

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE FARMACIA
POSTGRADO DE QUÍMICA DE MEDICAMENTOS



**“SÍNTESIS DE ANÁLOGOS DE 7-CLOROQUINOLIL-4-ILTIO Y DEL
BENZOTIAZOL. EVALUACIÓN DE SU POTENCIAL ACTIVIDAD
ANTIMALÁRICA Y CITOTÓXICA-ANTITUMORAL”**

AUTOR

LIC. JESÚS ANTONIO ROMERO LUGO

Trabajo presentado ante la Ilustre
Universidad Central de Venezuela para optar al título de Doctor en Química de
los Medicamentos, opción Síntesis de Medicamentos

TUTORES

DR. JAIME ENRIQUE CHARRIS CHARRIS

DRA. NEIRA GAMBOA DE DOMÍNGUEZ

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE FARMACIA
POSTGRADO DE QUÍMICA DE MEDICAMENTOS**



**“SÍNTESIS DE ANÁLOGOS DE 7-CLOROQUINOLIL-4-ILTIO Y DEL
BENZOTIAZOL. EVALUACIÓN DE SU POTENCIAL ACTIVIDAD
ANTIMALÁRICA Y CITOTÓXICA-ANTITUMORAL”**

LIC. JESÚS ANTONIO ROMERO LUGO

Ciudad Universitaria de Caracas, Febrero de 2014

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE GENERAL	I
ABREVIATURAS Y SIMBOLOS	V
ÍNDICE DE GRÁFICOS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE ESQUEMAS	XIV
ÍNDICE DE TABLAS	XV
ÍNDICE DE ESPECTROS	XVIII
RESUMEN	XIX
ABSTRACT	XXI
I.INTRODUCCIÓN	1
I.1. El cáncer	2
I.1.1 Ciclo celular	5
I.1.2 Apoptosis	6
I.1.3 Angiogénesis	13
I.1.4. Causas y factores de riesgo para el desarrollo de cáncer	14
I.1.5. Tratamientos	16
I.1.5.1.Cirugia	16
I.1.5.2.Radioterapia	16
I.1.5.3.Trasplante de medula ósea	17
I.1.5.4.Quimioterapia	17
I.2. Malaria	38
I.2.1. Ciclo de infección de la malaria	41
I.2.2. Estrategias para el control de la malaria	43
I.2.3. Quimioterapia	45
I.2.3.1 Quinolinas	45
I.2.3.2 Antifolatos	48
I.2.3.3 Artemisinina y derivados	49
I.2.3.4 Uso de Combinaciones	51

I.2.3.5	Compuestos organometálicos	52
II.	ANTECEDENTES	56
III.	OBJETIVOS	67
III.1.	Objetivos general	67
III.2.	Objetivos específicos	67
IV.	PARTE EXPERIMENTAL	72
IV.1.	Materiales, equipos y reactivos	72
IV.2.	Sección Química	74
IV.2.1.	Síntesis de acetato 2-[4-(7-cloro-quinolinilsulfinil)] de metilo (109)	74
IV.2.2.	Síntesis de acrilato 2-(7-cloroquinolinil-4-iltio)-3-(4-hidroxifenil) de metilo (75)	75
IV.2.3.	Procedimiento general para la síntesis de benzoatos de 4-[(E)-2-(metoxicarbonil)-2-(7-cloroquinolil-4-iltio)vinil] fenilo (112a-s)	76
IV.2.4.	Síntesis general para los ácidos 2-(5-nitrofurano/tiofeno-2-il)-3 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-6-carboxílico (115a, 115b)	92
IV.2.5.	Procedimiento general para la síntesis de 2-(5-nitrofurano-2-il)- <i>N</i> -fenil-3 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-6-carboxamidas (117a-p, 118a-p)	93
IV.2.6.	Síntesis de 2-aminobenzo[<i>d</i>]tiazolil-6-carbonitrilo (121)	122
IV.2.7.	Síntesis de 4-amino-3-mercaptobenzonitrilo (122)	123
IV.2.8.	Procedimiento general para la síntesis de los ácidos 2-(5-nitrofurano/tiofeno-2-il)benzo[<i>d</i>]tiazol-6-carboxílico (123a , 123b)	123
IV.2.9.	Procedimiento general para la síntesis de los análogos 2-(5-nitrotiofeno-2-il)- <i>N</i> -fenilbenzo[<i>d</i>]tiazol-6-carboxamidas (124a-p , 125a-p)	124
IV.3.	Pruebas Biológicas	125

IV.3.1. Evaluación antimalárica	125
IV.3.2. Evaluación citotóxica-antitumoral	127
IV.3.3. Evaluación antimicrobiana	130
IV.4. Cálculo de propiedades, construcción y optimización de la geometría	131
IV.4.1 Optimización y calculo de energía	131
IV.4.2 Cálculo de propiedades	132
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	133
V.1. Sección química	133
V.1.1. Síntesis de 2-[4-(7-cloro-quinolinilsulfinil)] acetato de metilo (109)	134
V.1.2. Síntesis de 2-(7-cloroquinolinil-4-iltio)-3-(4-hidroxifenil) acrilato de metilo (75)	135
V.1.3. Síntesis de 4-[(E)-2-(metoxicarbonil)-2-(7-cloroquinolil-4-iltio)vinil]fenilbenzoatos (112a-n)	137
V.1.4. Síntesis de análogos del bencimidazol	164
V.1.4.1. Síntesis de Ácido 2-(5-nitrofuran/tiofen-2-il)-3H-benzo[d]imidazol-6-carboxílico (115a-b)	164
V.1.4.2. Síntesis de 2-(5-nitrofuran/tiofen-2-il)-N-fenil-3H-benzo[d]imidazol-6-carboxamidas (117a-s, 118a-s)	167
V.1.5. Síntesis de análogos del bencimidazol	180
V.1.5.1 Síntesis de 4-amino-3-mercaptobenzonitrilo (121)	180
V.2. Pruebas biológicas	182
V.2.1. Evaluación antimalárica	182
V.2.1.1. Evaluación de inhibición de la formación de hemozoína serie 112a-n	182
V.2.1. 2. <i>Test supresivo de Peters</i> serie112 a-n	183

V.2.1. 3. Evaluación de inhibición de la formación de hemozoína series 117a-p y 118a-p	189
V.2.1.4. <i>Test supresivo de Peters</i> series 117a-p y 118a-p	191
V.2.2. Evaluación citotóxica antitumoral	194
V.2.3. Evaluación antimicrobiana	213
VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	230
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	233

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

α	Alfa
ANOVA	Análisis de varianza de dos colas
As ₂ O ₃	Trióxido de Arsénico
β	Beta
C	Carbono
°C	Grado centígrado
CHCl ₃	Cloroformo
CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50
Cl	Cloro
COSY	Correlación espectroscópica de hidrógenos
CQ	Cloroquina
cm ⁻¹	Centímetros recíprocos
δ	Desplazamiento químico
d	Doblete
dd	Doblete de doblete
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DSPI	Días de sobrevivencia post-infección
EDCI	Hidrocloruro de 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EM	Espectrometría de Masa
Et ₃ N	Trietilamina
F	Flúor
FITC	Isocianato de fluoresceína
FLOCK	Correlación heteronuclear de desplazamiento químico a larga distancia
g	Gramos
H	Hidrógeno
h	Hora
HETCOR	Correlación heteronuclear de desplazamiento químico

HL60	Línea celular de leucemia humana promielocítica
Hz	Hertz
IF β H	Inhibición de la formación de β -hematina
ip	Intraperitoneal
IP	Ioduro de propidio
IR	Espectroscopia infrarrojo
IS	Índice de selectividad
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
Jurkat E6.1	Línea celular de leucemia humana promielocítica
KBr	Bromuro de potasio
Kg	Kilogramo
log	Logaritmo base 10
m	Multiplete
m/z	Relación masa carga
M ⁺	Ión molecular
MeOH	Metanol
min	Minutos
mm	Milímetro
μ M	Micromolar
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mmol	Milimol
MTT	Método Bromuro de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazolio]
N	Nitrógeno
nm	Nanómetro
O	Oxígeno
OMS	Organización Mundial de la Salud
%P	Porcentaje de parasitemia
<i>P.</i>	Plasmodium
PM	Peso molecular

p.f.	Punto de fusión
Ph	Fenilo
ppm	Partes por millón
PS	Fosfatidilserina
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de protones
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
s	Singlete
sa	Singlete ancho
SD	Desviación estándar
t	Triplete
t.a.	Temperatura ambiente
TLC	Cromatografía de capa fina

ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Página	
Gráfico 1	Distribución porcentaje de los principales tipos de cáncer en el mundo	4
Gráfico 2	Reporte de casos de malaria en el mundo	39
Gráfico 3	Distribución de casos de malaria en África	39
Gráfico 4	Reportes oficiales de malaria en América	40
Gráfico 5	Distribución de casos de malaria por especie de <i>Plasmodium</i> en Venezuela	41
Gráfico 6	Modificaciones de la parasitemia (%) al cuarto día post-infección y de los días de supervivencia post-infección (DSPI) de ratones tratados con los compuestos 112a 20mg/kg	186
Gráfico 7	Modificaciones de la parasitemia (%) al cuarto día post-infección y de los días de supervivencia post-infección (DSPI) de ratones tratado con los compuestos 112a 10mg/kg	187
Gráfico 8	Modificaciones de la parasitemia (%) al cuarto día post-infección y de los días de supervivencia post-infección (DSPI) de ratones tratados con los diferentes compuestos 117 y 118	192
Gráfico 9	Gráficos de densidad de punto de las células apoptóticas después del tratamiento por 24 h de las células leucémicas HL60 con los derivados seleccionados de la serie 117	204
Gráfico 10	Gráficos de densidad de punto de las células apoptóticas después del tratamiento por 24 h de las células leucémicas HL60 con los derivados seleccionados de la serie 118	205
Gráfico 11	Gráficos de densidad de punto de las células apoptóticas después del tratamiento por 24 h de las células leucémicas	

	Jurkat E6.1 con los derivados seleccionados de la serie 117	206
Gráfico 12	Gráficos de densidad de punto de las células apoptóticas después del tratamiento por 24 h de las células leucémicas Jurkat E6.1 con los derivados seleccionados de la serie 118	207
Gráfico 13	Diámetros de inhibición en mm, obtenidos de la evaluación in vitro sobre <i>B. cereus</i> , series 117 y 118	219
Gráfico 14	Diámetros de inhibición en mm, obtenidos de la evaluación in vitro sobre <i>S. aureus</i> , series 117 y 118	219
Gráfico 15	Diámetros de inhibición en mm, obtenidos de la evaluación in vitro sobre <i>E. coli</i> , series 117 y 118	220
Gráfico 16	Diámetros de inhibición en mm, obtenidos de la evaluación in vitro sobre <i>P. aeruginosa</i> , series 117 y 118	220
Gráfico 17	Diámetros de inhibición en mm, obtenidos de la evaluación in vitro sobre <i>C. tropicalis</i> , series 117 y 118	221

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Ciclo celular	5
Figura 2	Vías Apoptóticas: Intrínseca y Extrínseca	8
Figura 3	Ciclo celular y fase de actuación de los citostáticos	18
Figura 4	Estructura química de algunos agentes alquilantes	20
Figura 5	Mecanismo de acción de las mostazas nitrogenadas	21
Figura 6	Metabolismo de las <i>N</i> -nitrosoureas	22
Figura 7	Estructura química de cisplastino y mecanismo de acción con el ADN	23
Figura 8	Estructura química y activación metabólica de mitomicina C	24
Figura 9	Estructura química de bleomicina	25
Figura 10	Estructura química de antraciclinas	25
Figura 11	Estructura química de actinomicina D	26
Figura 12	Estructura química de enodíinos y activación metabólica	27
Figura 13	Estructura química de dinemicina A	28
Figura 14	Estructura química de mitoxantrona y bisantreno	28
Figura 15	Estructura química de alcaloides de la Vinca	29
Figura 16	Mecanismo de acción de taxanos y alcaloides de la Vinca	30
Figura 17	Estructura química de alcaloides del tejo	30
Figura 18	Estructura química de camptotecinas	31
Figura 19	Estructura química de epipodofilotoxinas	32
Figura 20	Estructura química de agentes antiangiogénicos	32
Figura 21	Agentes interruptores de la vascularización	33
Figura 22	Estructura química de combrestatina A4	33
Figura 23	Estructura química de la colchicina	34
Figura 24	Fármacos inhibidores de la Tirosina Quinasa	35
Figura 25	Representación esquemática de la estructura de un	

	anticuerpo monoclonal	36
Figura 26	Distribución de la malaria en el mundo para el año 2012	38
Figura 27	Ciclo de infección de la malaria	42
Figura 28	Estructuras químicas de los principales derivados aminoquinolinicos utilizados en el tratamiento de la malaria	46
Figura 29	Estructura química de antifolatos	49
Figura 30	Estructura química de artemisinina y derivados	50
Figura 31	Mecanismo de activación reductiva de artemisinina por complejo Fe ^{II} -Hemo	50
Figura 32	Estructura química de complejos metálicos con cloroquina	52
Figura 33	Síntesis de análogos 2-ferrocenilquinolinas	53
Figura 34	Estructura química de hemo libre y hematina	55
Figura 35	Estructura química de tioacridina	56
Figura 36	Estructura química de quinolinas ensayadas sobre líneas celulares MCF-7	57
Figura 37	Estructura química de quinoleína MT477	57
Figura 38	Fórmulas estructurales de quinolinas sustituidas	58
Figura 39	Fórmulas estructurales de tioquinolinas sustituidas	59
Figura 40	Estructura química de Linomide	59
Figura 41	Fórmulas estructurales de derivados 4- sulfanilvinilquinolinas	60
Figura 42	Fórmulas estructurales de 7-cloroquinolinil-4- aminofenilchalconas	61
Figura 43	Estructura química de quinolina 85	61
Figura 44	Fórmulas estructurales de derivados 4- sulfanilvinilquinolinas	63
Figura 45	Fórmulas estructurales de derivados fenilbenzotiazil y furanos/tiofenos dibenzotiazolil	63
Figura 46	Estructura química de 1-(4-fluorobencil)-2-(2,4-diclorofenil)- <i>N</i> -(4-ciano-3-(trifluorometil)fenil)-1- <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-5- carboxamida	64

Figura 47	Estructura base de derivados de 5-nitrofurán y/o 5-nitrothiofenilbenzoimidazol	64
Figura 48	Estructura química de metil 1 - (4-metoxifenil) -2 - (4-fluoro-3-nitrofenil)-1H-bencimidazol-5-carboxilato de etilo	65
Figura 49	Estructuras generales de 2-aminobenzotiazoles	65
Figura 50	Estructura química de <i>N</i> -(2-metil-1-vinil-1 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>]imidazol-6-il)-2-(1 <i>H</i> -pirrol-1-il)quinazolin-4-amina	66
Figura 51	Mecanismo propuesto para la síntesis de 2-[4-(7-cloroquinolinilsulfinil] acetato de metilo (109)	134
Figura 52	Mecanismo de la reacción de condensación Knoevenagel	135
Figura 53	Reacción general de una adición bisulfítica a un carbonilo	136
Figura 54	Reacción de esterificación propuesta para la síntesis de la serie 112a-n .	137
Figura 55	Perfil de energía para una reacción de sustitución acíclica general	138
Figura 56	Estructuras resonantes de la base conjugada del compuesto 75	139
Figura 57	Reacción modificada de Steglich, síntesis de serie 112a-n	140
Figura 58	Mecanismo propuesto para la reacción modificada de Steglich	141
Figura 59	Mecanismo propuesto para la catálisis con DMAP, formación de “amida activa”	141
Figura 60	Estructura química del compuesto 112	143
Figura 61	Escisiones principales encontradas en los espectros de masas de los derivados 112	145
Figura 62	Estructura química del compuesto 112a	146
Figura 63	Patrón de fragmentación propuesta para el espectro de masas del compuesto 112a	155
Figura 64	Esquema retrosíntesis para la síntesis de la serie 112o-s	162
Figura 65	Estructuras de resonancia propuestas para la base conjugada de 110	162

Figura 66	Síntesis de la serie 112o-s	163
Figura 67	Reacción propuesta tipo Knoevenagel para la síntesis de 112o-s	163
Figura 68	Síntesis del ácido 2-(5-nitrofuran/tiofen-2-il)-3H-benzo[d]imidazol-6-carboxílico (115a (X=O) y 115b (X=S))	164
Figura 69	Mecanismo propuesto para la síntesis de bencimidazoles 115a-b	165
Figura 70	Reacción general, síntesis de 117a-s, 118a-s	167
Figura 71	Mecanismo propuesto para la formación de cloruro ácido empleando pentacloruro de fósforo	168
Figura 72	Mecanismo propuesto para la formación de cloruro ácido empleando cloruro de tionilo (SOCl ₂)	169
Figura 73	Estructura general y numeración de los derivados 117a-p (X=O) y 118a-p(X=S)	172
Figura 74	Escisiones principales encontradas en los espectros de masas de los derivados 117, 118	174
Figura 75	Formación del formazan, ensayo del MTT	194
Figura 76	Estructura Química de AN: amikacina SAM: ampicilina/sulbactam, O: ofloxacina, TIL: tilmicosin, PB: polimixina B	214
Figura 77	Activación de prodrogas tipo éster y carbamato mediante Carboxilesterasas	224
Figura 78	Activación de prodrogas mediante acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BChE)	225

ÍNDICE DE ESQUEMAS

	Página
Esquema 1 Estrategia sintética para la obtención de derivados de benzoato de 4-[(E)-2-(metoxicarbonil)-2-(7-cloroquinolil-4-iltio)vinil]fenilo 112a-s .	69
Esquema 2 Síntesis de 2-(5-nitrofuran/tiofen-2-il)-N-fenilbenzo[<i>d</i>]tiazol-6-carboxamidas. Serie (117a-r, 118a-r)	70
Esquema 3 Síntesis de 2-(5-nitrofuran/tiofen-2-il)-N-fenilbenzo[<i>d</i>]tiazol-6-carboxamidas. Serie 124a-r, 125a-r	71
Esquema 4 Aproximación a la síntesis de las series 124 y 125	167

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla I	Anticuerpos monoclonales	37
Tabla II	Ácidos de partida 111a-s para la esterificación de la serie 112a-s	77
Tabla III	Anilinas de partida 116a-p	94
Tabla IV	Condiciones optimas encontradas en la esterificación de la serie 112a-n	142
Tabla V	Porcentajes de rendimiento y características físicas y químicas de la serie 112a-n	142
Tabla VI	Patrón de sustitución de los ácidos halogenados ensayados	157
Tabla VII	Energías asociadas a los carboxilatos correspondientes	159
Tabla VIII	Porcentajes de rendimiento y características físicas y químicas de la serie 2-(5-nitrofurán-2-il)- <i>N</i> -fenil-3 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-6-carboxamidas (117a-p)	170
Tabla IX	Porcentajes de rendimiento y características físicas y químicas de la serie 2-(5-nitrotiofen-2-il)- <i>N</i> -fenil-3 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-6-carboxamidas (118a-p)	171
Tabla X	Porcentajes de inhibición en la formación de hemozoína serie 112a-n	183
Tabla XI	Modificaciones del porcentaje de parasitemia y días de supervivencia post infección de ratones infectados con <i>Plasmodium berghei</i> , tratados con la serie 112 , a una dosis de 20mg/Kg.	185
Tabla XII	Modificaciones del porcentaje de parasitemia y días de supervivencia post infección de ratones infectados con <i>Plasmodium berghei</i> , tratados con la serie 112 , a una dosis	

	de 10mg/Kg	187
Tabla XIII	Porcentajes de inhibición en la formación de hemozoína serie 117 y 118	189
Tabla XIV	Compuestos candidatos a ensayos <i>in vivo</i> -test de Peters series 117 y 118	190
Tabla XV	Modificaciones del porcentaje de parasitemia y días de supervivencia post infección de ratones infectados con <i>Plasmodium berghei</i> , tratados con la serie 117 y 118 , a una dosis de 10mg/Kg.	191
Tabla XVI	Efectos de los derivados 112a-n sobre la proliferación de las células leucémica HL60	195
Tabla XVII	Efectos de los derivados 112a-n sobre la proliferación de las células leucémica Jurkat E6.1	196
Tabla XVIII	Efectos de los derivados 117 y 118 sobre la proliferación de las células leucémica HL60	199
Tabla XIX	Efectos de los derivados 117a-s sobre la proliferación de las células leucémica HL60	200
Tabla XX	Efectos de los derivados 117a-s sobre la proliferación de las células leucémica Jurkat E6.1	201
Tabla XXI	Efectos de los derivados 118a-s sobre la proliferación de las células leucémica Jurkat E6.1	202
Tabla XXII	Concentraciones inhibitorias medias e índices de selectividad de los derivados de 2-(5-nitrotiofen/furan-2-il)- <i>N</i> -fenil-3 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-6-carboxamidas más activos en los linfocitos humanos normales obtenidos de sangre periférica y las células de leucemia linfocítica humana Jurkat E6.1, después de 24h de tratamiento	203
Tabla XXIII	Resultados obtenidos después de 24 h, de las células leucémicas HL60 con los derivados seleccionados de las series 117 .	209
Tabla XXIV	Resultados obtenidos después de 24 h, de las células	

	leucémicas HL60 con los derivados seleccionados de las series 118 .	210
Tabla XXV	Resultados obtenidos después de 24 h, de las células leucémicas Jurkat E6.1 con los derivados seleccionados de las series 117 .	211
Tabla XXVI	Resultados obtenidos después de 24 h, de las células leucémicas Jurkat E6.1 con los derivados seleccionados de las series 118 .	212
Tabla XXVII	Evaluación de la actividad antimicrobiana en función del halo de inhibición (mm) de la serie 112a-n	215
Tabla XXVIII	Evaluación de la actividad antimicrobiana en función del halo de inhibición (mm) de la serie 117a-p	216
Tabla XXIX	Evaluación de la actividad antimicrobiana en función del halo de inhibición (mm) de la serie 118a-p	217
Tabla XXX	Evaluación de la actividad antimicrobiana en función del halo de inhibición (mm) del grupo control	218
Tabla XXXI	Descriptores evaluados para la serie 112a-n , regla de Lipinski	227
Tabla XXXII	Descriptores evaluados para las series 117a-p y 118a-p , regla de Lipinski	228

ÍNDICE DE ESPECTROS

	Página
Espectro 1	Espectro IR del compuesto 112a 147
Espectro 2	Espectro RMN ¹ H de 112a y su ampliación 149
Espectro 3	Espectro COSY de compuesto 112a y su ampliación 150
Espectro 4	Espectro RMN ¹³ C de 112a y su ampliación 152
Espectro 5	Espectro HETCOR de compuesto 112a y su ampliación 153
Espectro 6	Espectro FLOCK de compuesto 112a 154
Espectro 7	Espectro masas de compuesto 112a 156
Espectro 8	Espectro IR del compuesto 117a 175
Espectro 9	Espectro RMN ¹ H de 117a y su ampliación 176
Espectro 10	Espectro COSY de 117a y su ampliación 177
Espectro 11	Espectro HETCOR de 117a 178
Espectro 12	Espectro RMN ¹³ C de 117a 179

RESUMEN

En esta investigación se propuso la síntesis de nuevos compuestos empleando la aproximación experimental de la *variación molecular* y la evaluación su posible actividad antimalárica, citotóxica-antitumoral y antimicrobiana. Se describe la síntesis de una serie de derivados benzoatos de 4-[(E)-2-(metoxicarbonil)-2-(7-cloroquinolil-4-iltio)vinil]fenilo (**112a-n**), fundamentada en un procedimiento de síntesis lineal de tres pasos, en donde el paso clave implicó la reacción de esterificación modificada de Steglich, mediante el uso de clorhidrato de 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCI) como agente activante. Con rendimientos entre el 30 -60 %. La estrategia utilizada para la obtención de los derivados 2-(5-nitrofurán/tiofen-2-il)-*N*-fenil-3*H*-benzo[*d*]imidazol-6-carboxamidas (**117a-p**, **118a-p**), se fundamentó en un proceso sintético lineal de dos etapas, en los que involucro una reacción de ciclocondensación oxidativa empleando como agente oxidante *p*-benzoquinona (BQ) y en la síntesis de las amidas finales la activación con EDCI. Con rendimientos entre el 31 -55 %.

En la evaluación de la actividad antimalárica *in vitro* se evidenció que los derivados **112a**, **112h**, **112j**, **112k**, **112l**, **117b**, **117d**, **117f**, **117i**, **117l**, **117n**, **117o**, **118d**, **118e**, **118g**, **118i** y **118n** mostraron potencial actividad logrando la inhibición de la formación de la hemozoína en un porcentaje superior al 70%. En la evaluación antimalárica *in vivo* (*Test de Peters*) se encontró que el derivado **112c** fue el más activo de la primera serie con $29.83 \pm 0,40$ días de sobrevivencia post-infección y una parasitemia de $1,00 \pm 0,12$, mientras que el derivado **117d** presentó la mejor actividad con $20,20 \pm 1,95$ días de sobrevivencia post-infección y una parasitemia de $3,05 \pm 0,09$, comparables a la cloroquina (CQ).

Con respecto a los resultados obtenidos en el efecto de estos derivados sobre la viabilidad y proliferación de las líneas celulares neoplásicas Jurkat E6.1, HL60, los compuestos de la serie **117** resultaron más activos que los

compuestos de la serie **118**, siendo más activos inhibiendo la proliferación de las células de leucemia mieloide aguda HL60 que las células de leucemia linfocítica aguda, Jurkat E6.1. Los derivados más activos de la serie **117** y **118**, resultaron más tóxicos para las células de cáncer, indicando un nivel razonable de selectividad. Los derivados **112a** y **112b** mostraron la mayor actividad inhibitoria del crecimiento de las células leucémicas HL60 después de 24h de tratamiento con valores de CI_{50} de 2,08 μ M y 4,24 μ M (hasta 3 y 34 veces más activos que el As_2O_3 y que la CQ, respectivamente).

