, 4°C). El plasma se removió y las células rojas se lavaron con dos volúmenes de PBS-Glucosa en frío (5.4%). Se centrifugó sobre un gradiente (80-70% percoll en PBS-glucosa, 20.000g x 30 min x 4°C) (17). Los eritrocitos infectados con las formas maduras parasitarias se removieron por aspiración, se colectaron en tubos Eppendorf y lavaron dos veces con solución de PBS-Glucosa fría. Los eritrocitos infectados se lisaron por tratamiento con saponina 0,1% en PBS x 10 min, se trataron con 1 mL de PBS frío y se centrifugó nuevamente a (13.000g x 5 minutos, 4°C). El precipitado (parásitos libres), se mezcló con PBS-Glucosa (5,4 %) y se sometió a tres ciclos de congelación y descongelación (-20°C / +37°C). El homogenado final se usó en el ensayo de hidrólisis de la hemoglobina (18).

2.4. Hemoglobina nativa de ratón

La hemoglobina de ratones no infectados se obtuvo al tratar un volumen de eritrocitos con dos volúmenes de agua. La solución resultante se usó como sustrato para el ensayo de hidrólisis de la hemoglobina.

2.5. Inhibición de la proteólisis de la hemoglobina

El efecto proteolítico del extracto del parásito sobre la hemoglobina se ensayó, usando una placa de 96 pozos (Greiner Bio-One). En cada pozo se mezclaron hemoglobina de ratón (10 μ L), extracto de parásito (50 μ L), GSH (10 μ L, 10 μ M) y buffer acetato (0,2 M, pH 5,4) para un volumen final de 100 μ L. los compuestos (2,5 mM) fueron incorporados en la mezcla de incubación, disueltos en DMSO. La incubación fue realizada a 37°C durante 18 h y la reacción se detuvo por la adición de buffer. El grado de digestión se evaluó electroforéticamente en geles de polarilamida-

SDS al 15%, teñidos con azul de coomassie. Las bandas de hemoglobina se analizaron por densitometría y se calculó el grado de digestión. Controles con DMSO, pepstatina, leupeptina y cloroquina se sometieron a electroforesis al mismo tiempo (18).

2.6. Test de sobrevivencia de los ratones infectados con *P. berghei*

Ratones de la cepa Balb-C (18-22 g, n: 6), se inocularon intraperitonealmente con glóbulos rojos infectados con *P. berghei* (1×10^6). Dos horas después de la infección, se inició el tratamiento con el compuesto **31**, disuelto en DMSO (0.1 M), diluido con Tween 20- solución salina (2%). El compuesto se administró i.p. (20 mg/kg), una vez al día por cuatro días consecutivos cada 24 h. Al cuarto día post-infección se determinó la parasitemia por examen microscópico de extendido de sangre, teñido con Giemsa. Se incluyó un grupo control tratado con solución salina y otro tratado con cloroquina (25 mg/kg). Los resultados se expresaron como porcentaje de parasitemia y días de sobrevivencia post-infección (19).

2.7 Análisis de los datos

Los datos fueron analizados estadísticamente usando la prueba de T para grupos específicos de comparación; asumiendo un 95% de confiabilidad usando el programa Graph Pad Prism 3.02.

Resultados y Discusión

Nuestra estrategia para la síntesis de los compuestos **14-26**, se fundamentó en el uso de las quinolinas intermediarias **1-13** (15), que fueron sometidas a un proceso de heterociclación regioselectiva en un sólo paso de reacción, usando mercapto acetato de etilo en medio alcalino, etanol como solvente y reflujo para obtener los derivados tieno-[2,3-b]quinolina 2-carboxilato de etilo **14-26** con rendimientos de moderado a bueno. Mediante hidrólisis en medio alcalino y luego de la acidificación del medio, se obtuvo los ácidos respectivos **27-35**. La de-

terminación estructural de los compuestos **14-26**, se realizó sobre la base de IR, espectroscopia de masas y estudio de RMN. La regioselectividad de la ciclación fue fácilmente determinada por un análisis de los espectros de ^1H , ^{13}C RMN y estudio de dos dimensiones como HETCOR y FLOCK, lo que permitió ver los acoplamientos a larga distancia ^1H - ^{13}C . Los derivados **27-35**, se caracterizaron a través de IR, ^1H RMN y análisis elemental, los cuales concuerdan con las estructuras propuestas (Esquema 1).