En cuanto a la actividad antimicrobiana los compuestos **117a**, **117c-g**, **117i-l**, **117p**, **118a**, **118d**, **118f-k** y **118o**, que mostraron actividad de amplio espectro, por ser activos contra las bacterias *G+* y *G-* evaluadas, además de ser activos contra la levadura *C. tropicalis*. Por su parte los compuestos **112l** y **112m** fueron activos contra las bacterias *S. aureus* (*G+*) y *E. coli* (*G-*). El compuesto **112k** resulto activo contra *C. tropicalis*.

Palabras claves: Malaria, actividad citotóxica, antimicrobiano, hemozoína, EDCI.

ABSTRACT

In this research, the synthesis of new compounds using the experimental approach of molecular variation and evaluation suggested a possible antimalarial, antineoplastic and antimicrobial activity. Synthesizing a series of benzoates describes substituted 4-[(E)-2-(methoxycarbonyl)-2-(7-chloroquinolil-4-ylthio)vinyl]phenyl (**112a-n**), based on a method of synthesizing three linear steps, where the key step involved the reaction of modified Steglich esterification, hydrochloride using 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDCI) as the activating agent. Yields between 30-60%. The strategy used to obtain derivatives 2-(5-nitrofuran/thiophen-2-yl)- *N*-phenyl-3H-benzo[d]imidazole-6-carboxamide (**117a-p**, **118a-p**), was based a linear two was based a linear two-step synthetic process, which involved an oxidative cyclocondensation reaction using as oxidising agent p-benzoquinone (BQ) and concluding synthesis with EDCI amides activation. Yields between 31-55%.

The assessment of antimalarial activity in vitro was demonstrated that derivatives **112a**, **112h**, **112j**, **112k**, **112l**, **117b**, **117d**, **117f**, **117i**, **117L**, **117n**, **117o**, **118d**, **118e**, **118g**, **118i** and **118n** showed potential activity leading to an inhibition of the formation of hemozoin a percentage higher than 70%. In vivo antimalarial assessment (*Test Peters*) found that the derivative **112c** was the most active of the first round with 29.83 ± 0.40 days post-infection survival and parasitemia of 1.00 ± 0.12 , while the **117d** derivative exhibited the best activity to 20.20 ± 1.95 days post-infection survival and parasitemia of 3.05 ± 0.09 , comparable to chloroquine (CQ).

With respect to the results of the effect of these derivatives on the viability and proliferation of the neoplastic cell lines Jurkat E6.1, HL60, the compounds of the **117** series were more active than the compounds of the **118** series, being more active in inhibiting the proliferation of acute myeloid leukemia cells HL60 cells of acute lymphoblastic leukemia, Jurkat E6.1. The most active of the **117** and **118**

series, derivatives were more toxic to cancer cells, indicating a reasonable level of selectivity

Derivatives **112a** and **112b** showed the highest growth inhibitory activity of leukemic HL60 cells after 24 h of treatment with IC₅₀ values of 2.08 μM and 4.24 μM (up to 3 to 34 times more active than As₂O₃ and the CQ , respectively).

Concerning the antimicrobial activity of compounds **117a, 117c-g,117i-l, 117p, 118a,118d,118f-k y 118o**, showing activity of broad spectrum , since it was active against bacteria G⁺ and G⁻ assessed, and be active against the yeast *C. tropicalis*. While compounds **112l** and **112m** were active against the bacteria *S. aureus* (G⁺) and *E. coli* (G⁻).The compound turned **112k** active against *C. tropicalis*.

Keywords: malaria, cytotoxic activity, antimicrobial, hemozoin, EDCI .

I. INTRODUCCIÓN

La búsqueda de nuevos medicamentos, es una actividad humana que de carácter interdisciplinario, en la que el químico medicinal es un contribuyente clave, que se apoya en la identificación de nuevos blancos terapéuticos, el desarrollo de nuevas herramientas y tecnologías, así como en el diagnóstico y necesidades de salud que ha requerido la sociedad. Uno de los retos a los que se enfrenta el químico medicinal, consiste en el diseño de moléculas con estructuras prototipos o compuestos líderes, con propiedades farmacológicas a partir de las cuales se efectúen modificaciones en el laboratorio, con la finalidad de potenciar su actividad, mejorar sus propiedades ADME (administración-distribución-metabolismo-excreción) y minimizar los efectos tóxicos. De manera ideal, también se persigue, que un mismo compuesto pueda tener efecto quimioterapéutico sobre varios blancos de acción farmacológica, lo que se conoce como drogas de acción múltiple. Enmarcado dentro de estas premisas, en esta investigación se propuso la síntesis de nuevos compuestos empleando la aproximación experimental de la *variación molecular*. Esta estrategia, desde el punto de vista químico-medicinal, considera grupos o plantillas moleculares que han demostrado ser claves para mantener la actividad frente a una determinada patología. En esta investigación, la estrategia se centró en el desarrollo de nuevos compuestos, a partir de grupos farmacofóricos asociados con propiedades antineoplásicas y antimaláricas. Con este propósito se aplican principios de bioisosterismo y modulación molecular que comprenden: isomerización, homología, alquilación, ramificación, desalquilación, saturación, insaturación, desplazamiento de una función, introducción, sustitución o eliminación de heteroátomos, así como la introducción de sistemas cíclicos y contracción o extensión de anillos, entre otros.¹

Apoyados en algunas analogías entre las células tumorales y los parásitos, tales como su alta velocidad de proliferación y la capacidad de eludir el sistema inmunológico,² y la capacidad de invadir otros tejidos, (metástasis o

diseminación, en neoplasia o malaria, respectivamente), el que en la metástasis la célula neoplásica tenga la capacidad de invadir varios sistemas tal como en la malaria por ejemplo, el parásito se disemine y viaje a través del cuerpo. Indiscutiblemente, hay diferencias como la permeabilidad de la pared celular, que marcará dramáticamente la posibilidad de alcanzar las dianas farmacológicas comunes. Sin embargo, con el desarrollo de nuevas tecnologías y las nuevas dianas farmacológicas que surgen del conocimiento de la biología de las células neoplásicas y por el creciente conocimiento de la bioquímica y la genómica del parásito, se espera encontrar nuevos blancos de acción que pudieran ser comunes a ambas enfermedades.

Recientes estudios cuantitativos de relación estructura química actividad (QSAR) han evidenciado que algunos fármacos tradicionalmente empleados en el tratamiento antineoplásico, pueden ser promisorias estructuras líderes para el desarrollo de nuevos fármacos antimaláricos y viceversa.³ En este sentido, el Laboratorio de Síntesis Orgánica de la Facultad de Farmacia UCV, ha venido desarrollando un área importante en el diseño racional de fármacos para la síntesis de nuevos agentes quimioterapéuticos basándose en los criterios de bioisosterismo y el conocimiento de plantillas farmacóforicas.

A continuación se presenta una revisión bibliográfica que recoge puntos importantes en el tratamiento de estas dos enfermedades:

I.1. El cáncer

El organismo de los mamíferos, incluido el de los humanos está compuesto por millones de células que tienen funciones específicas, que crecen y se dividen conforme a un ciclo particular. Cuando están envejecen, mueren y son reemplazadas por células nuevas. Sin embargo, este proceso controlado de división celular puede verse afectado y las células nuevas se siguen formando sin que el organismo las requiera. Este crecimiento celular indiscriminado es

característica común de las denominadas neoplasias o cáncer.⁴ El cáncer es un término genérico para un conjunto de enfermedades con etiología, evolución natural, pronóstico y tratamientos específicos que producto de la proliferación excesiva y descontrolada de células normales, provoca la formación de masas de tejido, conocidas como tumor.⁵ Cuando las células de estos tejidos son capaces de invadir los tejidos que le rodean o diseminarse a otros órganos se denominan tumores malignos, y a dicho proceso se le conoce como metástasis.

La última nota descriptiva de la Organización Mundial de la Salud (OMS) indican que 7,9 millones de las defunciones ocurridas en el año 2007 (13 %) se atribuyeron al cáncer,⁶ lo que representa una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial y un problema de salud pública importante. El cáncer causa la muerte de uno de cada cinco adultos en países desarrollados.

Los principales tipos de cáncer que contribuyen a la mortalidad general anual son los siguientes:⁴⁻⁶

- Pulmón (1,4 millones de defunciones)
- Estómago (866.000 defunciones)
- Hígado (653.000 defunciones)
- Colon (677.000 defunciones)
- Mama (548.999 defunciones)

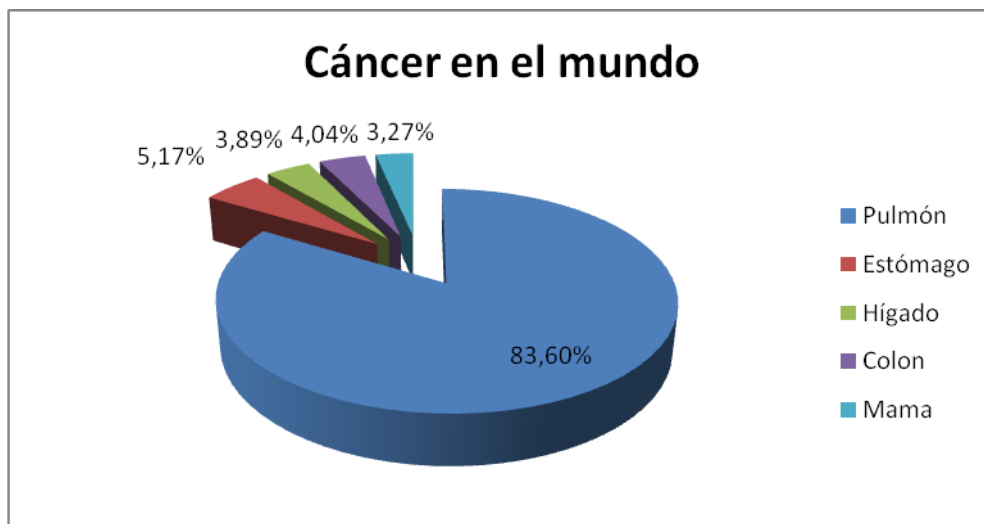


Gráfico 1. Distribución porcentual de los principales tipos de cáncer en el mundo. (Fuente OMS)

En Venezuela, el Ministerio del Poder Popular para la Salud, publicó en el año 2012, el anuario de mortalidad 2010⁷, en el cual refiere que 21.185 muertes ocurridas en 2010 se debieron a cáncer, lo que representa cerca del 16% del total de defunciones reportadas en ese período, siendo la patología más frecuente en cuanto a mortalidad el cáncer de cuello uterino y de mama en mujeres, mientras que en los hombres son el cáncer de próstata y de pulmón.⁷

La biología del cáncer es compleja. Se requiere de un control fino entre los mecanismos que permiten la formación de las células, su crecimiento, y por otro los mecanismos encargados de controlar su diferenciación y su período de vida útil. Esto nos remite a procesos importantes como el ciclo celular y la apoptosis. Por otra parte, cuando las células normales sufren procesos de diferenciación y pierden los controles anteriores, se transforman en cancerosas o malignas y dan lugar a la aparición de tumores, los cuales para proliferar adecuadamente, e invadir nuevos tejidos requieren de una vascularización adecuada, que le permita obtener los nutrientes para garantizar su desarrollo. La angiogenesis es el proceso que permite la formación de los nuevos vasos sanguíneos, que le garantizan la irrigación sanguínea y el aporte de los

nutrientes. Tomando en cuenta, la importancia de estos procesos cruciales para la supervivencia de las células malignas, y la relación estrecha con los objetivos de este trabajo, describiremos brevemente estos procesos.

I.1.1. Ciclo celular:

Se denomina ciclo celular a la capacidad de la célula para duplicar su material genético y posteriormente dividirse en células con idénticas características morfológicas y funcionales.⁴ En él se distinguen cuatro fases (figura 1):

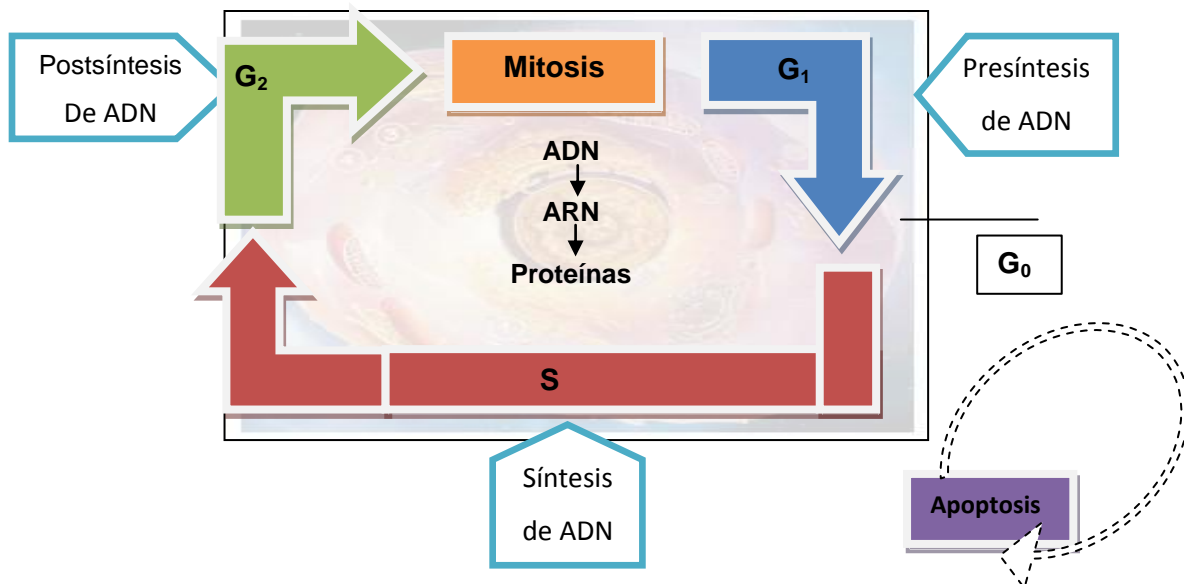


Figura 1. Ciclo celular

➤ **Fase G₁:** Tiempo que transcurre entre el final de una mitosis y el inicio de la fase S. En esta etapa la célula duplica su tamaño y se sintetizan las proteínas y los sustratos necesarios para la duplicación del ADN. Existe la posibilidad de

que la célula permanezca en una fase de reposo (G_0); en esta etapa se presenta un punto de control en el que la célula comprueba que se ha duplicado su masa y el material genético necesario para pasar a la siguiente fase.

➤ **Fase S:** En esta fase se lleva a cabo la duplicación del ADN.

➤ **Fase G_2 :** Se producen los sustratos necesarios para la división celular (mitosis). En esta fase existe un punto de control R- G_2 -M, en el cual la célula confirma la correcta duplicación del material genético.

➤ **Fase mitosis (M):** Se originan dos células idénticas. En esta fase existe otro punto de restricción (RM), que evita la formación de dos células independientes con errores en el fenotipo o el genotipo.

I.1.2. Apoptosis.

La apoptosis o muerte celular programada (*programmed cell death*, **PCD**) fue inicialmente descrita en 1972 por Kerry colaboradores,⁸ constituye un proceso fisiológico que juega un papel crítico en el desarrollo y mantenimiento de la homeostasis tisular de los organismos multicelulares.⁹ Así, durante el desarrollo se produce un exceso de células que la apoptosis es responsable de eliminar para mantener constante el número de células en cada tejido y contribuir a estructurar los órganos.¹⁰ De hecho, los primeros avances en la caracterización molecular del proceso de muerte apoptótica surgieron de los estudios genéticos en el nematodo *C. elegans*. La activación y regulación de la apoptosis en organismos superiores depende de los correspondientes homólogos a los encontrados en *C. elegans*, pero con un grado de complejidad mayor.¹¹

➤ **Cambios morfológicos y moleculares característicos de la apoptosis.**

Durante la apoptosis, se dan una serie de cambios en la estructura celular que afecta dramáticamente a la morfología de la célula. Algunos de ellos son: la condensación de la cromatina nuclear, la reducción del tamaño celular y la aparición de protuberancias en la membrana plasmática (*blebbing*).^{8,12} Asimismo, la apoptosis cursa con una serie de procesos bioquímicos que le caracterizan, como por ejemplo la degradación del ADN nuclear, debido a la activación de endonucleasas que rompen los fragmentos internucleosomales de 80-200 pares de bases,¹³ o cambios en la distribución de la fosfatidilserina (PS) normalmente presente en la cara interna de la membrana plasmática, pero que durante la apoptosis se expone en la superficie celular.¹⁴ Además, durante la apoptosis, la endonucleasa *CAD* (*caspase-activated DNase*) se libera de su inhibidor *iCAD* o *DFF* (*DNA fragmentation factor*), al que está unida, gracias a que éste es procesado por las caspasas (principales efectoras de la apoptosis) permitiendo la liberación de la endonucleasa activa y provocando la característica rotura internucleosomal del ADN.¹⁵⁻¹⁷ Finalmente, el contenido celular se empaqueta en los denominados “cuerpos apoptóticos” que envían señales a sus células vecinas y a los macrófagos para ser reconocidas y fagocitadas. Una de estas señales es la fosfatidilserina que se expone en la superficie de la célula durante la apoptosis.¹⁸

➤ **Vías apoptóticas y su regulación**

El fenómeno apoptótico se puede activar a partir de eventos iniciadores que se dan tanto en el exterior como en el interior celular. Así, se han descrito dos vías apoptóticas principales: la *vía extrínseca* o de receptores de muerte, y la *vía intrínseca* o mitocondrial.¹⁹ Ambas rutas de señalización convergen, finalmente, en una maquinaria común constituida por una familia de cisteín

proteasas llamadas *caspasas* que se consideran los efectores centrales del proceso apoptótico.

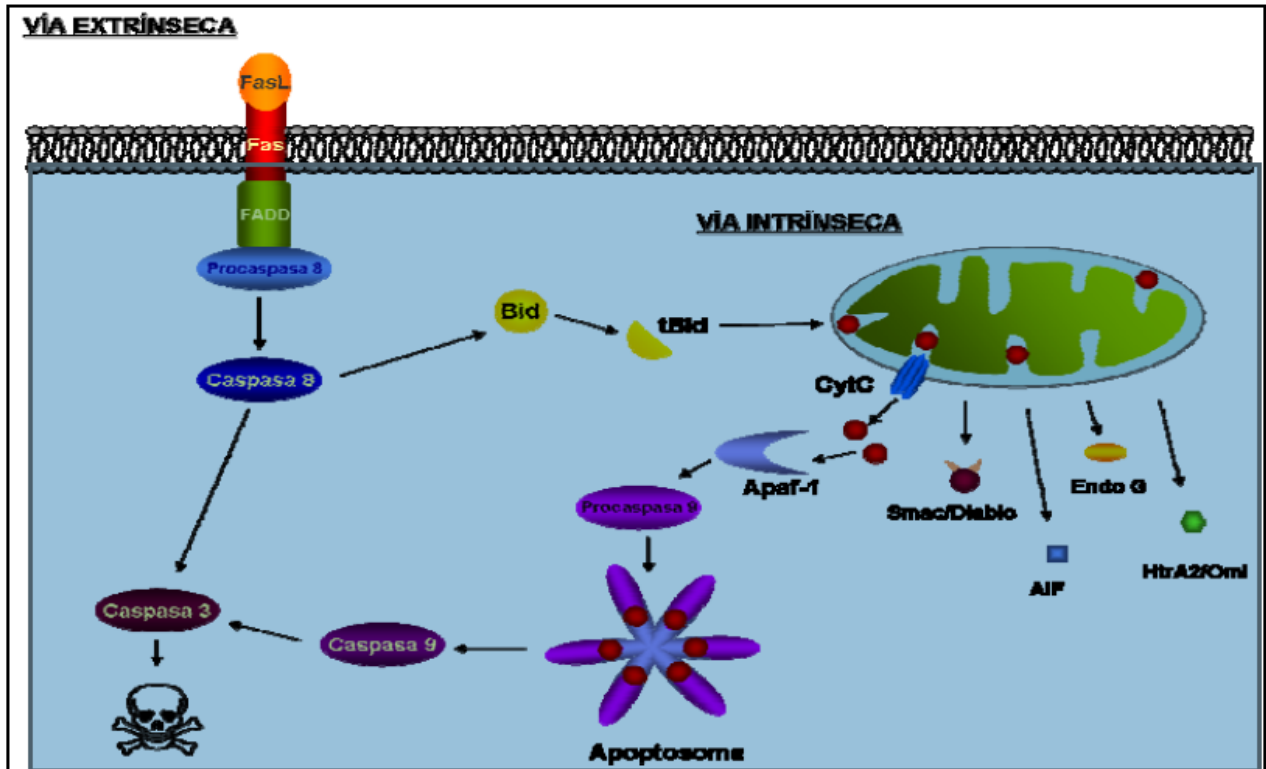


Figura 2. Vías Apoptóticas: Intrínseca y Extrínseca.¹⁹

En la vía intrínseca la mitocondria es el eje central de la muerte celular, caracterizándose por la activación de algunas proteínas de la familia de la Bcl-2 (Bax, Bak y BH3), la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial, la formación de poros de permeabilidad mitocondrial (MMP), la liberación del citocromo c, la liberación del segundo activador de caspasas derivado de la mitocondria (SMAC/DIABLO), la liberación del factor inductor de la apoptosis independiente de caspasas (AIF), la liberación de la endonucleasa G, la activación de caspasa 9, 3 y 7, la formación cuerpos apoptóticos, la fragmentación del ADN, entre otros. En la Vía extrínseca, la apoptosis está mediada por los llamados “receptores de la muerte” pertenecientes a la

superfamilia de los receptores del factor de necrosis tumoral (TNF), entre los que se encuentran: el TNFR1, receptor del TNF; el *FasR* (CD95 o APO-1), receptor del *Fas* ligando y los TRAIL-RI (DR4) y TRAIL-RII (DR5), receptores del ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF (TRAIL). Estos receptores al ser activados, inducen apoptosis mediada por la activación inicial de la caspasa 8.

La apoptosis es un proceso altamente controlado. Cada paso en la cascada apoptótica está regulado por moléculas antiapoptóticas que reprimen la activación de la cascada señalizadora.²⁰ La proteína Bcl-2 o la familia de proteínas IAP son ejemplos de este tipo de reguladores negativos.

➤ **Efectores esenciales de la apoptosis: las caspasas**

Las caspasas son una familia de cisteín proteasas aspártico-específicas que actúan como reguladores críticos del proceso de muerte celular y constituyen la principal maquinaria apoptótica efectora.²¹ Estas proteínas sobre-expresadas en mamíferos son capaces de inducir por sí solas el proceso apoptótico.²² Las caspasas son sintetizadas como formas inactivas. Así, todas ellas poseen un prodomino seguido de un dominio activo y otro inhibidor que, al escindir-se por un proceso autocatalítico, convierte a la procaspasa en su forma activa.²³⁻²⁵

Se han identificado hasta 14 caspasas en mamíferos, 11 de las cuales corresponderían a proteínas humanas.^{21, 26, 27}

Las caspasas se pueden clasificar en tres grupos según su función:

- *Caspasas inflamatorias*. Este grupo incluye a las caspasas-1, 4, 5, 11, 12, 13 y 14, que están implicadas en inflamación mediando la maduración de citoquinas pro-inflamatorias.

- *Caspasas apoptóticas iniciadoras*. Incluye las caspasas-2 y 9, que median la interacción con moléculas adaptadoras localizadas corriente arriba. Estas caspasas iniciadoras procesan y activan a las proteasas efectoras.²⁷
- *Caspasas apoptóticas ejecutoras*. A este grupo pertenecen las caspasas-3, 6 y 7; y se caracterizan por la presencia de un prodominio corto. Proteolizan múltiples sustratos celulares que desencadenan los cambios morfológicos y moleculares característicos de la apoptosis.²⁸

La potente actividad proapoptótica de las caspasas debe mantenerse inhibida para que las células sanas puedan sobrevivir. Se han identificado muchos reguladores negativos de las caspasas, tanto en virus como en humanos. Algunos de estos inhibidores, tales como *crmA*, *p35*, *v-FLIP* e *IAPs*, han sido utilizados por los virus para evitar la apoptosis inducida por el hospedador como mecanismo de defensa.²⁹

Las proteínas *IAPs* (del inglés *inhibitor apoptosis proteins*), se consideran los reguladores negativos de caspasas más importantes. Hasta la fecha, se han identificado ocho *IAPs* en humanos: incluyendo XIAP, c-IAP1, c-IAP2 y Survivina. Estas proteínas son capaces de inhibir la apoptosis inducida por una gran variedad de estímulos a través de una unión directa a ciertas caspasas y su consiguiente inhibición.³⁰ Un bloqueo de estas proteínas induce la activación de la apoptosis. Así, las proteínas proapoptóticas *Smac* (*second mitochondria-derived activator of caspases*) y *HtrA2/Omi*, que se liberan de la mitocondria bajo un estímulo apoptótico, promueven la activación de las caspasas inhibiendo a las proteínas *IAPs*.^{31,32}

➤ **Receptores de muerte: familia TNF-R**

Los receptores de muerte se localizan en la superficie celular y pueden inducir proliferación, supervivencia, diferenciación o muerte, dependiendo de las

señales que reciben.^{32,33} Su función proapoptótica reside en la presencia de un dominio de muerte (*death domain, DD*) en la región intracelular, que es esencial para inducir apoptosis. Estos receptores, como TNF-R o CD95, se activan por un grupo de ligandos que están relacionados estructuralmente entre sí, y que pertenecen a la familia de ligandos *TNF* (factor de necrosis tumoral).

➤ **Proteínas adaptadoras**

Las proteínas adaptadoras conectan los receptores de muerte con las caspasas y con miembros de la familia Bcl-2. Estas asociaciones entre proteínas adaptadoras, caspasas y receptores como los miembros de la familia TNF-R, están característicamente mediadas por el dominio de muerte (*DD*), el dominio efector de muerte (*DED*) y el dominio de reclutamiento de caspasas (*CARD*).^{34,35} El *DD* se encuentra en la región citoplasmática de muchos de los receptores de la familia TNF-R, así como en las moléculas adaptadoras, tales como FADD/MORT1 (*Fas-associated death domain protein/mediator of receptor-induced toxicity*), TRADD (*TNF-R1-associated death domain protein*), y RIP (*receptor-interacting protein*). La interacción entre los *DD* del receptor y el adaptador, permite el reclutamiento y agregación de las caspasas (mediado por los dominios *DED* y *CARD* de la molécula adaptadora) y su consecuente activación³⁶⁻³⁹.

Las *vías intrínsecas*, se inician por diversos estímulos apoptóticos que provienen del interior celular y convergen en la mitocondria. La mitocondria, además de ser un importante orgánulo para la producción de energía y la homeostasis de Ca^{2+} , participa en muerte celular como regulador central de las vías apoptóticas intrínsecas. La permeabilización de su membrana externa (*MOMP, mitochondrial outer membrane permeabilization*) es un evento crucial en estas vías^{40,41} y está principalmente mediado y controlado por miembros de la familia *Bcl-2*^{41,42} Una vez se induce la *MOMP*, se precipita el proceso de

muerte celular a través de la liberación de moléculas proapoptóticas del espacio intermembrana.^{43,44}

Entre los *factores apoptogénicos* que se liberan al citosol, se incluyen el *citocromo c*,^{45,46} un componente de la cadena de transporte electrónico,⁴⁴ *HtrA2/Omi*, una serín proteasa mitocondrial, *Smac/Diablo* (*Second mitochondria derived activator of caspase*,⁴⁷ *AIF* (*Apoptosis Inducing Factor*,^{48,49} y la *endonucleasa G*.⁵⁰ *AIF* se transloca al núcleo, donde desencadena cambios nucleares independientes de caspasas,⁵¹ causando condensación de la cromatina nuclear y fragmentación de ADN.⁴⁹ La *endonucleasa G* induce fragmentación del ADN internucleosomal, también de un modo independiente de la activación de las caspasas.^{52,53} *Smac/Diablo* activa apoptosis neutralizando la actividad de las proteínas inhibitoras de apoptosis, las proteínas *IAPs*. *HtrA2/Omi* también actúa uniéndose a las proteínas *IAP* e inhibiendo su acción.

La salida de *citocromo c* de la mitocondria, se considera como el punto de no retorno del proceso apoptótico. Una vez liberado, el citocromo *c* citosólico se une a la proteína *Apaf-1* (*apoptosis protease-activating factor 1*) aumentando la afinidad de ésta por el ATP.⁵⁴ La unión del nucleótido al complejo formado por *Apaf-1* y *citocromo c*, induce la oligomerización de *Apaf-1*⁵⁵ cuyo dominio *CARD* queda expuesto provocando el reclutamiento de la *procaspasa-9* y la formación del complejo proteico llamado “*apoptosoma*”. Dentro del apoptosoma, se activa la caspasa-9, permitiendo el procesamiento de la caspasa ejecutora caspasa-3 que procesa a su vez importantes sustratos intracelulares.⁵⁶

La apoptosis es un proceso esencial para los organismos multicelulares que está implicado en un gran número de patologías. Así, su desregulación puede llevar a desordenes patológicos,⁵⁷ lo que la convierte en una diana potencial para el tratamiento de varias enfermedades. Un incremento en la apoptosis, puede estar asociado a enfermedades como la isquemia o trastornos

neurodegenerativos. Por otro lado, una disminución de su activación, se relaciona frecuentemente con varios tipos de cáncer o enfermedades autoinmunes.

Una característica común de la mayoría de las células cancerosas, es su resistencia adquirida a sufrir apoptosis, ya sea como consecuencia de un bloqueo en los sensores o en las cascadas de señalización apoptótica, como por ejemplo, mutaciones en el gen supresor de tumores, p53, o por una sobre-activación de las señales de supervivencia celular debida a factores extracelulares como IGF-1/2 o IL-3,⁵⁹ señales intracelulares que provienen del gen Ras, por pérdida del supresor de tumores pTEN⁶⁰ o sobreexpresión de inhibidores apoptóticos como Bcl-2.^{61,62} De este modo, la identificación de moléculas que puedan activar de manera directa procesos de muerte en células tumorales, podría facilitar el desarrollo de nuevos tratamientos contra el cáncer.⁶³

I.1.3. Angiogénesis

El termino angiogénesis literalmente significa formación de vasos sanguíneos. Es un proceso importante que acompaña y favorece enfermedades neoplásicas y no neoplásicas. Estos vasos sanguíneos son un componente importante del estroma tumoral y por lo tanto la angiogénesis es un factor predictor del pronóstico en muchas neoplasias humanas⁶⁴ ya que existe correlación entre el número de vasos sanguíneos y la densidad de los mismos con los estados metastáticos, tamaño del tumor, tipo histológico y por ende el grado de malignidad tumoral.

Se debe distinguir entre dos procesos:

1.-Vasculogénesis: Relacionado con la formación de vasos sanguíneos provenientes de células endoteliales diferenciadas, que proliferan simultáneamente con el crecimiento del cuerpo.

2.-Angiogénesis: La cual viene dada por la formación de nuevos vasos a partir de capilares ya existentes.

Existen 12 proteínas antigénicas reconocidas en la actualidad dentro de las cuales se puede mencionar el factor de crecimiento básico de fibroblastos (Bfgf) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). Estos factores atraen a las células endoteliales de los capilares cercanos hacia el tumor y estimulan su proliferación.⁶⁵ Estos nuevos vasos formados están presentes en gran densidad tanto dentro como en los alrededores de la masa tumoral y presentan alta permeabilidad, siendo entonces una vía para la diseminación de células tumorales a todo el organismo.

Por su importancia para la nutrición y desarrollo del tumor y la diseminación de las células tumorales, este proceso de vascularización, representa un blanco potencial para la terapia contra el cáncer.

La importancia de este proceso para la evolución de la enfermedad neoplásica ha estimulado la investigación hacia el desarrollo de esta etapa como blanco terapéutico.^{65,66}

I.1.2. Causas y factores de riesgo para el desarrollo de cáncer.

La enfermedad cancerosa como cualquier otra, es el resultado de la interacción de un agente causal y la reacción viva del organismo. Es una enfermedad crónica y curable en un elevado número de casos.

Existen cuatro teorías clásicas que intentan explicar el origen del cáncer:⁴

1. Mutación de una célula somática, formulada por Bauer en 1927, modo habitual de comenzar todos los tumores malignos.
2. Diferenciación aberrante por alteraciones en la regulación genética.
3. Actividad viral.
4. Selección celular de células previamente predestinadas a ser malignas.

La transformación de una célula normal en una tumoral es un proceso que abarca varias fases y suele consistir en una progresión de una lesión precancerosa a un tumor maligno. Esas modificaciones son el resultado de la interacción entre los factores genéticos y tres categorías de agentes exógenos:^{1,5}

1. Carcinógenos físicos, como la luz ultravioleta y la radiación ionizante;
2. Carcinógenos químicos, como el asbesto, benceno o el humo del tabaco,
3. Carcinógenos biológicos, como las infecciones causadas por determinados virus, bacterias o parásitos.

Dentro de los factores endógenos más importantes en el desarrollo de la enfermedad cancerosa se incluyen:

1. Factores hereditarios.
2. Factores inmunitarios, que puede explicar la mayor frecuencia de desarrollo de tumores en los individuos trasplantados que son tratados con sustancias que le suprimen la inmunidad, y en los pacientes con VIH.
3. Factores hormonales, específicamente en el grupo de tumores hormono-dependientes como: el cáncer de mama, adenocarcinoma de endometrio, cáncer de próstata entre otros.
4. Factores nutritivos relacionados con la alimentación cuya importancia es creciente.

El envejecimiento es otro factor fundamental en el desarrollo de cáncer, probablemente porque con la edad aumenta la acumulación de factores de riesgo de tipos específicos de cáncer.

En países en vía de desarrollo el alto consumo de tabaco, alcohol y la baja ingesta de frutas y hortalizas, así como las infecciones por virus de la hepatitis B, de la hepatitis C, y por virus del papiloma humano (VPH) son los principales factores de riesgo. En los países desarrollados, el consumo de

tabaco y alcohol, el exceso de peso y la obesidad son las principales causas de cáncer.⁵

I.1.3. Tratamientos

El conjunto de tratamientos empleados contra el cáncer incluyen la cirugía, radioterapia, trasplante de medula ósea y quimioterapia.

I.1.3.1.Cirugía

Es el método más empleado para aquellos tumores pequeños y localizados en un lugar concreto. Para que sea completamente eficaz se precisa extirpar parte del tejido que rodea el tumor para asegurar así que todas las células cancerosas han sido extirpadas. Si el cáncer se ha extendido a otras zonas, a través de la sangre o de la linfa, se realizan otros tratamientos, bien sean complemento a la cirugía o únicos y distintos a ella.⁶⁷

I.1.3.2.Radioterapia

La radioterapia emplea partículas de alta energía capaces de penetrar los tejidos, generadas a través de un acelerador lineal, y la dirección de las mismas hacia el lugar concreto de aplicación. Se fundamenta en el hecho de que las células cancerosas son especialmente sensibles a la radiación. La radioterapia utiliza partículas similares a los rayos X, empleadas para hacer una radiografía normal, pero a dosis mayores.^{4,5}

La radioterapia puede utilizarse como tratamiento único en aquellos casos en que los tumores sean especialmente sensibles a la radiación y no haya metástasis.

Puede aplicarse previamente a la cirugía con el fin de disminuir el tamaño del tumor y facilitar su extirpación.

El tratamiento conjunto de radioterapia y quimioterapia se utiliza con frecuencia. A veces, el empleo de quimioterapia antes de la radioterapia hace a las células cancerosas más sensibles a la radiación. Otras terapias emplean la radioterapia después de la quimioterapia para asegurar la eliminación de todas las células cancerosas.

I.1.3.3. Trasplante de médula ósea

Se realiza cuando se ha producido un daño en la médula ósea que le impida realizar las funciones que, antes de la quimioterapia, estaba realizando. Estas funciones consisten en la formación de las células sanguíneas, proceso fundamental para la vida humana.⁶⁵

La quimioterapia se administra para destruir las células cancerosas pero, al mismo tiempo, puede dañar la médula ósea y otros órganos. Por esto generalmente no se suelen utilizar dosis muy elevadas.

I.1.3.4. Quimioterapia

Para el tratamiento del cáncer existe una variedad de medicamentos los cuales deben ser conocidos ampliamente para su adecuada formulación y una dosificación que permita la menor cantidad de efectos adversos. Los diferentes grupos de antineoplásicos pueden actuar sobre una o varias fases del ciclo celular o sobre los mecanismos de control de la proliferación celular. Los grupos más importantes son los siguientes:

➤ **Citostáticos:**

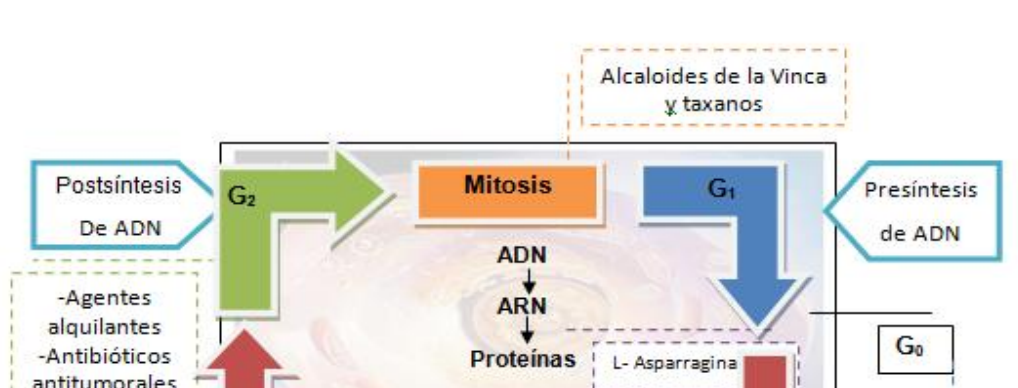


Figura 3. Ciclo celular y fase de actuación de los citostáticos (modificado de Salinas P.⁴)

Los citostáticos clásicos son fármacos con diferentes mecanismos de acción, que tienen la capacidad de alterar el ciclo celular provocando la muerte de la célula por disminución de la capacidad de proliferación.^{5,65} Este efecto no es selectivo hacia la célula tumoral; por lo que se producirá toxicidad sobre los tejidos del organismo que se encuentran en rápido crecimiento: La piel (alteraciones cutáneas), faneras (alopecia), mucosas (úlceras bucales, estomatitis), médula ósea (anemia y leucopenia), y en las células germinales (esterilidad transitoria).

Se emplean en el tratamiento de los tumores malignos diseminados, como las leucemias, los linfomas y el mieloma, y en algunos casos de tumores malignos localizados, en este caso frecuentemente asociados a cirugía o radioterapia.¹⁷

Clasificación de los fármacos citostáticos:^{4, 5,65}

- **Alquilantes:**

Los agentes alquilantes se caracterizan por ser compuestos altamente electrofílicos que reaccionan con nucleófilos endógenos formando enlaces covalentes. Dada su elevada reactividad, muestran escasa selectividad a nivel celular ejerciendo su acción durante todo el ciclo celular, siendo más activos sobre las células en rápida división y es por esta razón que las células cancerosas son más sensibles. Actúan fundamentalmente sobre el final de la fase G₁ y la fase S. No son activos sobre las células en reposo (G₀).

El enlace covalente constituye la interacción de mayor fortaleza en la escala de energía entre dos moléculas, con valores que oscilan entre 350-450 KJ/mol para un enlace sencillo y alrededor de 650 KJ/mol para un enlace doble. Debido a la alta estabilidad, este enlace puede considerarse prácticamente irreversible con implicaciones importantes a escala biológica.⁶⁶

A continuación se presentan algunas estructuras de agentes alquilantes:

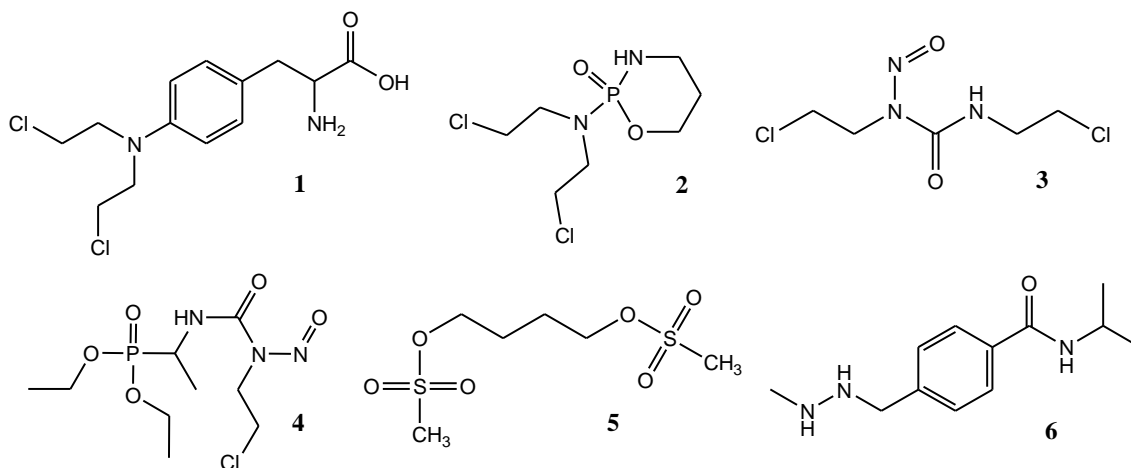
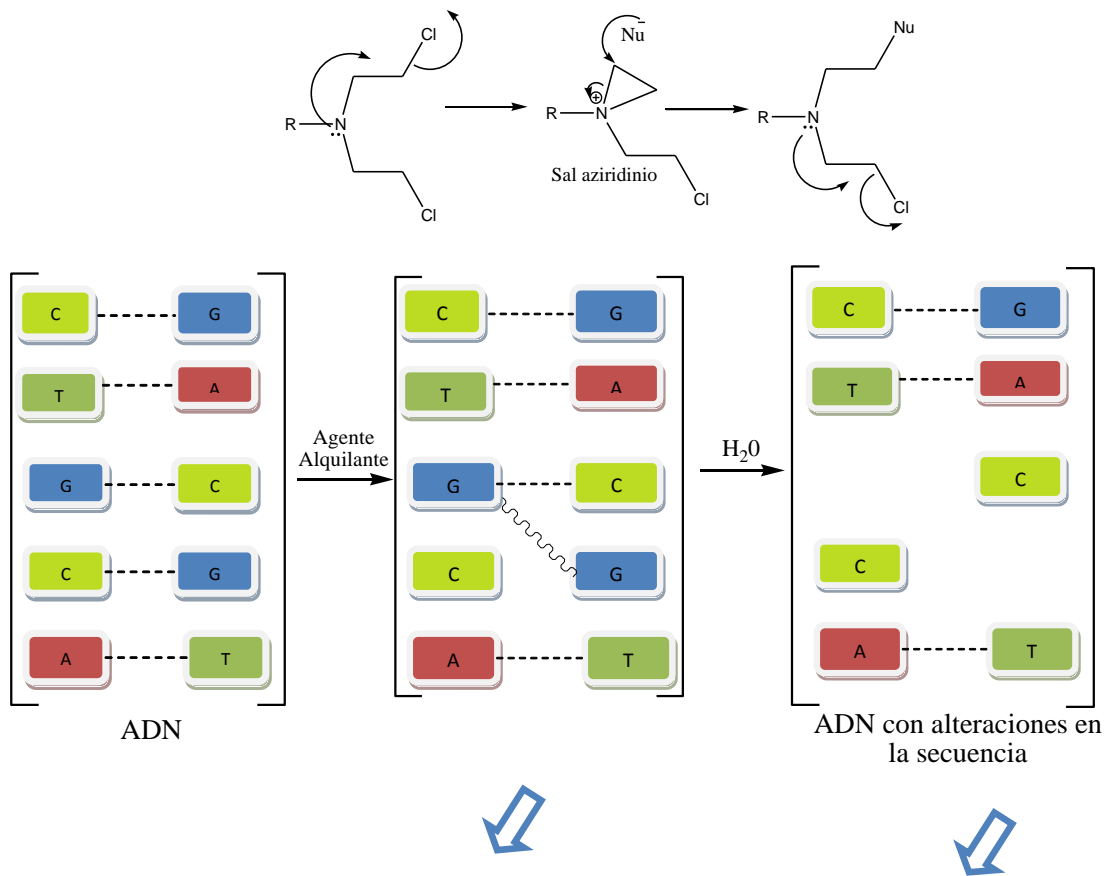


Figura 4. Estructura química de algunos agentes alquilantes: Mostazas nitrogenadas; **1.** Melfalán, **2.** Ciclofosfamida, Nitrosureas; **3.** Carmustina, **4.** Semustina, otros; **5.** Busulfano, **6.** Procarbacin.

Ejemplo de ello, las mostazas nitrogenadas (**1** y **2**), que deben su efecto a la alteración de la secuencia del ADN como resultado de la formación de

enlaces covalentes cruzados con un resto de guanina de cada una de las hebras del ADN, y la posterior hidrólisis de los restos de desoxiguanosina.⁶⁸ Esto trae como consecuencia la pérdida de ciertas bases nitrogenadas, interrumpiendo la secuencia del ADN produciendo una duplicación errónea, que conlleva a la síntesis de proteínas no funcionales (figura 5).



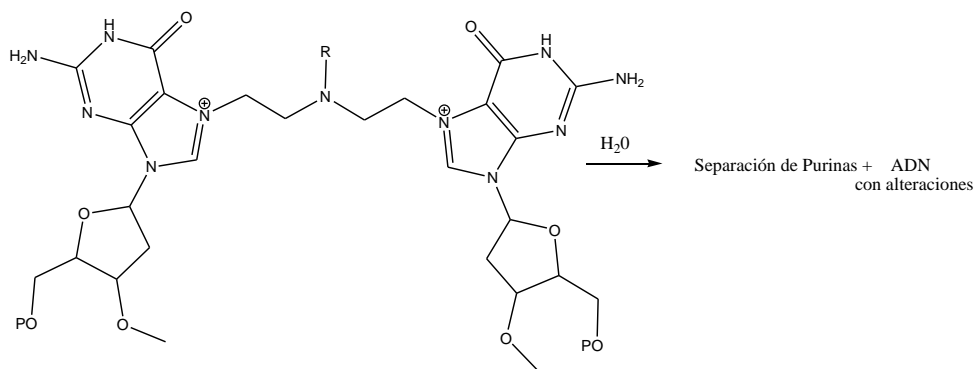


Figura 5. Mecanismo de acción de las mostazas nitrogenadas.

Con el fin de disminuir la reactividad de las mostazas nitrogenadas se sintetizaron análogos en los que es posible la deslocalización del par de electrones del átomo de nitrógeno sobre algún grupo funcional adecuado (anillos aromáticos, éster fosfórico, un grupo carbamato, entre otros).

La incorporación de aminoácidos, como en el caso del melfalán **1** donde se introdujo la fenilalanina, produjo mayor selectividad hacia las células cancerosas, probablemente debido a la existencia de mecanismos de transporte específicos para aminoácidos, importantes para la síntesis de proteínas que están en proceso de división.

Las *N*-cloroetil-*N*-nitrosoureas constituyen otro grupo de agentes alquilantes (ejemplo carmustina **3** y semustina **4**). Este tipo de compuestos son metabolizados rápidamente en el organismo formando un isocianato, que con relativa facilidad se transforma en un catión 2-cloroetilo capaz de formar enlaces covalentes cruzados con el ADN de manera similar a las β -haloalquilaminas.⁶⁹ Además son responsables de procesos inespecíficos de carbamoilación (figura 6).

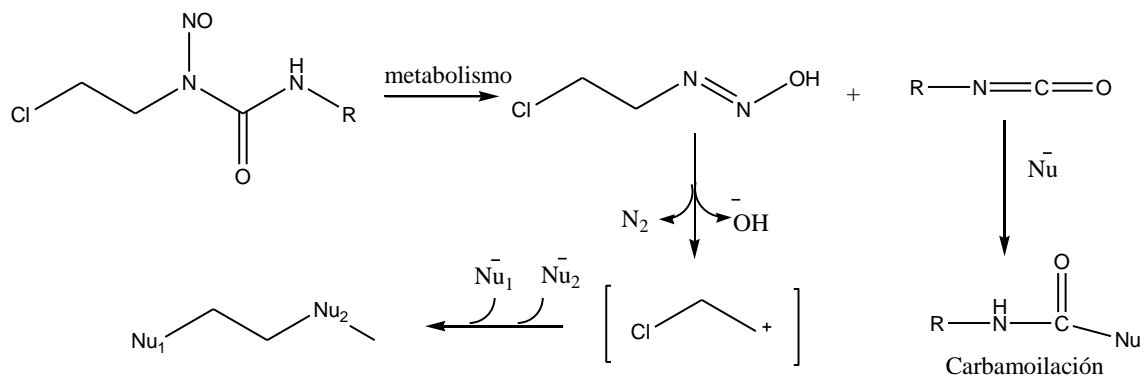


Figura 6. Metabolismo de las N-nitrosoureas.

Una familia de compuestos que no tienen relación estructural con los fármacos anteriores pero que presentan mecanismos de acción relacionados, son los complejos de platino, como el cis-diclorodiaminoplatino(II) (cisplatinato **7**). La labilidad de los ligandos cloro en cisplatinato (figura 7) da lugar a dos posiciones de coordinación por parte del átomo de nitrógeno N⁷ de los restos de guanina, alquilando de este modo el ADN.⁷⁰

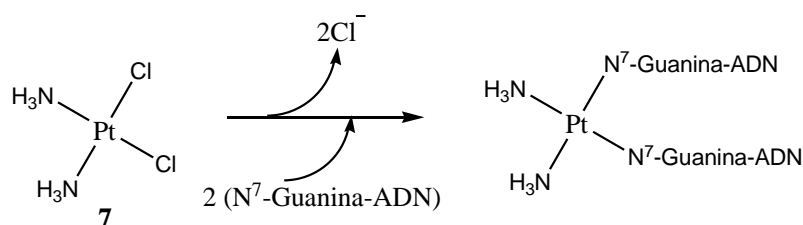


Figura 7. Estructura química de cisplatinato y mecanismo de acción con el ADN.

Sin embargo, se ha reportado resistencia a los fármacos alquilantes. Se postulan 3 posibles mecanismos para explicar esta resistencia:

- Aumento de la capacidad de la célula para reparar los daños producidos en el ADN.
- Inactivación de los fármacos por conjugación con glutatión.

- Aumento intracelular en la actividad de la aldehído–deshidrogenasa, enzima necesaria para la producción de metabolitos no activos.