Los compuestos se evaluaron por su efecto como posibles inhibidores de la formación de la β -hematina, inhibición de la proteólisis de la hemoglobina; el más activo en esta última prueba fue evaluado por su eficacia en ratones infectados con *P. berghei* (Tablas 1, 2; Figuras 1, 2). La inhibición de la formación de la β -hematina, mostró que todos los compuestos fueron inactivos comparados con la cloroquina. Consecuentemente, se tomaron nueve de estos compuestos **14**, **16**, **18**, **19**, **24**, **27**, **31**, **32** y **34** y se ensayaron por su capacidad para inhibir la proteólisis de la hemoglobina, en una prueba en la que se usó un extracto rico en trofozoitos para digerir la hemoglobina de ratones. El análisis electroforético indica que solamente los compuestos **18**, **31** y **32** fueron efectivos inhibiendo la degradación de la hemoglobina (banda intacta 14,4 kDa). Por otro lado los compuestos **16** y **27** mostraron una actividad moderada y el resto de los compuestos se pueden considerar como débiles inhibidores de la hidrólisis de la hemoglobina. Para el ensayo *in vivo*, se seleccionó el compuesto **31** y se administró a una dosis de 20 mg/kg, intraperitonealmente, una vez al día por cuatro días consecutivos, midiéndose su capacidad para producir un mayor tiempo de sobrevivencia y disminución de la parasitemia en los ratones infectados. Los ratones controles murieron a los 10 días, mientras que el compuesto **31** produjo un tiempo de sobrevivencia de alrededor de 16 días, disminuyendo el nivel de parasitemia a un 7% (Tablas 2; Figura 2). Este resultado sugiere

Table 1
 Porcentaje de inhibición de la proteólisis de la globina (%IGP). LEP: Leupeptina; PEP: Pepstatina; CQ: Chloroquina. ** p<0,001 comparando con LEP y PEP.

Compuesto	X	% IGP
14	H	54,68 ± 0,67
16	7-CH ₃	75,36 ± 0,96
18	5,7-CH ₃	91,98 ± 0,68
19	6-OCH ₃	65,39 ± 1,24
24	7-Cl	58,86 ± 0,94
27	H	83,03 ± 0,89
31	5,7-CH ₃	99,97 ± 0,38**
32	7-OCH ₃	91,94 ± 0,64
34	5,6,7-OCH ₃	62,83 ± 1,12
LEP		91,62 ± 0,69
PEP		95,45 ± 0,66
CQ		27,71 ± 1,85

Table 2
 Parasitemia después del cuarto día post-infección (% P). ** p<0,01 comparado con los ratones tratados con solución salina. † p >0,05 Comparado con los ratones tratados con cloroquina. CQ: cloroquina.

Tratamiento	% P	Días de sobrevivencia
Salina	26,2 ± 3,03	10 ± 1,09
31	6,9 ± 2,95 ** †	15 ± 1,76 *
CQ	3,16 ± 0,47	30

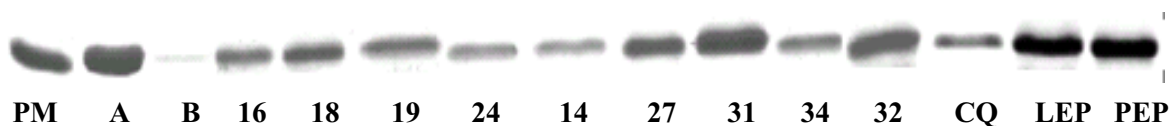


Figure 1. Bandas de globina después de la incubación del extracto de trofozoitos con hemoglobina y los compuestos respectivos. PM: Marcador de peso molecular de hemoglobina (14,4 kDa); A: Control de hemoglobina sin extracto de trofozoitos; B: Control de hemoglobina mas extracto de trofozoitos; 14, 16, 18, 19, 24, 27, 31, 32 y 34: hemoglobina, trofozoitos y compuestos; CQ, LEP and PEP: hemoglobina, trofozoitos y cloroquina, leupeptina y pepstatin respectivamente.

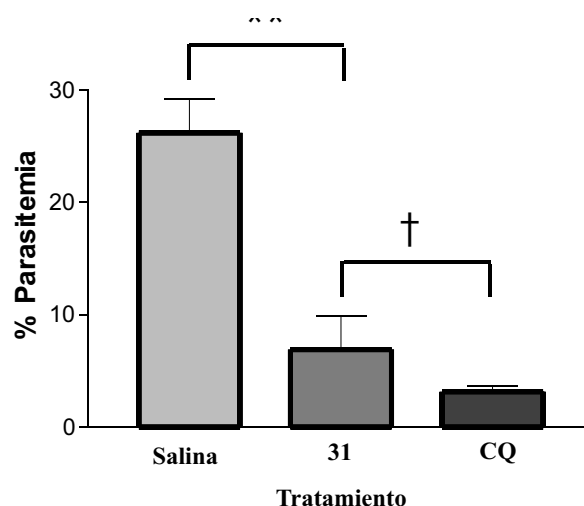


Figure 2. Parasitemia al cuarto día post-infección. ** $p < 0,01$. † $p > 0,05$. CQ: cloroquina.

que el mecanismo de acción de este compuesto, podría estar relacionado con la inhibición de alguna de las proteasas relacionadas con la proteólisis de la hemoglobina, debido a la presencia de la banda intacta de globina (Figura 1).