- **Antibióticos:**

Son sustancias naturales producidas fundamentalmente por hongos, capaces de alterar el crecimiento de células vivas. Dentro de esta clase encontramos la mitomicina, bleomicina, antraciclinas, actinomicina D y calimecheamicinas o enodíinos. Estos compuestos actúan sobre las diferentes fases del ciclo celular.^{4,8}

- **Mitomicina:**

La mitomicina C **8**, contiene tres grupos estructurales reactivos: La quinona, cuya reducción metabólica genera superóxidos que causa el daño celular, la aziridina y el carbamato.⁷¹ Es un antibiótico que actúa como antineoplásico que da lugar a la alquilación del ADN por un mecanismo propuesto que implica la formación de un sistema indólico, por medio de una reducción metabólica de la quinolona y la posterior pérdida de metanol que da lugar a la formación de una semiquinona electrófila; además genera intermediarios del tipo carbamato que puede formar enlaces covalentes con ciertas bases del ADN.

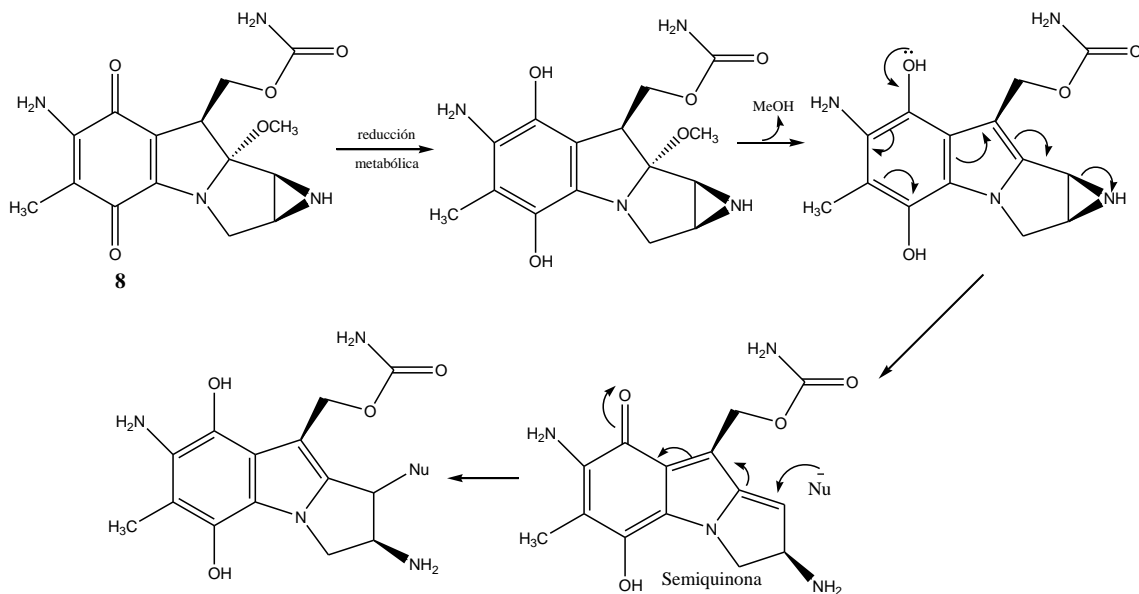


Figura 8. Estructura química y activación metabólica de mitomicina C.

- **Bleomicina:**

Son un grupo de antibióticos del tipo glicoproteínas aisladas de ciertas especies de *Streptomyces*. Se ha postulado que actúan por un mecanismo radicalario que, por reacción con oxígeno, forman peróxidos responsables de dañar irreversiblemente la estructura del ADN.⁷²

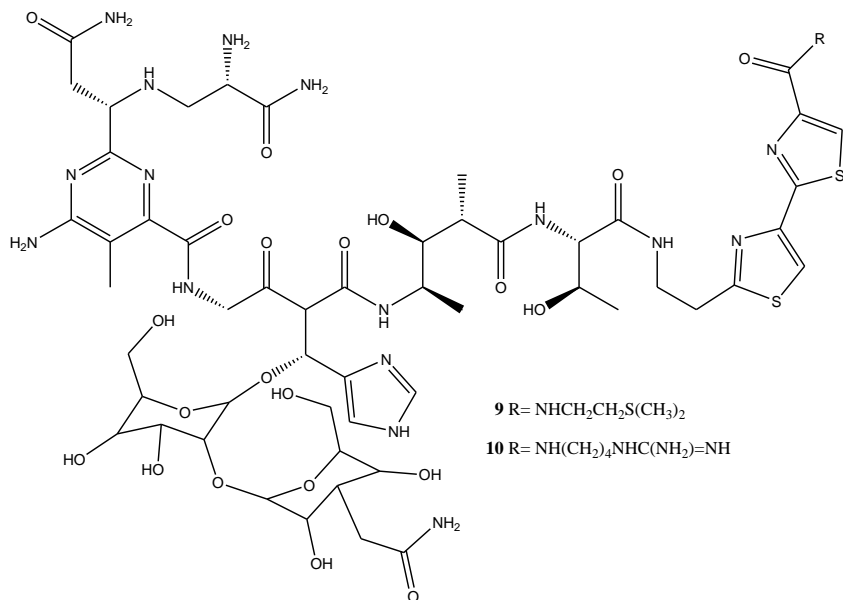


Figura 9. Estructura química de bleomicina: bleomicina A₂ **9**, bleomicina B₂ **10**

Este fármaco es empleado en carcinomas de las células escamosas, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin y cáncer testicular.

- **Antraciclinas:**

Producidas por el hongo *Streptomyces*, presentan un núcleo plano con 4 anillos con grupos quinona e hidroquinona que les permite dar o aceptar electrones, y cadenas laterales de aminoglucósidos que son esenciales para la actividad citotóxica (figura 10).

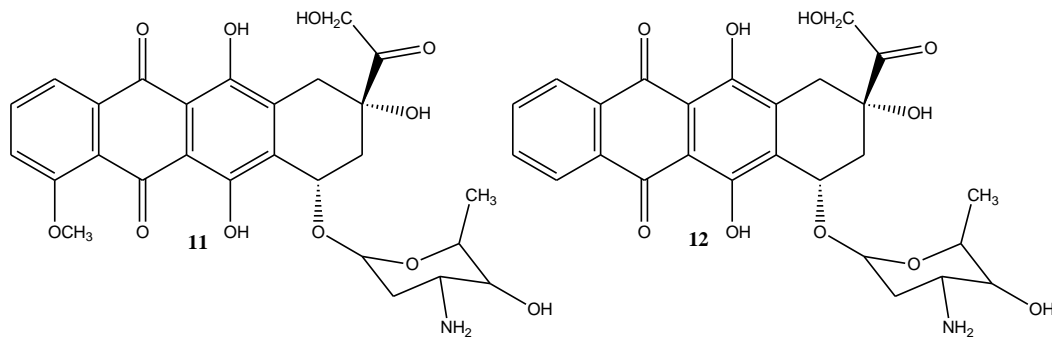


Figura 10. Estructura química de antraciclinas: adriamicina **11** e idarubicina **12**

Su mecanismo de acción parece ser múltiple. Se postula que el anillo plano se intercala en el ADN estabilizándose por interacciones electrostáticas de las cadenas de aminoglucósidos con el ADN, produciendo alteraciones de la replicación y de la transcripción.⁷³

Por otro lado, estos compuestos inhiben la topoisomerasa II, enzima encargada de mantener la estructura terciaria del ADN dando lugar a la ruptura del mismo, alterando así los procesos de reparación. Su efecto antitumoral es específico de ciclo e inespecífico de fase, aunque máximo sobre la fase S del ciclo celular.

- **Actinomicina D:**

Fue el primer antibiótico que mostró cierta actividad antineoplásica, pero no se utiliza normalmente con ese fin, debido a que es altamente tóxico y provoca daño al material genético. Presenta un mecanismo de acción dependiente de la intercalación del fármaco entre las dos cadenas del ADN, que a dosis altas impide la correcta replicación y tanto a altas como bajas dosis altera la síntesis del ARN.⁷⁴

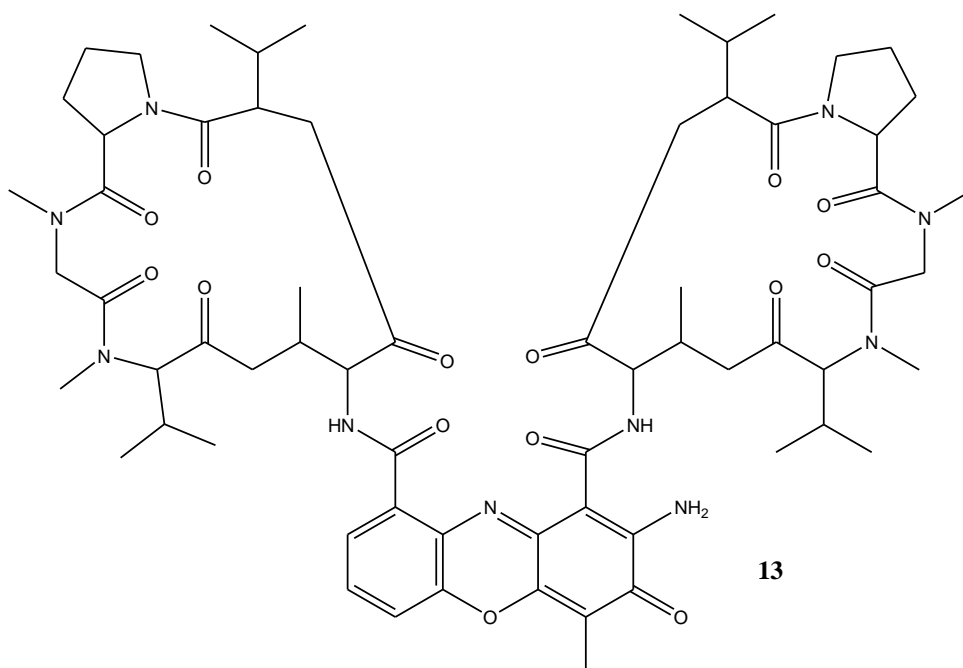


Figura 11. Estructura química de actinomicina D.

- **Enodiínos:**

Las calicheamicinas son miembros de la familia de antibióticos enodiínos, antitumorales muy tóxicos. Se propone que el proceso comienza con la activación mediante el ataque nucleofílico sobre la unidad trisulfuro, seguido de la adición conjugada y cicloaromatización de Bergman para generar un dirradical 1,4-bencenoide de gran reactividad, que actúa rompiendo las hebras del ADN (figura 12).⁷⁵

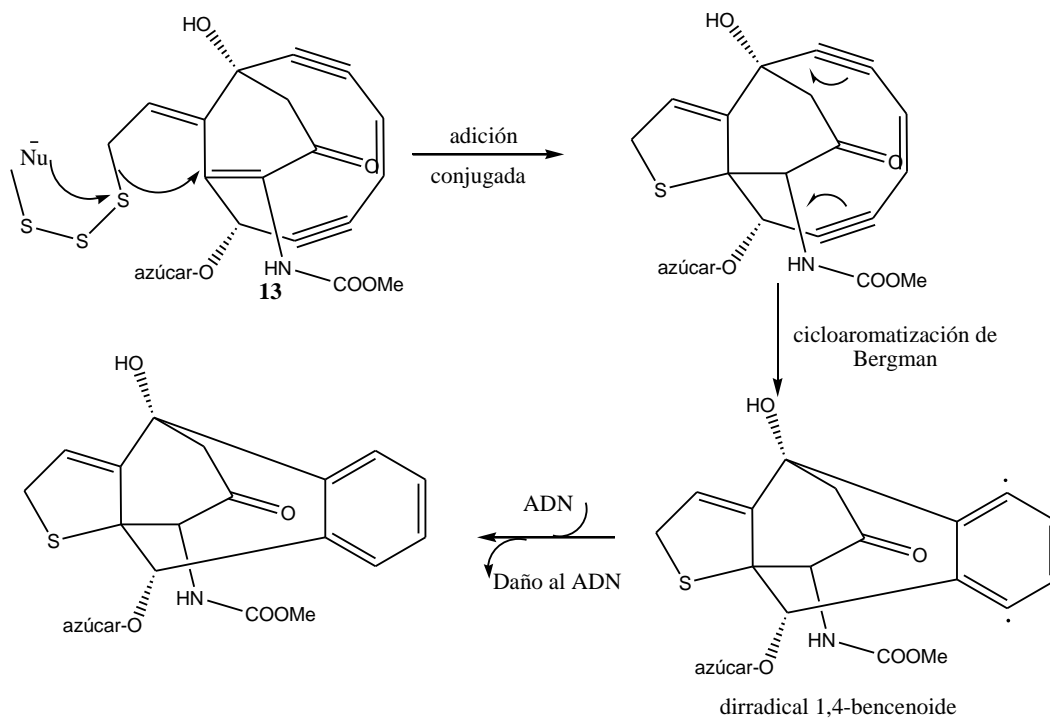


Figura 12. Estructura química de enediinos y activación metabólica.

Se han aislado otros productos naturales relacionados con la especie dirradical bencenoide, donde el grupo desencadenante de la activación es un epóxido, como la dinemicina A **14**.

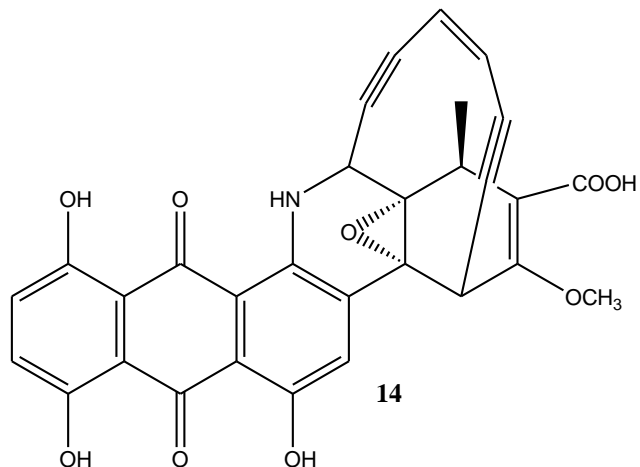


Figura 13. Estructura química de dinemicina A **14**.

Dos agentes intercalantes que se encuentran en la fase II de su desarrollo como antineoplásicos son la mitoxantrona y el bisantreno. Estos compuestos han demostrado una toxicidad relativamente baja, por lo cual se espera su futura introducción como fármacos.⁷⁶

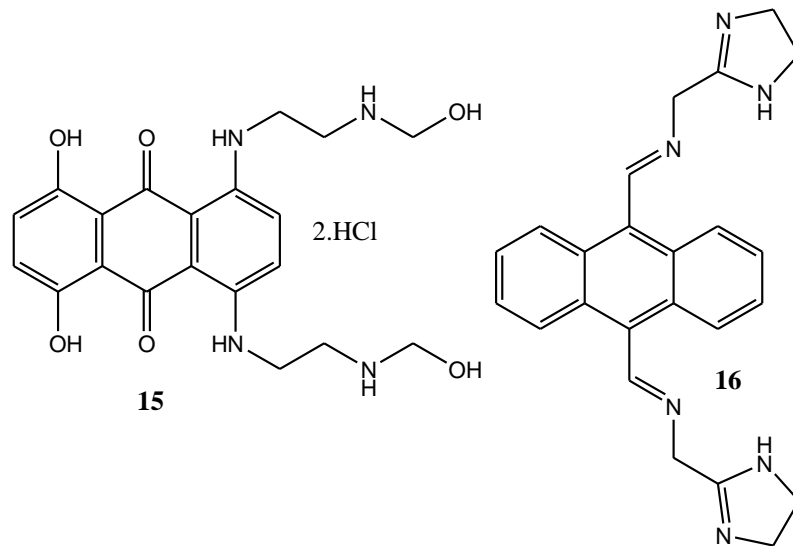


Figura 14. Estructura química de mitoxantrona **15** y bisantreno **16**.

- **Metabolitos de Plantas:**

Cuatro grandes grupos componen estos derivados: alcaloides de la Vinca, taxanos, camptotecinas y epipodofilotoxinas.

• **Alcaloides de la Vinca:**

Son alcaloides aislados de la planta *Vinca rosea*, de los cuales cuatro presentan actividad reconocida: vincristina **17**, vindesina **18**, vinblastina **19** y vinorelbina **20**.

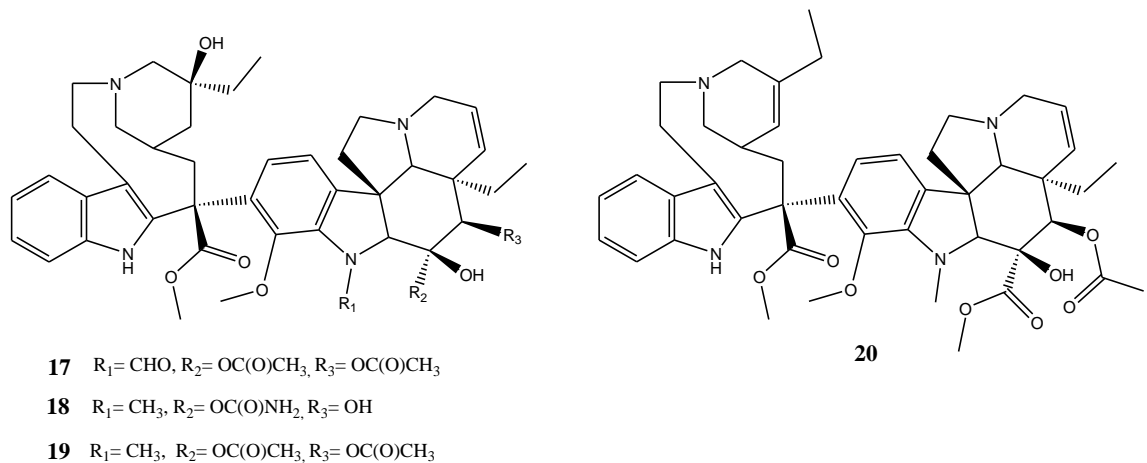
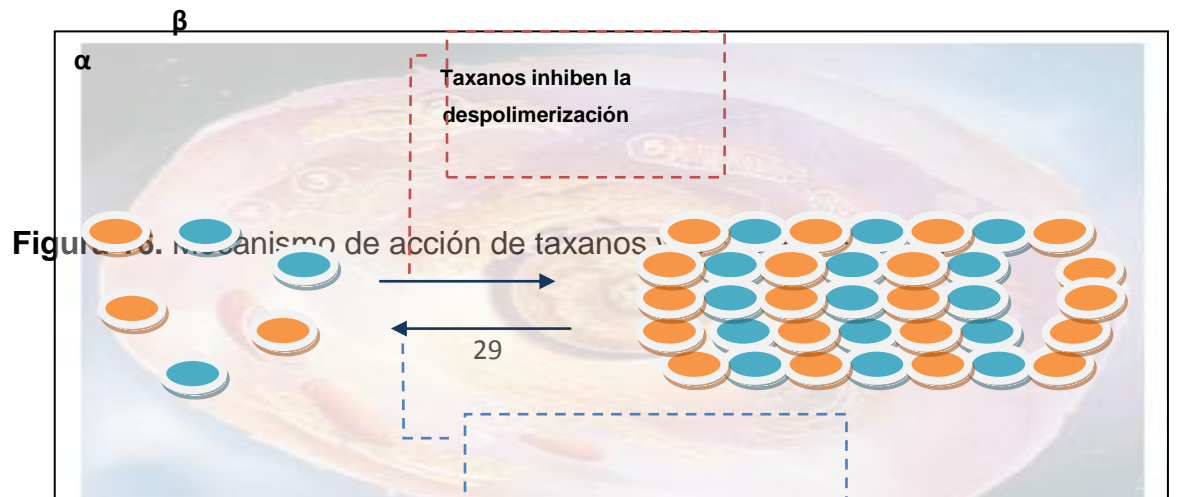
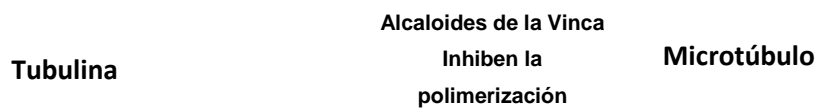


Figura 15. Estructura química de alcaloides de la Vinca: vincristina **17**, vindesine **18**, vinblastina **19** y vinorelbina **20**.

Son agentes específicos del ciclo celular que actúan durante la metafase de la mitosis, se unen específicamente con la tubulina (proteína que forma el huso mitótico, es decir el conjunto de microtúbulos que conducen a los cromosomas durante los procesos de reproducción celular), alterando el movimiento del huso celular ocasionando su destrucción y la dispersión de los cromosomas, e impidiendo la mitosis. También, actúan inhibiendo el ARN de transferencia.⁷⁷



- **Taxanos**

Dos fármacos representan este grupo, obtenidos de la corteza del árbol *Taxus brevifolia*, el paclitaxel **21** y el docetaxel **22** (derivado semisintético).

Estos fármacos interfieren en la división celular y producen la destrucción de la célula al unirse a la fracción β de los microtúbulos e impidiendo su despolimerización (figura 16), y originando enlaces estables, es decir, túbulos no funcionales.⁷⁸ Además, se ha propuesto que inducen la expresión génica del factor de necrosis tumoral α (TNF α) deteniendo la célula en fase G₂.

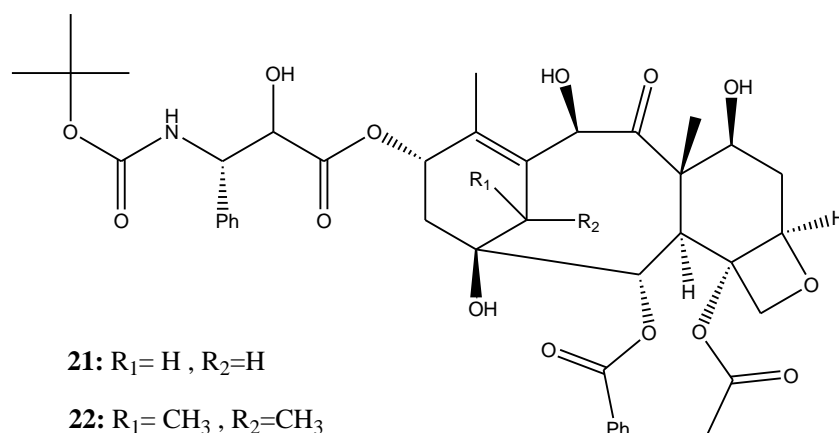


Figura 17. Estructura química de alcaloides del tejo: paclitaxel **21** y el docetaxel **22**.

- **Camptotecinas:**

Son alcaloides derivados de *Camptotheta acuminata*. Existen dos derivados de la camptotecina **23**, el topotecán **24** y el CPT-11 **25**. Estos derivados actúan sobre la topoisomerasa I, enzima que opera sobre la fase de relajación del ADN, durante la replicación celular. La unión de la camptotecina con la topoisomerasa I fija las hebras del ADN y produce aumento de las fuerzas de torsión, alterando los procesos de escisión-reparación (actúa sobre las fases S y G₂).⁷⁹

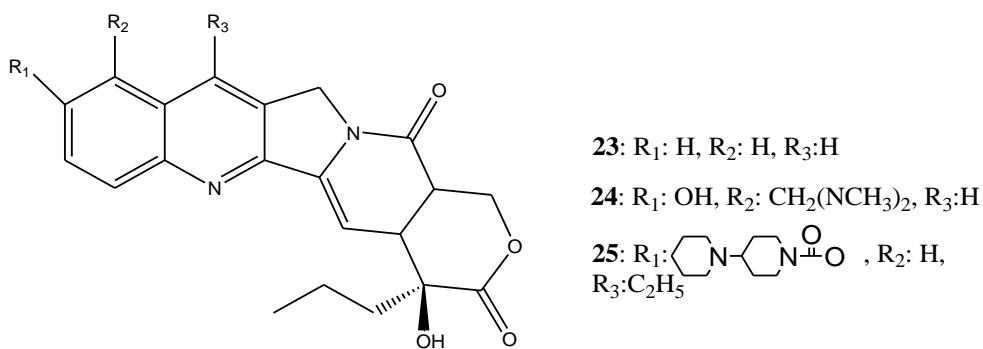


Figura 18. Estructura química de camptotecinas: camptotecina **23**, el topotecán **24** y el CPT-11 **25**

- **Epipodofilotoxinas:**

Son derivados naturales del *Podofilino*, cuyo principio activo es la podofilotoxina. Actualmente están disponibles para su uso en clínica dos derivados semisintéticos, el etopósido **26** y el tenipósido **27**, utilizados como antineoplásicos por su acción antimitótica.⁸⁰

Actúan sobre la topoisomera II, interfiriendo en los procesos de escisión-reparación del ADN. Además, provocan la apoptosis celular por la generación de reacciones de oxidación–reducción y la consecuente lesión del ADN (fármacos específicos de las fases S y G₂).

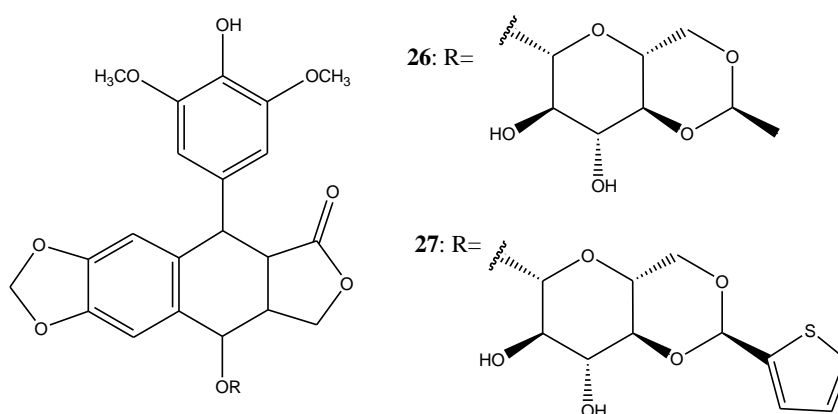


Figura 19. Estructura química de epipodofilotoxinas: etopósido **26** y el tenipósido **27**

Se ha reportado que las células neoplásicas presentan niveles de topoisomerasas superiores a los de las células normales, por lo cual estos fármacos presentan selectividad como citotóxicos.

➤ **Antiangiogenicos e Interruptores de la vascularización**

Por su importancia para la nutrición y desarrollo del tumor y la diseminación de las células tumorales, la angiogénesis representa un blanco potencial para la terapia contra el cáncer.

En este sentido el sunitinib⁸¹ **28** y sorafenib⁸² **29** han sido desarrollados como fármacos antiangiogénicos impidiendo la formación de nuevos vasos sanguíneos y el crecimiento del tumor, conduciendo a la muerte del mismo.

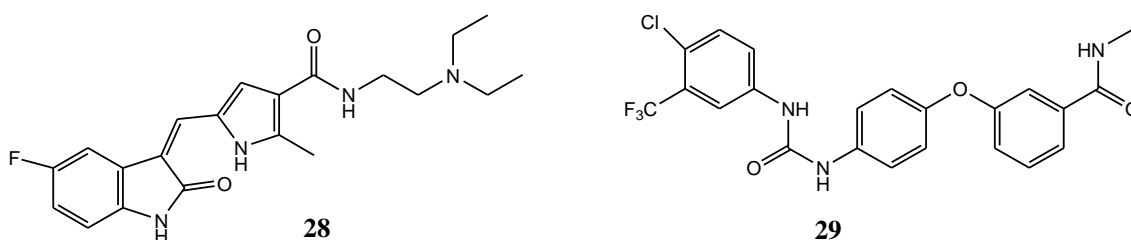


Figura 20. Estructura química de agentes antiangiogénicos: sunitinib **28** y sorafenib **29**.

Otro tipo de agentes son los llamados interruptores de la vascularización (VDAs), como los flavonoides sintéticos FAA y DMXAA⁸³ (figura 21) que actúan una vez formados los vasos sanguíneos, impidiendo la circulación a través de la inducción de una citoquina local, denominada factor alfa de necrosis tumoral (TNF α)

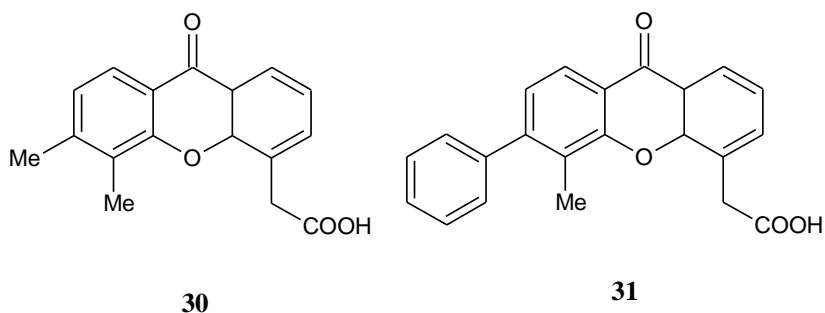


Figura 21. Agentes interruptores de la vascularización: FAA **30** y DMXAA **31**.

La combrestastatina A4,⁸³ pertenecen a los agentes de alteración vascular y son una de las últimas incorporaciones a los candidatos a fármacos contra el cáncer. Es un derivado cis-estilbeno, el más potente de una serie de metabolitos aislados del árbol africano *Combretum caffrum*. Es un potente inhibidor de la polimerización de tubulina. Además ha mostrado la capacidad de inducir la disfunción vascular en los tumores, deteniendo su crecimiento. Se ha encontrado que la presencia de los grupos metoxi es importante para mantener la actividad.

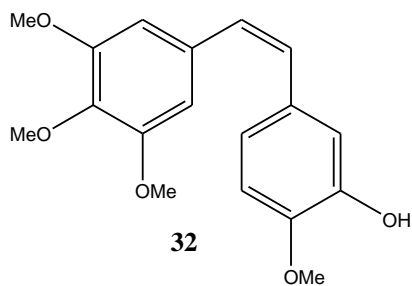


Figura 22. Estructura química de combrestastatina A4.

Otro importante agente citostático es la colchicina (figura 23), ésta ha sido trascendental en la elucidación de las funciones y propiedades de la tubulina y los microtúbulos.⁸⁴ Se cree que este tipo de compuestos poseen un enlace al sitio de unión de la tubulina más simple y diferente que los presentados por los alcaloides de la vinca o el taxol. Se ha propuesto que el anillo A de la colchicina (anillo trimetoxilado) se enlaza a una subunidad de la tubulina y el anillo C enlazado a la otra subunidad, donde los dos sitios de enlace de cada subunidad son encontrados en regiones homólogas de las dos cadenas polipeptídicas.⁸⁵ Sin embargo, su aplicación medicinal está limitada debido a su alta toxicidad.

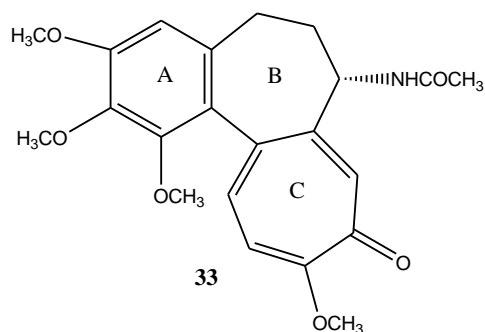


Figura 23. Estructura química de la colchicina.

La evidente importancia del sistema aromático metoxilado, ha estimulado el diseño de nuevos compuestos que lo contengan, por esta razón dentro de la estrategia de fármaco modulación, en este trabajo se ha incluido dicho núcleo y sus diferentes patrones de sustitución que permitirán establecer estudios de relación estructura actividad (SAR).

➤ **Inhibidores de las tirosinas quinasas**

Recientemente, se han desarrollado fármacos inhibidores de las tirosinas quinasas, dominios funcionales de receptores que controlan los procesos celulares básicos tales como; proliferación, migración, metabolismo, diferenciación, supervivencia celular y procesos de regulación de comunicación intercelular. Estos inhibidores (figura 24), han mostrado una respuesta completa en mucho de los pacientes tratados hacia un cáncer específico y con pocos efectos adversos.⁸⁶

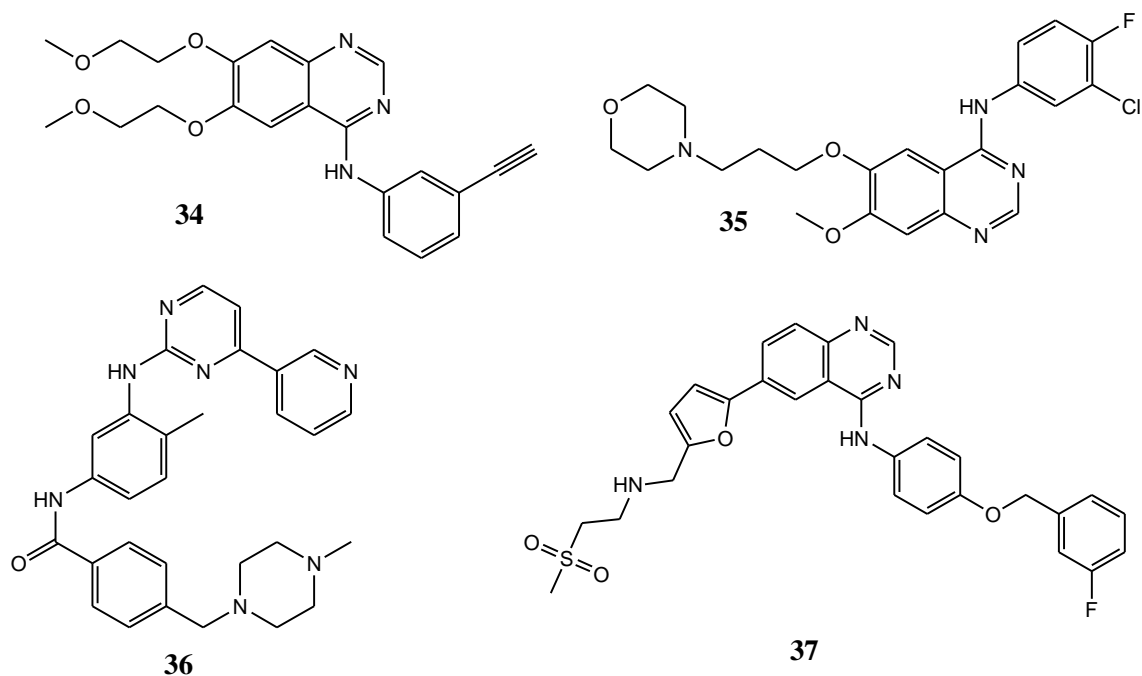


Figura 24. Fármacos inhibidores de la Tirosina Quinasa: erlotinib **34**, gefitinib **35**, imatinib **36** y tykerb **37**.

➤ **Anticuerpos monoclonales:**

Un innovador descubrimiento en biotecnología fue la fusión celular, desarrollada en 1975 por Köhler y Milstein.⁸⁷ Mediante esta tecnología se consiguen anticuerpos monoclonales, que en esencia son el resultado de la fusión *in vitro* de linfocitos B de bazo (inicialmente de ratones sensibilizados), con antígeno específico con una célula cancerosa (variante celular de mieloma). El resultado de la fusión es una célula conocida como hibridoma, que combina la capacidad de producción de un anticuerpo determinado, propio del linfocito B, con la capacidad de la célula cancerosa de reproducirse indefinidamente.

Los anticuerpos o inmunoglobulinas son glucoproteínas que se forman en respuesta a la presencia de agentes extraños o antígenos presentes en bacterias, virus u otros invasores extraños.

La estructura más sencilla de anticuerpos comprende dos cadenas peptídicas largas, iguales (denominadas cadenas pesadas) y dos cadenas peptídicas cortas (ligeras), interconectadas por puentes de disulfuro, presentan una forma característica tipo Y (figura 25).

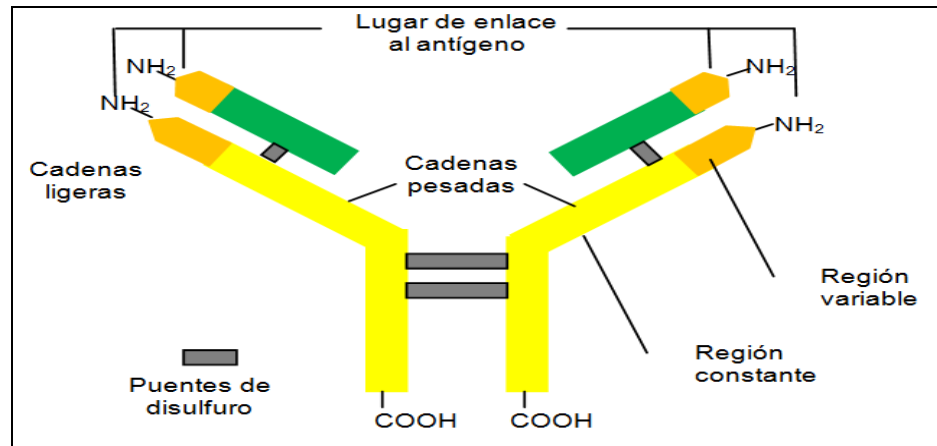


Figura 25. Representación esquemática de la estructura de un anticuerpo monoclonal.

Se diferencian en la longitud y secuencia de aminoácidos de sus cadenas peptídicas, con pesos moleculares que van de 150 a 900 KD.⁸⁸

En la tabla I, se mencionan algunas características de los anticuerpos monoclonales aprobados por la FDA (U.S. Food and Drugs Administration).⁸⁹

Como podemos observar, son muchas las estrategias que se han empleado para tratar las neoplasias, pero, desafortunadamente estos fármacos no solamente actúan sobre las células cancerosas, sino que también tienen efecto sobre las células normales. Esta falta de especificidad es el principal problema de la quimioterapia, por esta razón, hace necesario continuar con la búsqueda de nuevas estructuras que sirvan como plantilla o estructuras líderes prometedoras como agentes quimioterapéuticos, que sean más específicos,

con mejor actividad y pocos efectos tóxicos al paciente y que desde el punto de vista farmacológico puedan, además, ser eventualmente aplicadas en otros tipos de enfermedades como las parasitarias.

Tabla I: Anticuerpos monoclonales

Nombre común anticuerpo	Tipo de anticuerpo	Antígeno	Indicación
Abciximab	Quimérico*	GpIIb/IIIa	Trombosis
Rituximab	Quimérico	CD20	Linfoma no Hodgkin
Infliximab	Quimérico	TNF- α	Artritis reumatoide
Trastuzumab	Humanizado**	HER2/neu	Cáncer de pecho
Daclizumab	Humanizado	CD25	Prevención de rechazo de trasplantes de riñón.
Basiliximab	Quimérico	CD25	Prevención de rechazo de trasplantes de riñón.
Gemtuzumab-Ozogamicin	Humanizado	CD33	Leucemia mieloide aguda
Alemlizumab	Humanizado	CD52	Leucemia linfocítica crónica células B
Cetuximab	Quimérico	EGFR	Cáncer colorrectal; pulmon
Bevacizumab	Humanizado	VEGR	Cáncer colorrectal; escamoso de cabeza y cuello

* El término quimérico se refiere a los anticuerpos que mantienen unidas las regiones variables murinas (ratones) pero con regiones constantes humanas.

**Los anticuerpos humanizados contienen solo las regiones variables del anticuerpo murino original y se producen insertando las seis porciones que reconocen al antígeno de las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo murino en un anticuerpo humano (reduciendo considerablemente la respuesta inmunológica en relación con los murinos).

I.2. Malaria

La malaria, también conocida como paludismo, es una enfermedad causada por protozoarios transmitida por la picadura de mosquitos hembras del

género *Anopheles*. Hasta la fecha se conoce que cinco especies del género *Plasmodium* producen la enfermedad, a saber; *P. vivax*,⁹⁰ *P. falciparum*,⁹¹ *P. malariae*,⁹² *P. ovale*⁹³ y más recientemente *P. knowlesi*,⁹⁴ siendo la infección causada por *Plasmodium falciparum* la más severa.

La malaria es la enfermedad parasitaria más importante desde el punto de vista del número de individuos enfermos y por su impacto socioeconómico.⁹⁵ Afecta a poblaciones de las regiones tropicales y subtropicales del planeta, pero su diseminación a otras regiones le convierte en un problema de salud pública en más de 108 países. El último reporte de La Organización Mundial de la Salud (OMS), refiere que entre 3.300 y 1.250 millones de personas viven en áreas de riesgo para contraer la malaria,⁹⁶ a pesar de los esfuerzos e iniciativas que se han llevado a cabo para su control. Entre estas estrategias vale la pena mencionar; la mejora de los sistemas de diagnóstico, la dotación de mosquiteros impregnados con insecticidas, y el rociado intradomiciliario, entre otras.

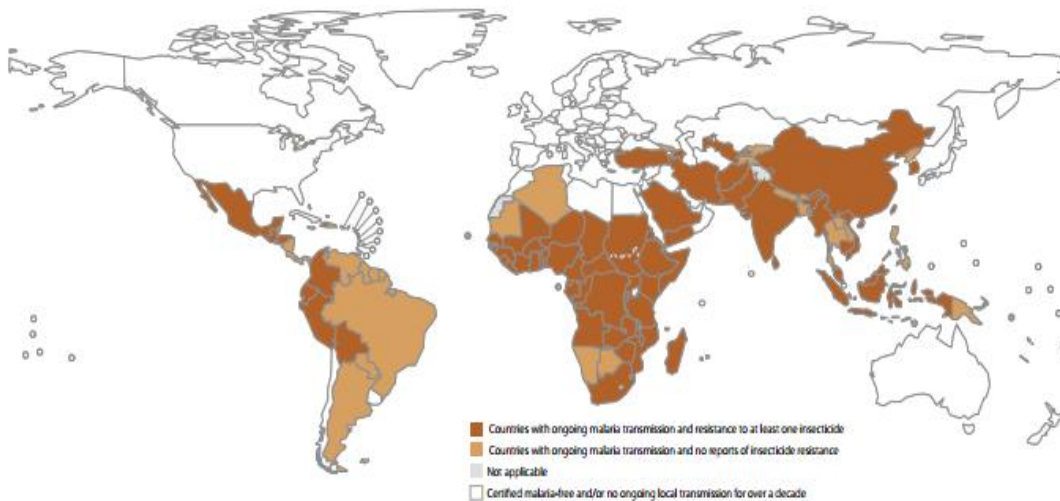


Figura 26. Distribución de la malaria en el mundo para el año 2012.⁹⁶

Según las estadísticas sanitarias mundiales reportadas en 2013 por la OMS,⁹⁶ los casos de malaria notificados ascienden a 24.153.005, siendo el

continente africano el que reporta el 84,3% del total de casos (gráfico 2). En el gráfico 2 se muestra el índice por país.

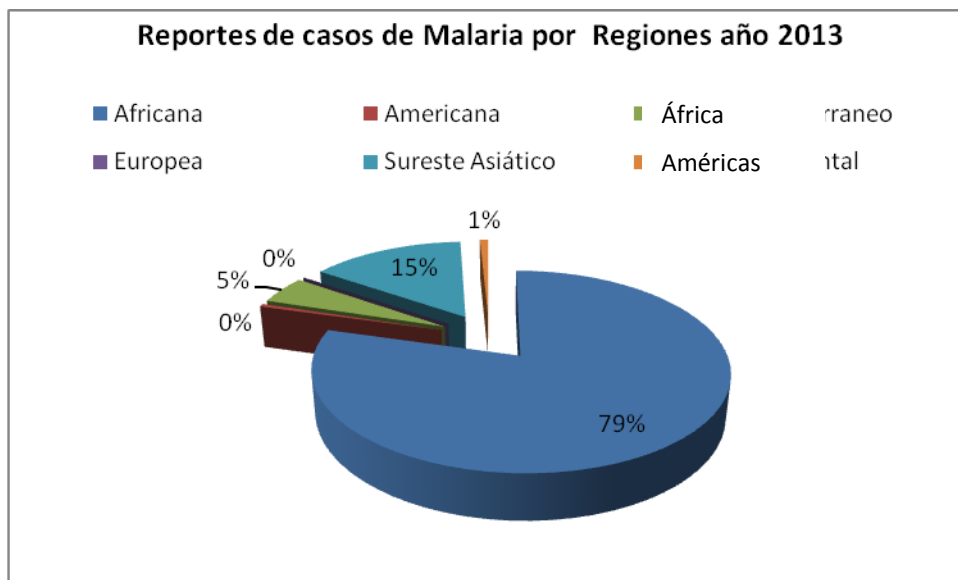


Gráfico 2. Reporte de casos de malaria en el mundo, datos OMS 2013.

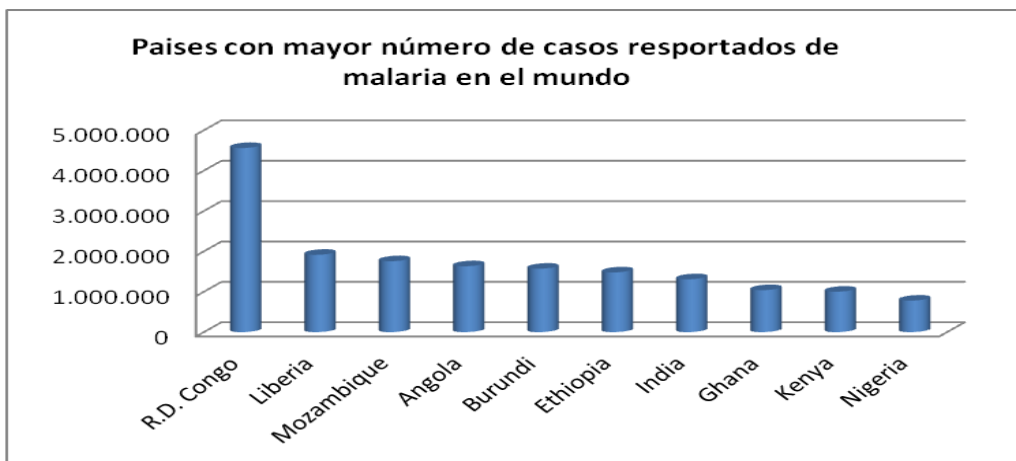


Gráfico 3. Distribución de casos de malaria en África.

En el continente americano destaca Brasil con 267.045 casos de malaria reportados, seguido por Colombia, Venezuela, Haití y Guyana.

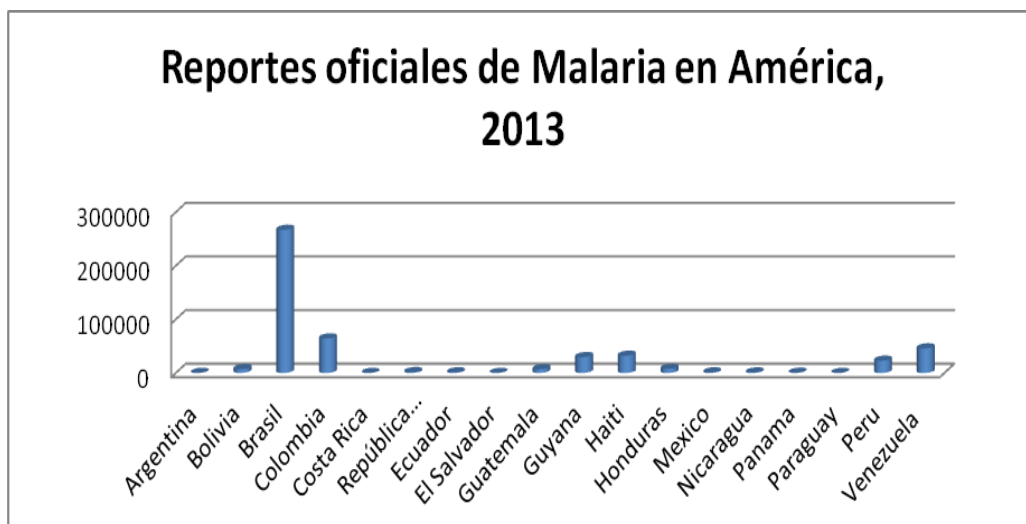


Gráfico 4. Reportes oficiales de malaria en América.⁴⁰

En Venezuela hasta agosto de 2013, se reportaron, 47.733 casos de malaria registrando un aumento del 91,7% respecto al año 2010 (colocándolo como el país que ha tenido el mayor repunte en los últimos años en la zona americana), el 82,86% de los casos se debe a la infección por *P. vivax*, 8,57% debida a *P. falciparum* 8,57% a infecciones cruzadas (*P. falciparum* + *P. vivax*)⁹⁷, con una incidencia parasitaria anual de 14,5 por cada 1000 habitantes. Se estima que se encuentran en riesgo 7.717.509 millones de venezolanos lo cual representa cerca del 27% de la población.

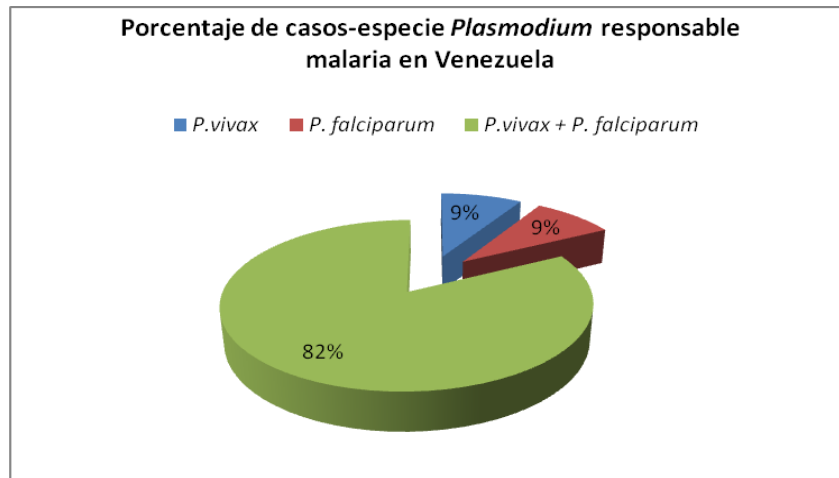


Gráfico 5. Distribución de casos de malaria por especie de *Plasmodium* en Venezuela.

La alta morbi-mortalidad y el riesgo inminente de millones de personas de contraer esta enfermedad, hace prioritaria la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas y el desarrollo de nuevos antimaláricos a fin de contribuir al tratamiento de este problema sanitario.