Se puede observar que la presencia de grupos metilo en las posiciones 5 y 8 del núcleo de la quinolina, aunada a la presencia de un grupo carboxi, ejercen una acción cooperativa en el proceso de inhibición de las proteasas involucradas en la proteólisis de la globina, correspondiéndose este resultado con los previamente reportados por nuestro grupo (12-14).

Conclusión

Se ha descrito la síntesis y evaluación biológica *in vitro* e *in vivo* de una serie de derivados del ácido tieno-[2,3-b]quinolina 2-carboxílico. Los resultados de esta evaluación, nos indican que estamos ante una nueva clase de compuestos potencialmente antimaláricos y aunque este estudio inicial envuelve un número limitado de compuestos, este resultado nos ofrece nuevas expectativas para seguir trabajando, en la búsqueda de modificaciones que nos permitan mejorar la actividad de este núcleo y esta-

blecer los criterios para un mejor estudio de la relación estructura química-actividad biológica. Además, nos permite proponer como primera hipótesis que el mecanismo de acción del compuesto **31**, así como su actividad antiplasmodial, está relacionado con la inhibición de las proteasas involucradas en el proceso de proteólisis de la globina. El estudio relacionado con la actividad citotóxica de este compuesto está en vía de realización.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo financiero del IIF-UCV, CDCH-UCV con el proyecto PI. 06-30-5100.2006 y al programa CYTED-RIDIMEDCHAG.

Referencias Bibliográficas

- GARDENER M.J., SHALLON S.J., CARLTON J.M., SALZBERG S.L., NENE V., SHOAIBI A. *Nature* 419: 531-534, 2000.
- WAHLGREN M., BEJARANO M.T. *Nature* 419: 506-507, 2000.
- WINSTALEY P.A. *Parasitol Today* 16: 136-153, 2000.
- BREMEN J. *Am J Trop Med Hyg* 64: 1-11, 2001.

5. DOMÍNGUEZ J. **Curr Top Med Chem** 2: 1171-1183, 2002.
6. CARSON P.E., **In Antimalarial Drugs II**; PETERS W., RICHARDS W.H., Eds., Springer: New York (USA), pp 83-126, 1984.
7. LIMA P.D., BARREIRO E.J., AVERY M.A. Abstracts of paper, **223rd ACS National Meeting**, Orlando, FL (USA), April 7-11, 2002.
8. FLIPO M., FLORENT I., GRELLIER P., SERGHERAET C., DEPEREZ-POULAIN R. **Bioorg Med Chem Lett** 13: 2659-2662, 2003.
9. ROMERO S., DELLÁGLI M., PARAPINI S., RIZZI L., GALLI G., MONDANI M., SPARATORE A., TARAMELLI D., BOSISIO E. **Bioorg Med Chem Lett** 14: 2931-2934, 2004.
10. BIOT C., DESSOLIN J., DAVIOUD-CHARVETE. **Redox Rep** 8: 280-286, 2003.
11. DAVIOUD-CHARVET E., DELAURE S., BIOT C., SCHWOBEL B., BOEHME C., MUSSIGBRODT A., MAES L., SERGHERAERT C., GRELLIER P., SCHIRMER R., BECKER K. **J Med Chem** 44: 4268-4276, 2001.
12. CHARRIS J., DOMÍNGUEZ J., GAMBOA N., RODRIGUES J., ANGEL J. **Eur J Med Chem** 40: 875-881, 2005.
13. CHARRIS J., DOMÍNGUEZ J., GAMBOA N., RODRIGUES J., ANGEL J. **Heterocycl Commun** 11: 419-422, 2005.
14. CHARRIS J., LOBO G., CAMACHO J., FERRER R., BARAZARTE A., GAMBOA N., RODRIGUES J., ANGEL J. **Lett Drug Des Dis** 4: 49-54, 2007.
15. METH-COHN O., NARINE B., TARNOSWSKY B. **J Chem Soc Perkin I** 1520-1530, 1981.
16. BAELMANS R., DEHARO E., MUÑOZ V., SAUVAIN M., GINSBURG H. **J Exp Parasitol** 4: 243-248, 2000.
17. DEHARO E., GAUTIER P., GINSBURG H., CHABAUD A., LANDAU I. **Parasitol Res** 80: 159-164, 1994.
18. ROSENTHAL P. **Exp. Parasitol** 80: 272-281, 1995.
19. PETERS W., ROBINSON B.L. **In handbook of antimalarial. models of infection**; Zak, O; Sande, M, (Eds. Academic Press), London, (UK), pp. 757-753, 1999.