I.2.2. Ciclo de infección de la malaria ^{93,98}

El ciclo de vida del agente causal de la enfermedad es muy complejo (figura 27), e implica una fase de multiplicación sexuada en el vector (hospedador definitivo), y otra asexuada en el hombre (hospedador intermediario). Aunque la malaria puede transmitirse por transfusión de sangre infectada, **(i)** la infección natural del hombre se produce por los esporozoitos inoculados por la hembra infectada del mosquito *Anopheles* **(i)**. Los parásitos abandonan rápidamente la circulación para localizarse en las células del parénquima hepático, donde se multiplican y evolucionan a esquizontes tisulares **(ii)**; este estadio tisular (exoeritrocítico) de la infección es asintomático y se extiende entre 5 y 16 días (dependiendo de la especie de *Plasmodium*). Los esquizontes se rompen liberando cada uno de ellos miles de merozoitos que ingresan en la circulación invadiendo los hematíes, iniciando así el estadio

o ciclo eritrocítico de la infección **(iii)**. En las infecciones por *P. falciparum* y *P. malariae*, los esquizontes tisulares se rompen casi de forma simultánea, quedando el hígado libre de formas parasitarias, pero en las infecciones por *P. vivax* y *P. ovale* persisten algunos parásitos celulares, que luego proliferan y tiempo después causan recaídas (meses o años después). En los eritrocitos, la mayoría de los parásitos sufren el ciclo asexual, desarrollándose desde formas anulares jóvenes a trofozoitos, y finalmente a esquizontes maduros **(iv)**. La ruptura de eritrocitos que contienen esquizontes, libera los merozoitos (cada esquizonte libera entre 6-24 merozoitos, causando la fase febril característica del paludismo); los merozoitos liberados invaden nuevos eritrocitos **(v)**. Algunos parásitos eritrocíticos se diferencian en formas sexuadas conocidas como gametocitos. Tras la ingestión de sangre infectada por el mosquito hembra, se produce la exflagelación del gametocito macho, seguida por su gametogénesis y fertilización del gametocito hembra en el intestino del insecto **(vi)**. En esta etapa se genera un oocineto en la pared intestinal que finalmente da lugar al esporozoitos infectante, que invade las glándulas salivales del insecto y se reinicia el ciclo **(vii)**.^{93,98}

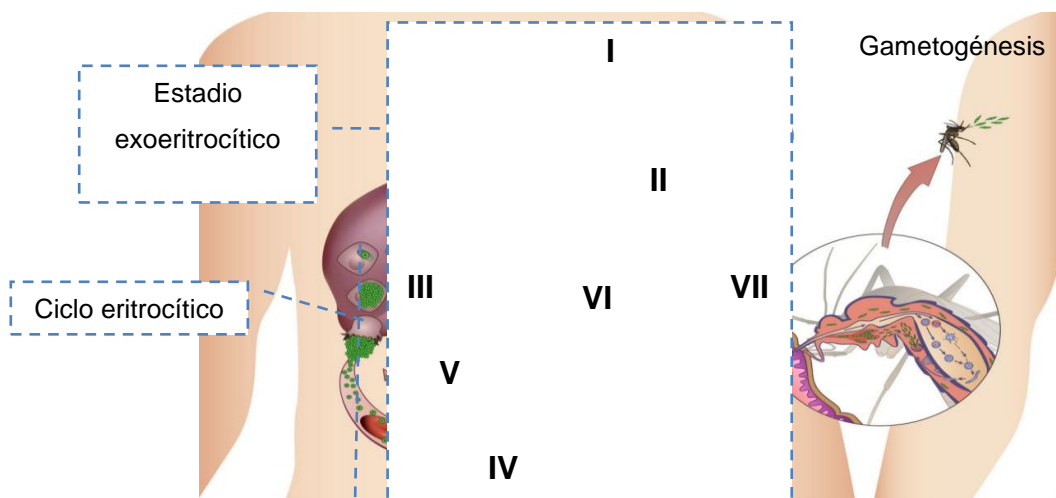


Figura 27. Ciclo de infección de la malaria (modificado de biomedicinaunic.blogspot.com)

I.2.3. Estrategias para el control de la malaria

La investigación para el desarrollo de medicamentos y vacunas contra las grandes enfermedades parasitarias que incluyen malaria, leishmaniasis y tripanosomiasis no ha tenido mucho interés por la industria farmacéutica principalmente por la vida comercial muy corta de los medicamentos a causa del establecimiento rápido de la resistencia y los bajos ingresos económicos provenientes de la venta de los mismos.⁹⁹

Se han realizado varios esfuerzos organizados para controlar la transmisión de la enfermedad.^{100, 101} Estas iniciativas se han dirigido a la eliminación tanto del parásito como del agente transmisor. Las estrategias consisten básicamente en:

1. Control de la transmisión. Uso de insecticidas, obras de infraestructura sanitaria, educación:

A pesar de estos esfuerzos por reducir el impacto de la enfermedad, el número de casos de malaria está en continuo aumento debido a la resistencia del mosquito a los insecticidas y más importante aún, al rápido desarrollo de resistencia del parásito a los fármacos disponibles. Desde el año 2008 la Organización Mundial de la Salud estableció nuevos objetivos en el Plan de Acción Mundial sobre el Paludismo con vistas al control de la enfermedad, destacando la campaña de dotación de mosquiteros y acceso a programas terapéuticos, lo que ha mostrado una disminución importante de la morbilidad y la mortalidad en países africanos como Santo Tomé y Príncipe, Zambia y la isla Zanzíbar en Tanzania.

2. Preparación de vacunas antimaláricas/Anticuerpos monoclonales:

El desarrollo de una vacuna contra la malaria supone un gran reto. En los últimos años se ha producido un incremento significativo en el número de preparaciones candidatas a vacunas, sin embargo aún no se dispone de una vacuna efectiva. La alta variabilidad antigénica del parásito, la falta de marcadores inmunológicos así como la falta de modelos animales, son varios de los factores responsables de esta demora.

El grupo de Investigación de Patarroyo,¹⁰² desarrollaron la vacuna prototipo SPF66 con gran expectativa por los resultados obtenidos en simios, sin embargo no pudo demostrar ser efectiva frente a malaria por *P. falciparum* en humanos.

Alonso y colaboradores,¹⁰³ desarrollaron la vacuna RTS, S/AS02A contra la fase pre-eritrocítica de la malaria, la cual proporciona una protección parcial contra la infección en adultos voluntarios y adultos hiperinmunes. Esta vacuna redujo el riesgo de malaria clínica, con retraso en el lapso de tiempo para la nueva infección y la reducción de los episodios graves de malaria en niños africanos de más 6 meses de edad. Sin embargo aún continúa en estudio.

Recientemente, Seder y colaboradores,¹⁰⁴ reportan los estudios clínicos de la vacuna PfSPZ, la cual resultó segura y bien tolerado cuando se administró 4 a 6 veces por vía intravenosa (IV), encontrando que la respuesta de células T de anticuerpos específicos PfSPZ eran dependiente de la dosis empleada. Estos datos indican que existe un umbral inmunológico dependiente de la dosis para el establecimiento de la protección de alto nivel contra la malaria que se puede lograr mediante la administración intravenosa de una vacuna que sea segura y cumpla con las normas reglamentarias

La culminación del proyecto “Genoma del *Plasmodium falciparum* y *Anopheles gambiae*” ofrece nuevas esperanzas para encontrar nuevos blancos terapéuticos para el control de la malaria.¹⁰⁵

3. Quimioterapia

El tratamiento quimioterapéutico de la malaria durante muchos años se ha basado en el uso de un número restringido de fármacos, que presentan en su gran mayoría limitaciones de tipo farmacológico y toxicológico, y a los cuales el *Plasmodium* ha desarrollado resistencia. No obstante, recientemente se han producido una serie de avances, que abren nuevas expectativas para el desarrollo de antimaláricos, como son el Proyecto Genoma, la biología molecular, el modelaje molecular y la química combinatoria.

I.2.4. Fármacos utilizados en el tratamiento de la malaria

I.2.4.1 Quinolinas

Dentro de los compuestos que se vienen utilizando durante los últimos sesenta años en el tratamiento de la malaria se distinguen los derivados aminoquinolínicos con dos grandes grupos, los fármacos que actúan sobre las formas eritrocíticas asexuadas (esquizontes): Cloroquina **38** y quinina **39**, y sus derivados: mefloquina **40** y primaquina **41**.¹⁰⁶⁻¹⁰⁸

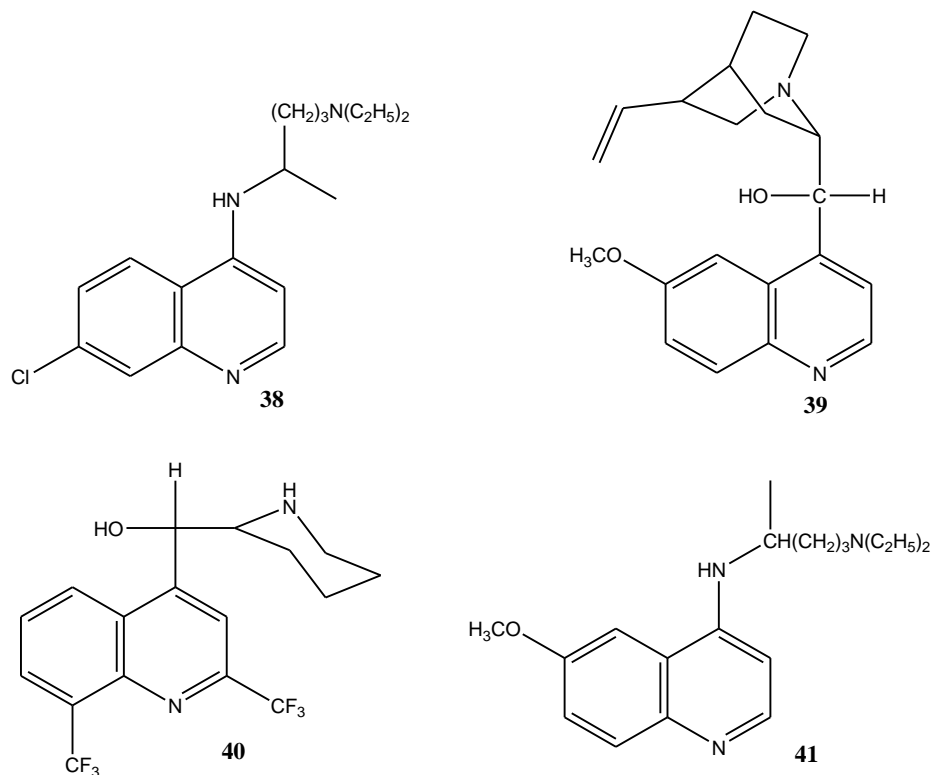


Figura 28. Estructuras químicas de los principales derivados aminoquinolónicos utilizados en el tratamiento de la malaria: cloroquina **38** y quinina **39**, mefloquina **40** y primaquina **41**.

➤ Quinina

Es el alcaloide principal de la planta *Cincona* (*Chinchona officinalis*) o árbol de la fiebre, la quinina posee un grupo quinolina unido a un anillo quinuclidina a través de un alcohol secundario.

- **Mecanismo de acción:**

La quinina actúa como esquizonticida sanguíneo y gametocida sobre especies *P. vivax* y de *P. malariae*. Un posible mecanismo de acción está relacionado con la intercalación con los pares de bases del ADN en el

plasmodio, para lo que resulta indispensable la estructura aromática plana del sistema quinoleína.¹⁰⁸ No obstante, el anillo de quinuclidina puede reemplazarse por otros sistemas más simples, lo que se ha empleado con éxito en el diseño de antimaláricos sintéticos, como por ejemplo la cloroquina.

Su mecanismo de acción exacto está sujeto a controversia aunque está demostrado que interfieren con la ruta de degradación de la hemoglobina uniéndose a la ferriporfirina IX.¹⁰⁶

➤ **La cloroquina**

Representa el fármaco antimalárico más empleado debido a su eficacia, tolerancia y bajo costo.

- **Mecanismo de acción:**

Se ha sugerido que la CQ interfiere con la biosíntesis de ADN/ARN del parásito, mediante la inhibición enzimática o modificando el pH, sin embargo, el mecanismo de acción más aceptado está asociado a la capacidad de inhibir la formación de la hemozoina.¹⁰⁶

La resistencia mostrada por parte del parásito a esta droga consiste en que la cloroquina se acumula en la vacuola digestiva de los parásitos resistentes (a pesar de que muestran incorporación cinética idéntica a los sensibles), disminuyendo el grado de acidez dentro de la vacuola, almacenándose entonces la cloroquina no protonada que por procesos de transporte atraviesan la membrana de la vacuola.

➤ **La Primaquina**

Poco se conoce de la actividad esquizonticida de las 8-aminoquinolinas, dados que son más activas frente a formas tisulares y gametos que frente a formas sanguíneas asexuadas del *Plasmodium*.

- **Mecanismo de acción:**

La primaquina actúa mediante la formación de parejas de óxido-reducción que interfieren con la ubiquinona y ubiquinona reducida, inhibiendo la síntesis de poliaminas al interferir con el transporte de electrones en las mitocondrias de *Plasmodium* y en la síntesis de pirimidinas. Posee acción gametocida y es el antipalúdico más eficaz para prevenir la transmisión de la enfermedad en las cuatro especies de *Plasmodium*, reduciendo el reservorio humano del Paludismo.

Las reacciones adversas más frecuentes son las molestias gastrointestinales, puede aparecer metahemoglobinemia en sujetos con déficit de nicotin-adeninucleotido (NADH) metahemoglobin reductasa.^{4, 105}

I.2.4.2 Antifolatos

Otro conjunto de compuestos de extrema utilidad en el tratamiento de la malaria lo forman los antifolatos que actúan a distintos niveles del metabolismo del ácido fólico. Así se distinguen las sulfamidas (figura 28) que inhiben a la dihidropteroato sintasa, enzima clave implicada en la síntesis del ácido fólico o compuestos como el cicloguanilo **43** y la pirimetamina **44** que son inhibidores de la dihidrofolato reductasa una enzima responsable de la regeneración del cofactor en estado reducido y que se encuentra asociada a la timidilato sintasa en una enzima bifuncional esencial para la síntesis celular de timidilato.¹⁰⁹

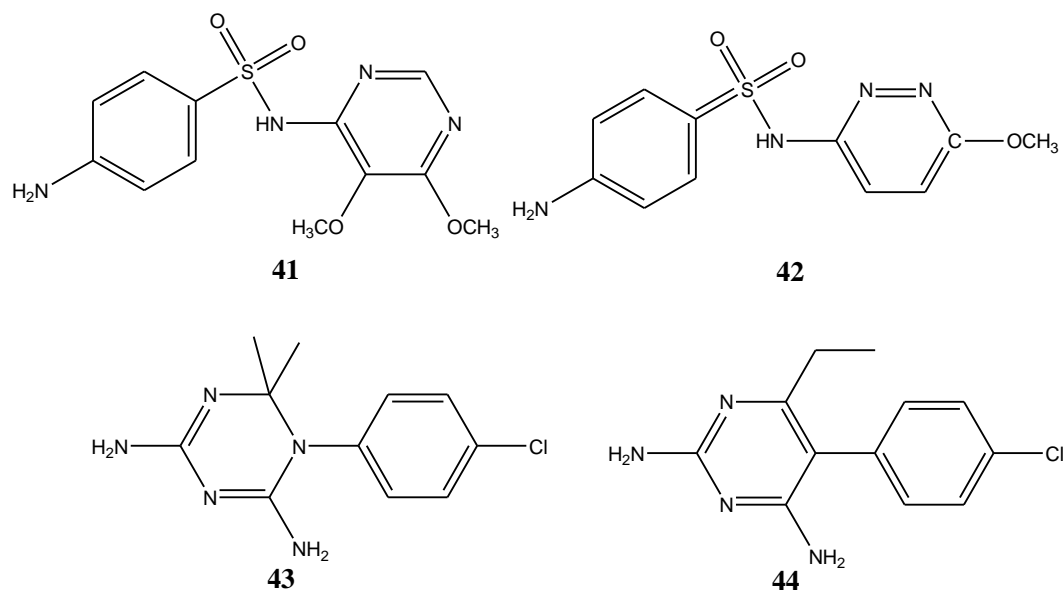


Figura 29. Estructura química de antifolatos: La sulfadoxina **41**, sulfametoxipiridazina **42**, cicloguanilo **43** y la pirimetamina **44**

La asociación de ambos tipos de fármacos ha resultado eficaz en el tratamiento, pero las mutaciones en la proteína blanco (DHFR) han generado múltiples casos de resistencia, lo que unido a casos de hipersensibilidad a las sulfamidas hace que su uso presente limitaciones.^{110,111}

I.2.4.3 Artemisinina y derivados

La artemisinina y sus derivados constituyen una clase de fármacos que se vienen empleando desde hace mucho tiempo en el tratamiento de la enfermedad.¹¹² La artemisinina **45** es una lactona sesquiterpenica aislada por primera vez en 1971 por químicos chinos a partir de la planta *Artemisia annua*, su potencial terapéutico está limitado por su baja solubilidad.

Se han preparado derivados semisintéticos como el artesunato **46**, el artemeter o el arteeter **47**, entre otros, empleados en la clínica con elevada eficacia.

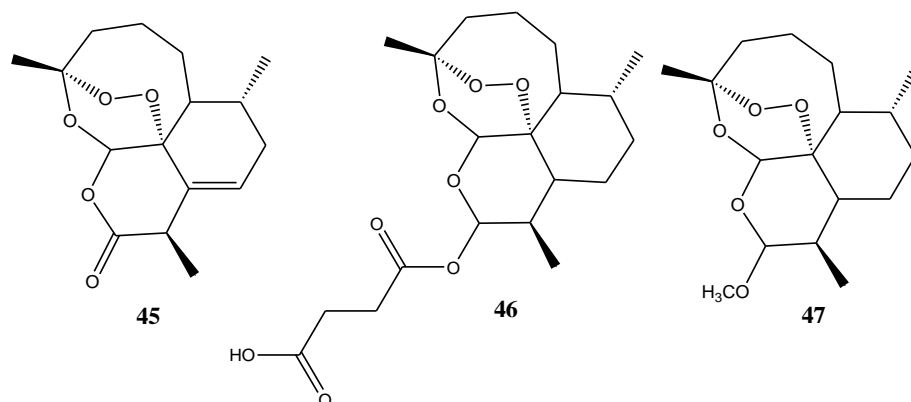


Figura 30. Estructura química de artemisinina y derivados: Artemisinina **45**, artesunato **46** y artemeter **47**.

Su mecanismo de acción no está muy claro sin embargo, se propone que su actividad biológica es dependiente de la ruptura del enlace peróxido tras la interacción con el Fe^{II} del grupo hemo en el interior de la vacuola digestiva, generándose radicales libres con capacidad alquilante, tanto para el grupo hemo como de otras proteínas del parásito.^{112,113}

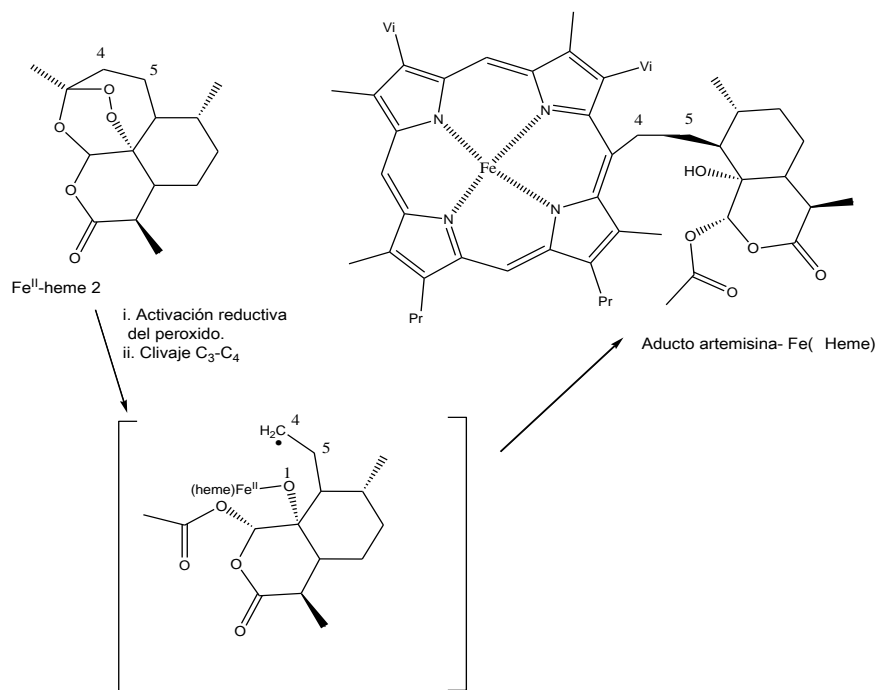


Figura 31. Mecanismo de activación reductiva de artemisinina por complejo Fe^{II}-Hemo

Estudios recientes apuntan que la artemisinina es un inhibidor de la SERCA (Ca^{2+} ATPasa del retículo sarcoplásmico, PfTAP6) de *Plasmodium*, sin embargo poco se sabe de este proceso de inhibición.¹¹⁴

➤ **Uso de Combinaciones**

La OMS recomienda el uso combinado de fármacos para el tratamiento de la malaria no complicada por *Plasmodium falciparum*, con la finalidad de incrementar la eficacia terapéutica. Adicionalmente las combinaciones de fármacos antimaláricos pueden reducir la duración del tratamiento, por ende, aumentar su cumplimiento y prolongar la aparición de la resistencia, que surge por mutaciones de genes de los parásitos durante la terapia.¹¹⁴

Algunas combinaciones entre antimaláricos de comprobada efectividad son: Artesunato-Mefloquina (Artequin), Artesunato- amodiaquina (Arsucan), Artemeter-Lumefantrina (Coartem), Amodiaquina-Sulfadoxina- Pirimetamina.¹¹⁵ Dihidroartemisinina-piperaquina (DP), usada en malaria por *Plasmodium falciparum* multiresistente ¹¹⁶ y Cloroquina-Pirimetamina-Sulfadoxina en niños las combinaciones basadas en Artesunato-Mefloquina han mostrado mutua protección contra la resistencia del parásito, gran eficacia y excelente tolerabilidad.^{117, 118}

➤ **Compuestos de organometálicos**

La química de coordinación ha incorporado compuestos con potencial para ser empleados como antipalúdicos. De hecho, la ferroquina **48** ha resultado ser más eficaz que la cloroquina en cepas resistentes, además presenta pocos efectos adversos y gran viabilidad de administración oral.¹¹⁹

Aunque la acción de la porción ferrocenil no es bien entendida y se han propuesto varias hipótesis, es un hecho que la ferroquina restaura totalmente la

actividad de la cloroquina en cepas resistentes. Investigaciones recientes han incorporado complejos de oro, rodio y rutenio para el estudio como potenciales drogas antimaláricas.¹²⁰

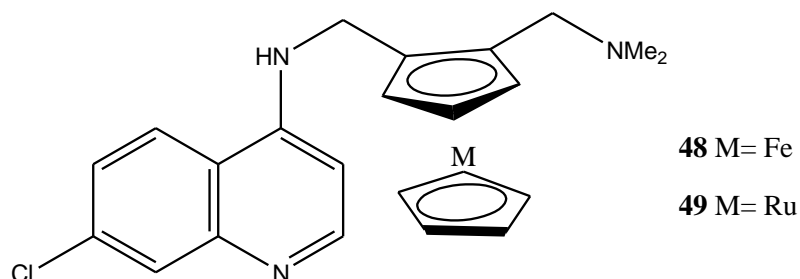


Figura 32. Estructura química de complejos metálicos con cloroquina: porción ferrocenil **48** y porción rutenocénica **49**.

Otros compuestos heterocíclicos a los que se le han incorporado una unidad de ferrocenil en la posición 2 son las quinolinas **50-55**. Se han sintetizado a partir de ferrocenil-o-nitrochalconas a través de una simple hidrogenación / ciclación intramolecular.¹²¹ Todos los heterociclos ferrocenilo inhibieron el crecimiento de cepas D10-W2 (susceptibles a cloroquina) de *Plasmodium falciparum* en rango de dosis 1,5 μ M a 100 μ M. (Figura 33).

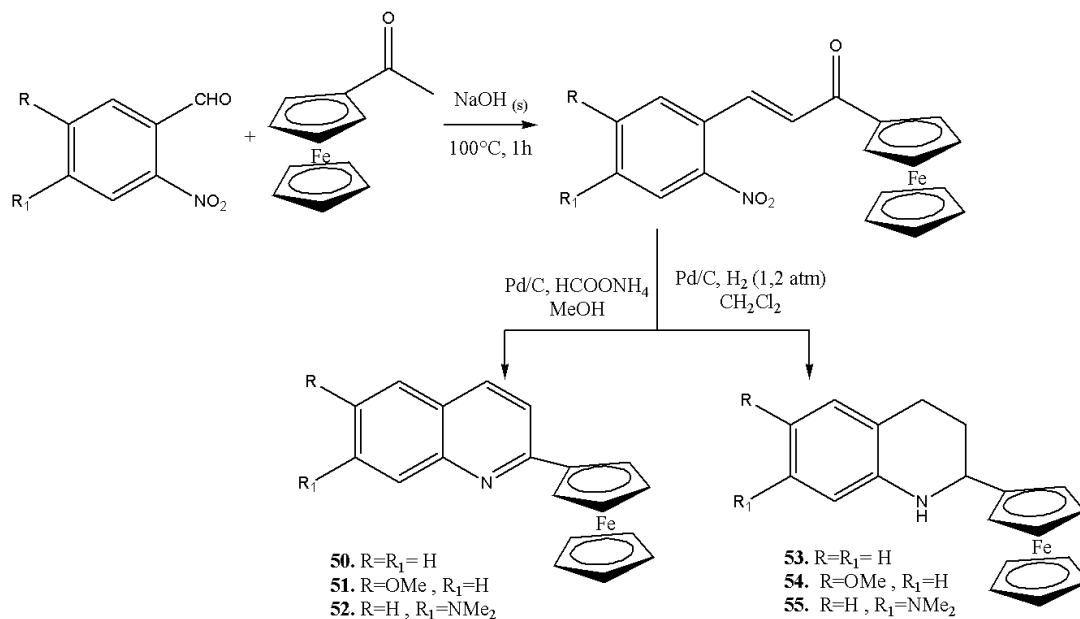


Figura 33. Síntesis de análogos 2-ferrocenilquinolinas

El tratamiento de la malaria ha sido posible durante muchos años con los fármacos antes mencionados, sin embargo, debido a una serie de limitaciones de tipo farmacológico y a la aparición de mecanismos de resistencia a estos tratamientos tradicionales, se hace necesaria la búsqueda de nuevos compuestos que contribuyan efectivamente al tratamiento de esta endemia. La expectativa al respecto es creciente, debido a que los avances en los conocimientos de la bioquímica y la genómica del parásito, señalan nuevas dianas terapéuticas.

Al respecto, una de las dianas terapéuticas de interés para el desarrollo de nuevos fármacos antimaláricos está relacionada con el metabolismo de la hemoglobina de las formas intraeritrocíticas de los parásitos del Género *Plasmodium*. Entre los objetivos de esta investigación se incluye la evaluación del potencial de los nuevos compuestos sintetizados para inhibir la formación de la Hemozoina o pigmento malárico, un producto formado por el parásito para controlar la toxicidad producida por el grupo hemo liberado durante la digestión de la hemoglobina del eritrocito hospedador por parte del parásito. La presencia

del anillo quinolinico en una de las series de derivados, sugiere su evaluación como inhibidores de la formación de este producto.

A continuación se describe brevemente este proceso.

Degradación de Hemoglobina y Formación de Hemozoina

El proceso de degradación de la hemoglobina del hospedante por parte del parásito, constituye un blanco para el desarrollo de nuevos antipalúdicos, dada la relevancia que tiene este mecanismo para la supervivencia del parásito.¹²⁰

La digestión de la hemoglobina del eritrocito hospedador se desarrolla en la vacuola digestiva del parásito donde están presentes enzimas proteolíticas como las proteasas aspárticas, cisteínicas y metaloproteasas, que son activas bajo condiciones ácidas. De este modo el parásito adquiere los aminoácidos requeridos para la síntesis de sus propias proteínas, y se liberan los grupos hemo. Paralelamente se desarrolla un proceso de desintoxicación del hemo libre, para evitar la toxicidad producto de la acumulación del mismo, debido a su capacidad para promover la generación de especies reactivas de oxígeno (superóxidos y peróxidos) que conllevan a modificaciones de aminoácidos, así como daños a las membranas celulares y del ADN.¹²¹

El proceso de desintoxicación consiste en oxidar el hemo libre a hematina (figura 34), para generar posteriormente el pigmento malárico denominado hemozoina. Este pigmento está constituido por β -hematina y otros componentes que aún no han sido completamente caracterizados.¹⁰⁷

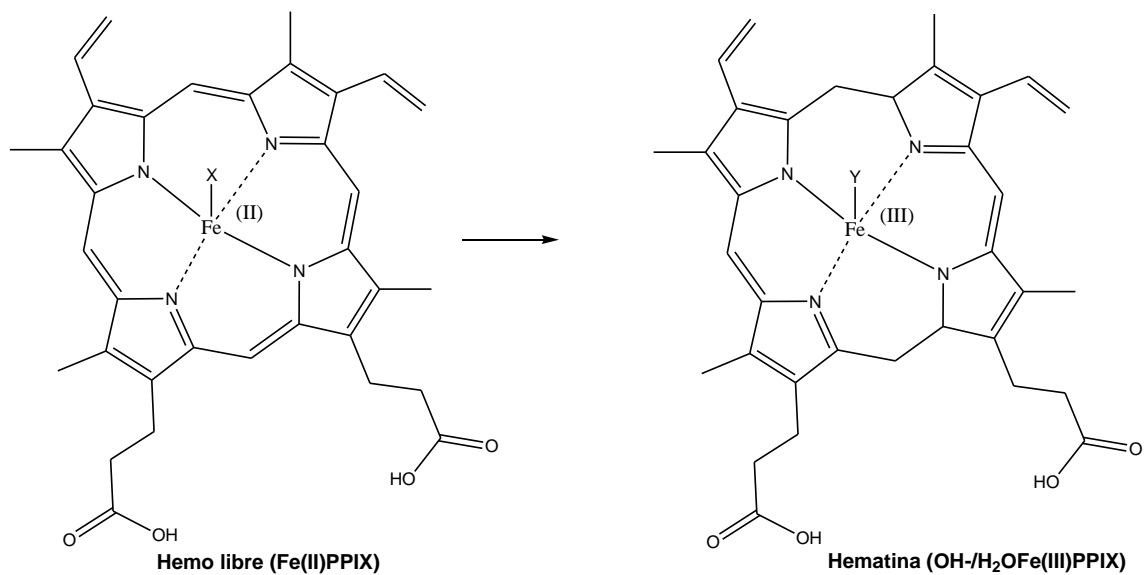


Figura 34. Estructura química de hemo libre y hematina

El producto formado, por la unión mediante puentes hierro-carboxilato de los grupos hemo libres, es un cristal inerte y no tóxico.¹⁰⁷ Este proceso es crucial para la supervivencia del *Plasmodium*, por tanto, la interferencia por efecto de fármacos, representa una opción para el desarrollo de nuevos antimaláricos.

II. ANTECEDENTES

El núcleo quinolina es una de las estructuras privilegiadas en química medicinal, ya que muchos compuestos que contienen esta plantilla han mostrado ser activos frente a diferentes enfermedades, que incluyen como se ha evidenciado las enfermedades parasitarias. Además, ha despertado gran interés en la búsqueda de estructuras que la contengan para el desarrollo de nuevos compuestos citotóxicos antitumorales.

Recientemente, se ha reportado el potencial antitumoral de compuestos que contienen el núcleo de la quinolina, contra células humanas de cáncer de mama MCF-7, siendo la cloroquina el agente que presentó el mayor efecto inductor de la apoptosis. Todas las quinolinas antimaláricas estudiadas fueron capaces de inducir la diferenciación causando la supresión del crecimiento en líneas celulares MCF-7 y MCF10A, mostrando actividad anti-proliferativa similar a cisplatin.¹²²

En el año 2004 Santelli-Rouvier y colaboradores,¹²³ sintetizaron derivados tioacridinas análogos a la cloroquina y demostraron la importancia del átomo de cloro en el anillo acridínico para mantener la actividad.

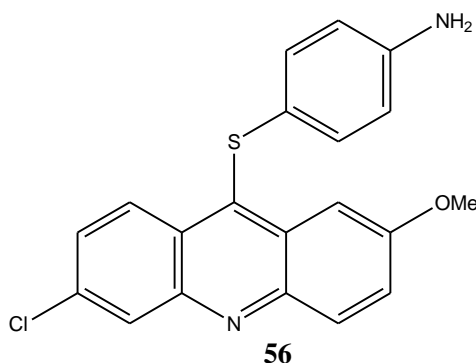


Figura 35. Estructura química de tioacridina **56**.

En ese mismo año Martirosyan y colaboradores,¹²⁴ reportan la actividad de nuevos derivados quinolínicos (figura 36) como compuestos antiproliferativos

y estimulantes de la diferenciación celular *in vitro* sobre células MCF-7, resultando 3 a 10 veces más potentes que otros compuestos quinolínicos empleados en el tratamiento de la malaria como la cloroquina, hidroxiquinolina, la amodiaquina y la quinina, causando la apoptosis celular mediante la inhibición de la histona deacetilasa (HDAC).

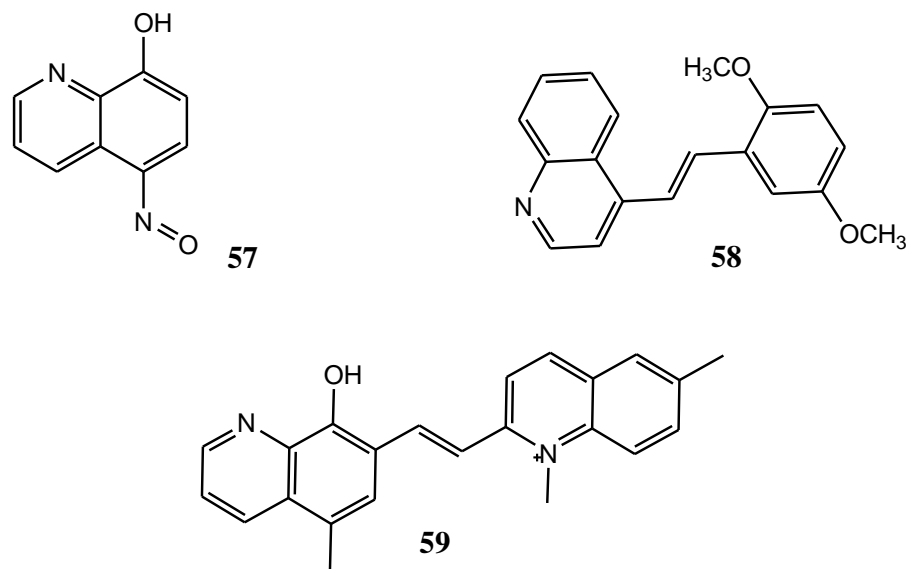


Figura 36. Estructura química de los derivados quinolínicos: NSC3852 **57**, NSC69603 **58** y NSC86371 **59**.

En 2007 Jasinski y colaboradores¹²² mediante screening de topología molecular lograron identificar la quinoleína MT477 **60**, compuesto con capacidad para interferir con la actividad de las isoformas de proteínas quinasas (PKC) e inhibir la proliferación celular en líneas de cáncer H226, MCF-7, U87, LNCaP, A431 y A549.

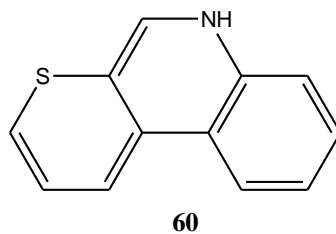


Figura 37. Estructura química de quinoleína MT477

Posteriormente Shi Aibin y colaboradores en 2008,¹²⁵ reportaron la síntesis de nuevos derivados 8-amino-5-arioxi-6-metoxi-4-metilquinolina.

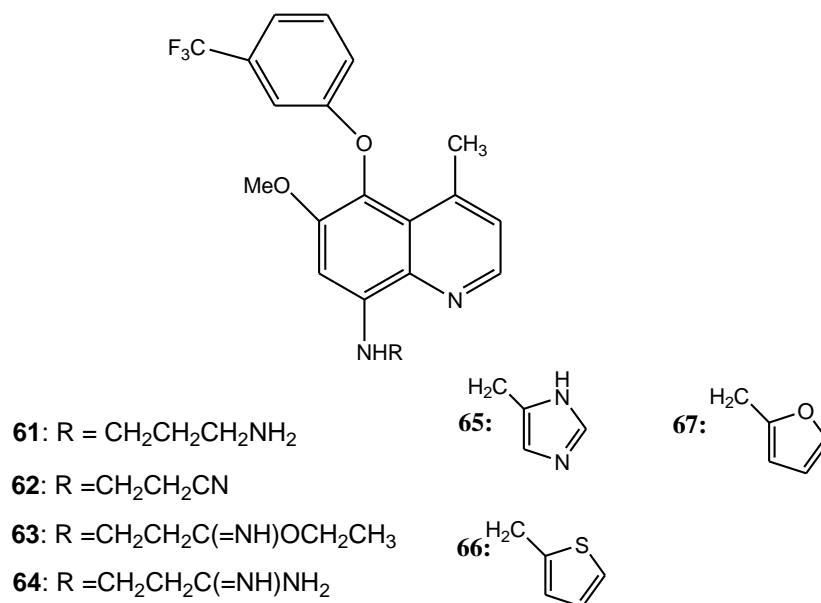
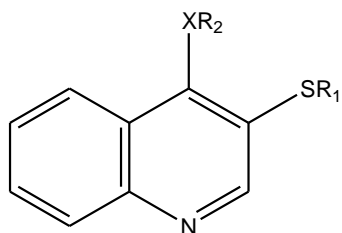


Figura 38. Formulas estructurales de 8-aminoquinolinas sustituidas con heterociclos de 5 miembros.

Este grupo de compuestos mostró una potente actividad antitumoral sobre células de cáncer de mama T47D, siendo la quinolina **67** la más activa (CI₅₀: 15,6 ± 3,0 nM).

En ese mismo año [Mól W](#) y colaboradores,¹²⁶ reportan la síntesis de nuevos compuestos tioquinolil acetilénicos que contienen en sus estructuras propargilo, 2-butinilo, 4-bromo-2-butinilo, y los grupos 4-hidroxi-2-butinilo, que mostraron actividad antiproliferativa *in vitro* frente a un amplio grupo de líneas celulares humanas SW707 (adenocarcinoma colorrectal, CCPR/CEM: leucemia) como de ratones P388 (leucemia); B16 (melanoma), con valores de ID₅₀ que van desde 0,2 hasta 4,6 µg/mL comparable a la de cisplatino utilizado como compuesto de referencia.



68: R1: $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CCH}_2\text{OH}$, R2: $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CCH}_2\text{Br}$, X:Se

69: R1: $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$, R2: $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CCH}_2\text{Br}$, X:Se

70: R1: $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$, R2: $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CCH}_2\text{OH}$, X:Se

Figura 39. Formulas estructurales de tioquinolinas sustituidas.

También hay evidencia de la actividad antitumoral sobre cáncer de próstata (CaP) por parte de linomide, un derivado de quinolina-3-carboxamida que tiene la capacidad inhibir el crecimiento de tumores en ratones. La eficacia de este compuesto se correlaciona con la inhibición de la angiogénesis.¹²⁷

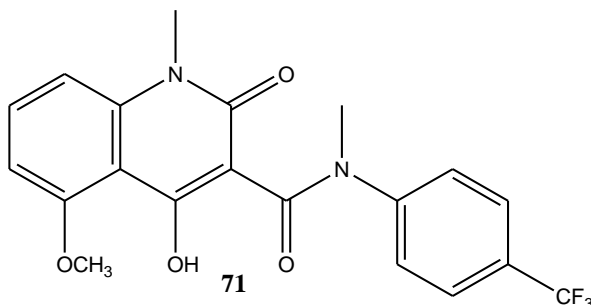


Figura 40. Estructura química de Linomide.

En el año 2007 Ferrer¹²⁸ desarrolla la síntesis de derivados 4-sulfanilvinilquinolinas en el laboratorio de Síntesis Orgánica de la Facultad de Farmacia, que presentaron una actividad inhibitoria de la hemozoína superior al 50%. El compuesto **75** redujo significativamente la parasitemia en ratones infectadas con *Plasmodium berghei*.

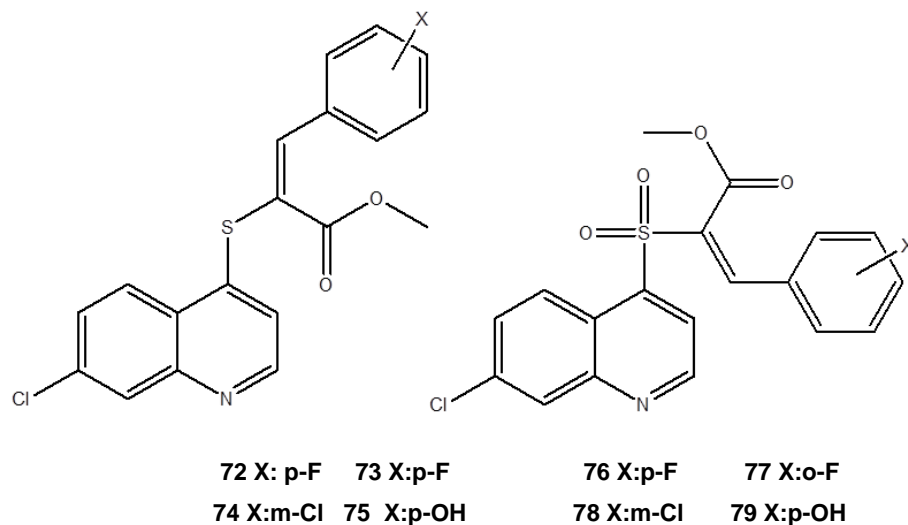


Figura 41. Formulas estructurales de derivados 4-sulfanilvinilquinolinas.

Más recientemente estos compuestos fueron evaluados sobre líneas de cáncer de próstata tanto *in vitro* como *in vivo*,¹²⁹ destacando el compuesto **75** con $IC_{50} < 20 \mu\text{g/mL}$. Este compuesto fue activo inhibiendo la adhesión celular, migración e invasión celular. También inhibió la neovascularización en embriones de pollo y formación de colonias de células tumorales. Estos resultados sugieren la potencial actividad de derivados tioacrilatos sobre el cáncer de próstata humano.

En 2009 Ferrer y colaboradores,¹³⁰ reportaron la síntesis de una variedad de 7-cloroquinolinil-4-aminofenilchalconas con propiedades antimaláricas y antineoplásicas. Los compuestos **80-84** mostraron efectos potenciales como inhibidores de la formación de β -hematina e inhibidores de la proliferación de células humanas de cáncer de próstata.

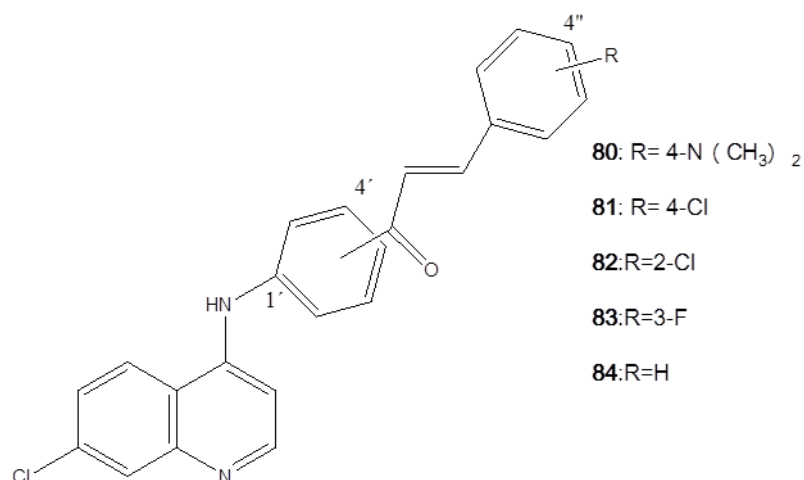


Figura 42. Formulas estructurales de 7-cloroquinolinil-4-aminofenilchalconas

En 2013 Arafa y colaboradores,¹³¹ reportan varios derivados de quinolina como scaffold o plantilla con cadenas laterales, semi-rígido o flexible en la posición 8 del anillo de quinolina. Estos nuevos compuestos se evaluaron in vitro sobre líneas celulares HT29 (cáncer humano de colón) y sobre la línea celular de cáncer humano de mama MDA-MB231. El compuesto **85** (figura 43) resultó ser el derivado más activo frente a las dos líneas celulares, con valores de Cl_{50} de 4,7 μ M y 4,6 μ M frente a HT29 y MDA-MB231, respectivamente.

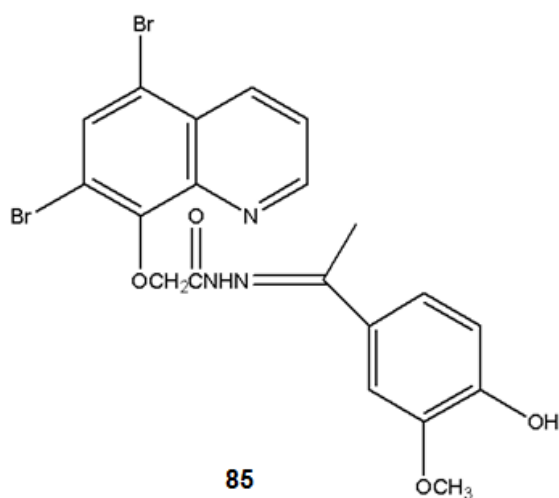


Figura 43. Estructura química de quinolina **85**.

Otros núcleos que han mostrado ser importantes en la búsqueda de compuestos líderes para el tratamiento de estas dos enfermedades son los núcleos bencimidazol y benzotiazol. De hecho en las últimas dos décadas, se han ensayado diversos derivados de estos tipos de compuestos con propiedades antimicrobianas, antialérgicas, anti-inflamatorias y citotóxica-antitumoral, entre otras.¹³²

Por otra parte, los compuestos nitroaromáticos, ampliamente utilizados en el tratamiento de infecciones, han mostrado actividad antitumoral, antiparasitaria y antimicrobiana.¹³²⁻¹³⁴ Se propone su participación en muchas reacciones de radicales libres, y actualmente se estudian con interés. En este sentido destaca el trabajo de Hranjec y colaboradores,¹³⁵ quienes sintetizaron una serie de benzimidazoles con acrilatos-furilo-fenil/ tienilo-fenil, y naftofuranos/naftotiofenos que mostraron ser activos frente a la línea celular de carcinoma de mama (MCF-7). Los compuestos **86-91** mostraron una notable selectividad respecto a los fibroblastos normales (WI 38), además exhibieron la capacidad de enlazarse al ADN de varios modos.

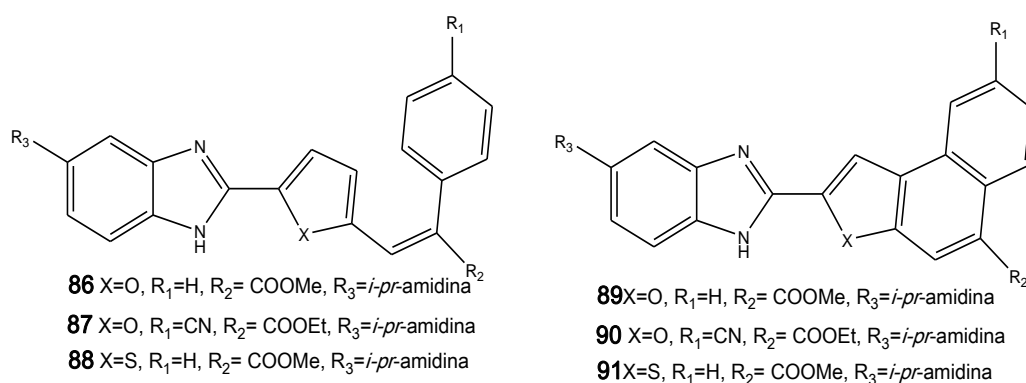


Figura 44. Formulas estructurales de derivados 4-sulfanilvinilquinolinas.

Recientemente Racané y colaboradores,¹³⁶ reportaron la actividad de distintos benzotiazolil furanos/tiofenos conteniendo el zwitterion amidino (figura 45), que mostraron un fuerte efecto antiproliferativo y capacidad para inhibir el

crecimiento celular de células HeLa, MCF-7 y MiaPaCa-2 a concentraciones menores de 50 μM , presentando además baja citotoxicidad sobre fibroblastos humanos normales.

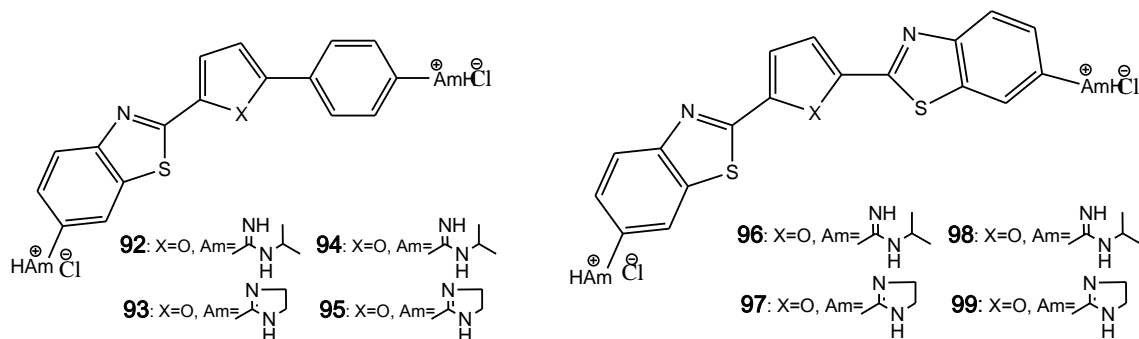


Figura 45. Formulas estructurales de derivados fenilbenzotiazil y furanos/tiofenos dibenzotiazolil.

Gowda y colaboradores ¹³⁷ en 2008 reportan la actividad de una serie de bencimidazoles trisustituídos y sus precursores (3-7) como inhibidores de la proliferación de las células de cáncer de mama MDA-MB. Los resultados revelaron que la carboxamida **100**, fue el inhibidor más potente, destacando la naturaleza electrón atrayente en los sistemas aromáticos en las posiciones 2, 3 y 7.

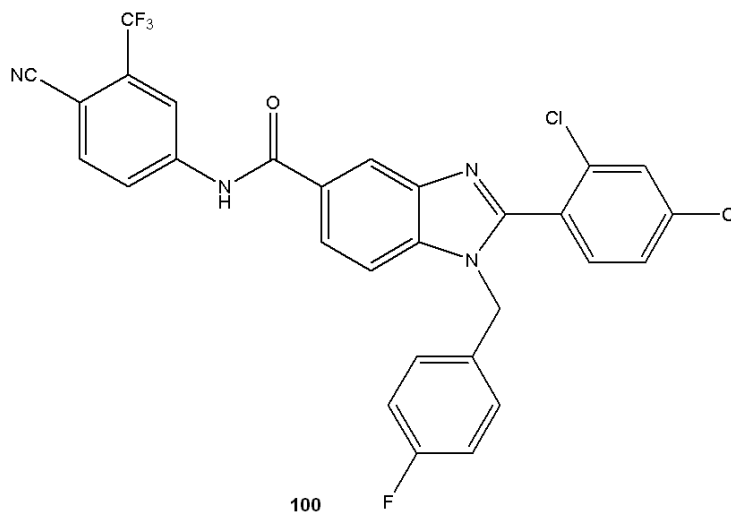


Figura 46. Estructura química de 1-(4-fluorobencil)-2-(2,4-diclorofenil)-N-(4-ciano-3-(trifluorometil)fenil)-1-H-benzo[d]imidazol-5-carboxamida **100**.

En el año 2011 Camacho y colaboradores,¹³⁸ reportan la actividad antimalárica y citotóxica antitumoral de derivados 5-nitrofuran y/o 5-nitrotiofenilbenzoimidazol, con capacidad para inhibir la formación de la β -hematina por encima del 92%, un valor comparable al mostrado por la CQ en el mismo sistema.

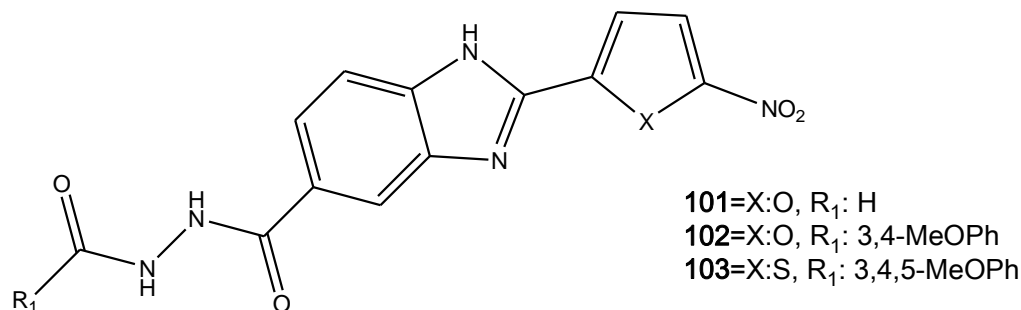


Figura 47. Estructura base de derivados de 5-nitrofuran y/o 5-nitrotiofenilbenzoimidazol.

Sin embargo, dichos compuestos presentaron bajo efecto como inhibidores de la hidrólisis de la globina de ratón.¹³⁹ Por otra parte, mostraron actividad citotóxica de moderada a débil (7.81 a 250 $\mu\text{g} / \text{mL}$) frente a líneas celulares cancerosas H460 (cáncer de pulmón de humanos); DU145 (carcinoma de próstata humano), MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano), M-14 (melanoma humano), HT-29 (adenocarcinoma de colon humano) y células humanas de leucemia mieloide crónica K562.¹⁴⁰⁻¹⁴¹

Gowda y colaboradores¹⁴² reportan la actividad de análogos del bencimidazol como potenciales agentes antileucemicos. Destaca el compuesto metil 1 - (4-metoxifenetil) -2 - (4-fluoro-3-nitrofenil)-1*H*-bencimidazol-5-carboxilato de etilo que indujo la muerte celular en las células leucémicas con una CI_{50} de 3 μM . Este compuesto actúa en la fase S/G₂ del ciclo celular, deteniendo la proliferación celular.

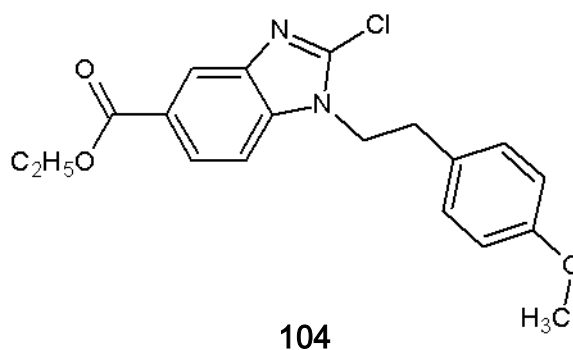


Figura 48. Estructura química de metil 1 - (4-metoxifenil) -2 - (4-fluoro-3-nitrofenil)-1H-bencimidazol-5-carboxilato de etilo **104**.

Noolvi y colaboradores en 2012,¹⁴³ reportan la actividad de una serie de 2-aminobenzotiazoles obtenidos mediante un diseño racional empleando una variedad de ligandos estructuralmente similares presentes en los sistemas 4-aminoquinazolina de erlotinib, lapatinib, gefitinib y canaratinib. Los compuestos presentaron diversas propiedades biológicas, incluyendo la actividad antineoplásica.

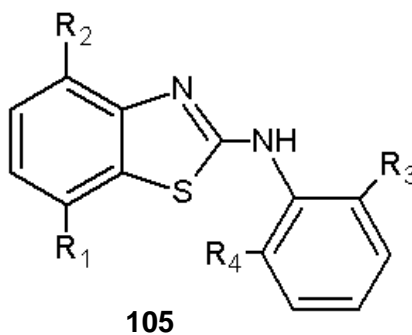


Figura 49. Estructuras generales de 2-aminobenzotiazoles **105**.

En 2013, Alka y colaboradores,¹⁴⁴ reportaron la síntesis y la evaluación citotóxica de una serie de nuevos híbridos regioisoméricos de quinazolina-bencimidazol. El Compuesto **106**, mostró actividad importante hacia una variedad de líneas de tumorales. Mostrando los porcentajes de inhibición de crecimiento: Células LOX IMVI (melanoma; 97,5%), Células K562

(Leucemia;98%), KT29 (colón; 94,3%), RXF (cáncer renal, 48%), MDA MB-231 (cáncer de mama; 58%).

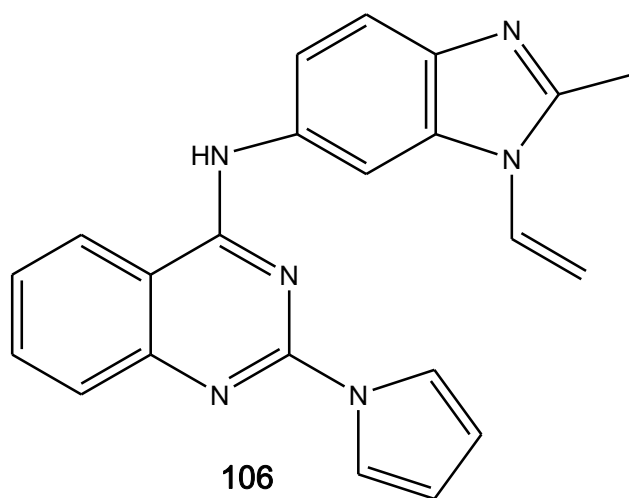


Figura 50. Estructura química de *N*-(2-metil-1-vinil-1*H*-benzo[*b*]imidazol-6-il)-2-(1*H*-pirrol-1-il)quinazolin-4-amina **106**.

Los antecedentes antes descritos indican que los núcleos tioquinolil acrilato, benzotiazol y nitro furil/tienil pueden considerarse entidades químico-farmacofóricas interesantes para la búsqueda de estructuras líderes promisorias para el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos para el tratamiento de la malaria y del cáncer .

Con base en estas consideraciones, de forma racional, en esta investigación nos trazamos los siguientes Objetivos:

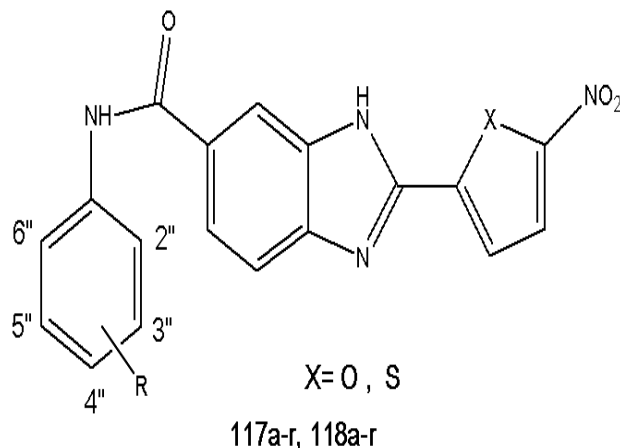
III. OBJETIVOS

III.1. Objetivos generales

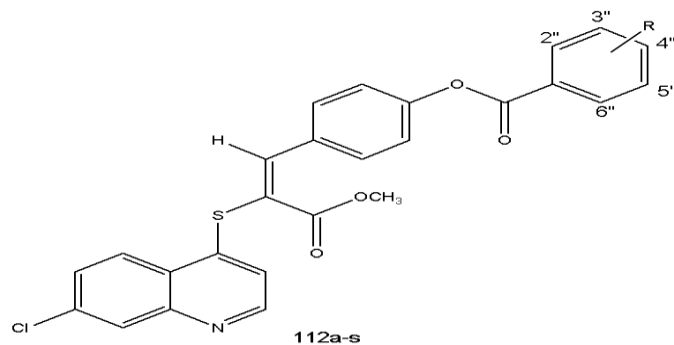
1.-Sintetizar y caracterizar químicamente derivados de benzoatos de 4-[(E)-2-(metoxicarbonil)-2-(7-cloroquinolil-4-iltio)vinil]fenilo y análogos del bencimidazol y benzotiazol, y evaluar su potencial actividad antimalárica, citotóxico-antitumoral y antimicrobiana.

III.2. Objetivos específicos

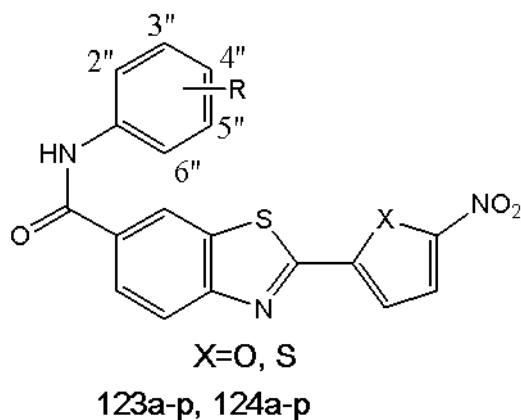
1.- Sintetizar derivados de benzoatos de 4-[(E)-2-(metoxicarbonil)-2-(7-cloroquinolil-4-iltio)vinil]fenilo (**112a-s**).



2.- Sintetizar derivados de 2-(5-nitrofuran/tiofen-2-il)-N-fenil-3H-benzo[d]imidazol-6-carboxamidas (**117a-r, 118a-r**).



3.- Sintetizar derivados de 2-(5-nitrofuran/tiofen-2-il)-N-fenilbenzo[d]tiazol-6-carboxamidas (**123a-p, 124a-p**).



4.- Caracterizar los compuestos a sintetizar mediante técnicas espectroscópicas de RMN¹H, RMN¹³C, DEPT, COSY, HETCOR, IR, espectrometría de masas y de sus propiedades físicas.

5.- Evaluar la capacidad de los nuevos derivados para inhibir la formación de la β-hematina *in vitro*.

6.- Determinar el efecto antimalárico *in vivo* de los compuestos sintetizados

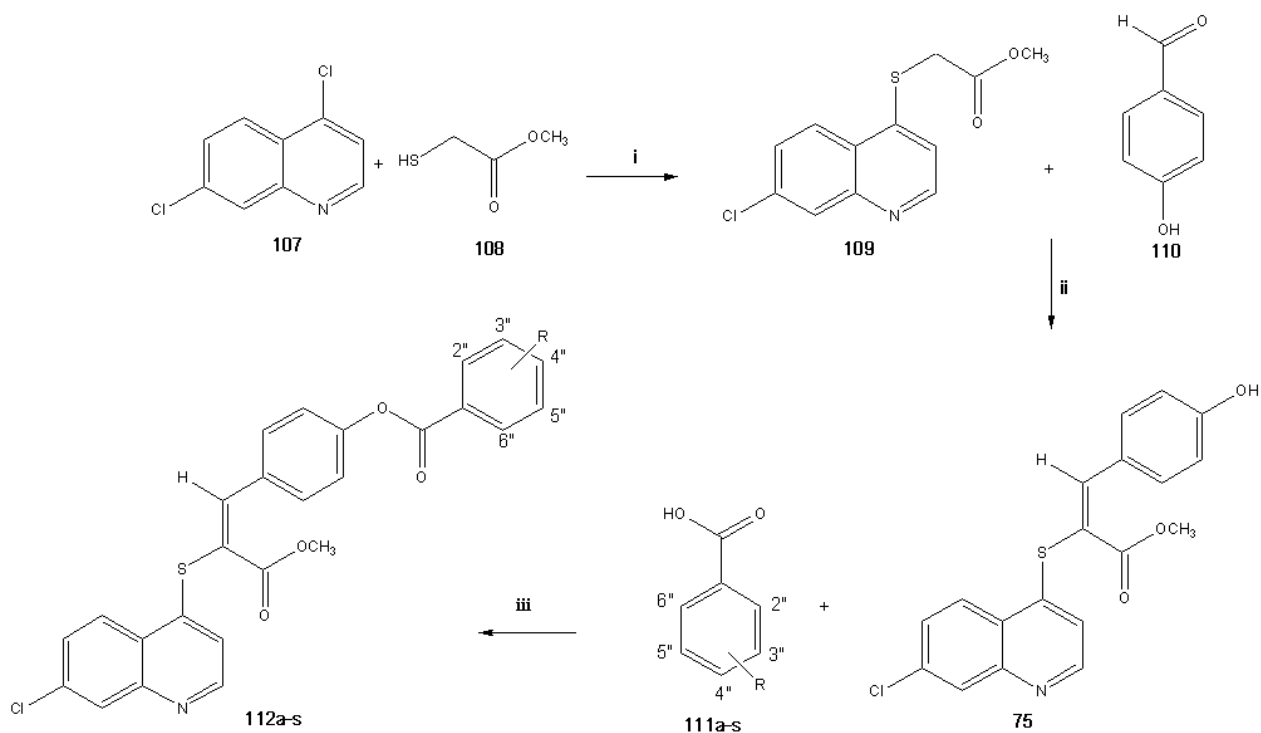
7.- Determinar el efecto de los compuestos sintetizados sobre el proceso de viabilidad y proliferación celular en las líneas celulares neoplásicas Jurkat E6.1 y HL60.

8.- Determinar el efecto de los compuestos sintetizados sobre el proceso de apoptosis, en las líneas celulares neoplásicas Jurkat E6.1 y HL60.

9.- Determinar la actividad antimicrobiana in vitro sobre microorganismos *Gram*-positivos, *Gram*-negativos y levaduras, empleando el método de difusión sobre placas de agar.

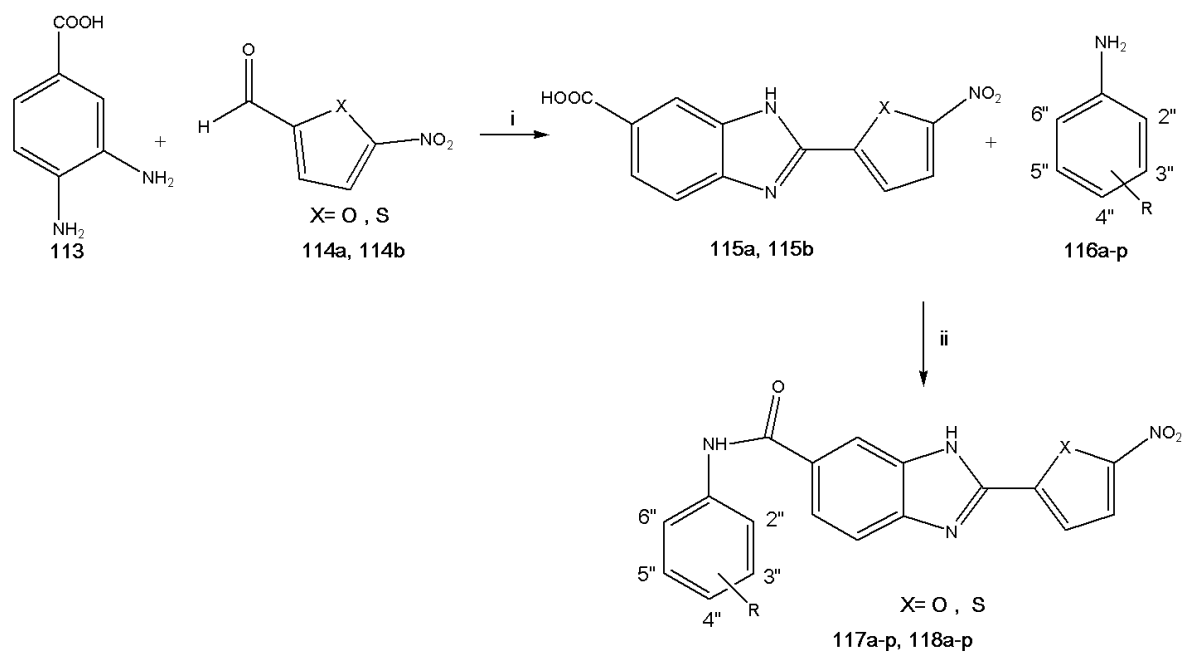
Para cumplir los objetivos químicos se propusieron los siguientes esquemas sintéticos:

Esquema 1. Estrategia sintética para la obtención de derivados de benzoato de 4-[(*E*)-2-(metoxicarbonil)-2-(7-cloroquinolil-4-iltio)vinil]fenilo **112a-s**.



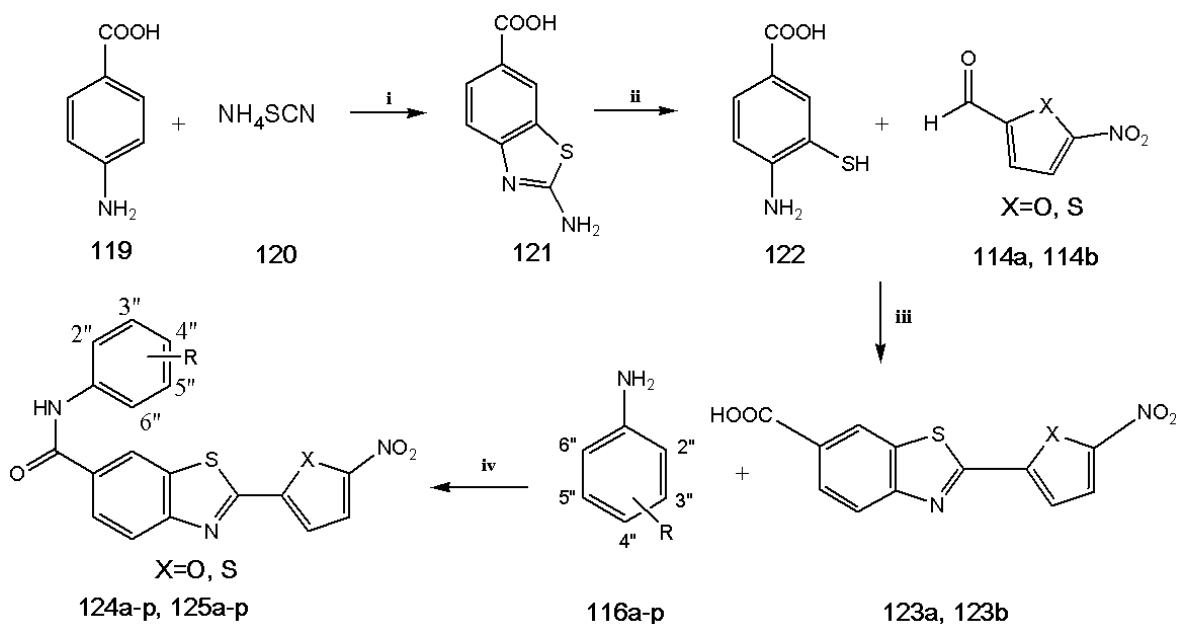
(i) Et₃N, MeOH (reflujo). **(ii)** 1.- p-hidroxibenzaldehído, piperidina-ácido acético (glacial), benceno, Δ, 2.-HCl 10%, MgSO₄. **(iii)** 1.-Ácido benzoico correspondiente, EDCI, CH₂Cl₂, DMAP 2.- NaHCO₃ 3.- MeOH

Esquema 2: Síntesis de 2-(5-nitrofuran/tiofen-2-il)-N-fenilbenzo[d]tiazol-6-carboxamidas. Serie (117a-p, 118a-p).



(i) 1.- 1,4-benzoquinona, etanol, 2.-H₂O, etanol; (ii) 1.-EDCI, DMF, 5% DMAP, anilina correspondiente 2.-Hielo/H₂O

Esquema 3: Síntesis de 2-(5-nitrofurano/tiofen-2-il)-N-fenilbenzo[*d*]tiazol-6-carboxamidas. Serie **124a-r**, **125a-r**.



(i) 1.- Br_2 , Ácido acético glacial, 0°C (30 min), t.a 2.- H_2O , etanol; **(ii)** 1.- KOH (30%), reflujo 2.-Hielo/ HCl ; **(iii)** 1.- 1,4-benzoquinona, etanol, 2.- H_2O , etanol; **(iv)** 1.- EDCI , DMF, 5% DMAP, anilina correspondiente 2.-Hielo/ H_2O 3.-Etanol

IV. PARTE EXPERIMENTAL

IV.1. Materiales, equipos y reactivos:

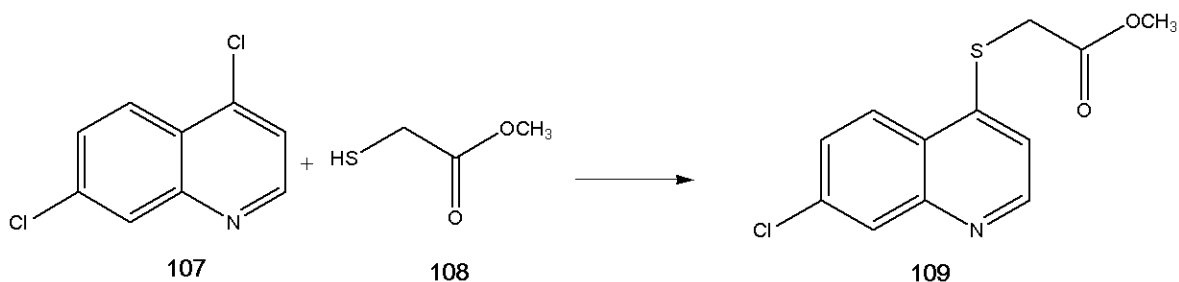
La caracterización de los compuestos obtenidos se realizó empleando los procedimientos que a continuación se describen:

- Los espectros IR, fueron tomados en espectrofotómetros marcas Nicolet IS5 con celda ID3 Zn-Se y Shimadzu modelo 470, usando pastillas de KBr, las absorciones más importantes son reportadas en recíprocos de centímetros (cm^{-1}).
- Los espectros de Resonancia magnética nuclear de ^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, HETCOR, fueron determinados en un espectrómetro JEOL ECLIPSE 270 (270MHz/67.9 MHz). Como solventes se emplearon: DMSO- d_6 y CHCl_3 - d . Los desplazamientos químicos (δ) son reportados en partes por millón (ppm), como patrón interno trazas de DMSO y CHCl_3 , respectivamente. El valor de las constantes de acoplamiento (J) en Hertz (Hz); las abreviaturas empleadas para indicar la multiplicidad de las señales son: singlete (s), singlete ancho (sa), doblete (d), triplete (t), doblete de dobletes (dd) y multiplete (m).
- Los espectros de masas fueron obtenidos en un sistema de trampa de iones lineal, modo positivo y un equipo Finnigan TSQ Quantum Ultra AM de cuadrupolo con fuente de ionización química.
- Los análisis elementales para algunos compuestos, fueron determinados en analizador Perkin Elmer 2400 CHN, los resultados están en el orden de ± 0.4 % de los valores calculados.
- Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato Fisher-Johns y no fueron corregidos.
- El monitoreo de las reacciones se realizó por cromatografía en capa fina (CCF), empleando cromatofolios de sílica gel marca Merck tipo 60F25H, de un espesor de capa de 0,2 mm. El análisis de las placas se llevó a cabo mediante una lámpara de UV de 254/365 nm o empleando cámara de yodo.

- Se utilizó Silica Gel, 60 Å 0,06-0,2 mm, para las separaciones cromatográficas en columna (70-230 mesh ASTM)
- Los solventes utilizados fueron destilados y secados: El diclorometano (CH_2Cl_2) sobre hidruro de calcio, éter dietílico $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$ sobre sodio y benzofenona, etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) sobre magnesio.
- Se emplearon los siguientes reactivos comerciales: piperidina (Aldrich 99%); ácido acético glacial (Aldrich 100%); metanol (Merck 99,9%); trietilamina (Fisher Scientific 95%); sulfato de sodio (Merck), piridina (Aldrich), bisulfito de sodio (BAKER ANALYZED), 4,7-dicloroquinolina (Aldrich 99%), hexano (Aldrich 96%), carbonato de potasio (Science), 4-dimetilaminopiridina (Aldrich), cloroformo (Merck 99%), pirrolidina (Aldrich), morfolina (Aldrich), tiomorfolina (Aldrich), EDCI (Aldrich), los diferentes ácido benzoico metoxilados así como los compuestos cloronitrobenzeno son de la marca (Aldrich).
- La evaluación de la posible actividad antimalárica se realizó de acuerdo a protocolos reportados *in vitro* mediante el ensayo de inhibición de la formación de β -hematina (IFBH) e *in vivo* mediante el Test supresivo de cuatro días (Test o Prueba de Peters), en la Unidad de Bioquímica, Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela.
- La determinación de la posible actividad antineoplásica se realizó mediante evaluación del efecto sobre el proceso de viabilidad y proliferación celular a través de la reducción colorimétrica de la sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltetrazolio (MTT). En el Instituto de Inmunología "Dr. Nicolás E. Bianco C". Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela.
- La actividad antimicrobiana *in vitro* se determinó midiendo el halo de inhibición sobre placas de agar, empleando microorganismos: *Gram*-Positivos (G+), *Gram* negativos (G-) y levaduras. En el Departamento de Biología Molecular, Departamento de Biología. Universidad Simón Bolívar, Venezuela.

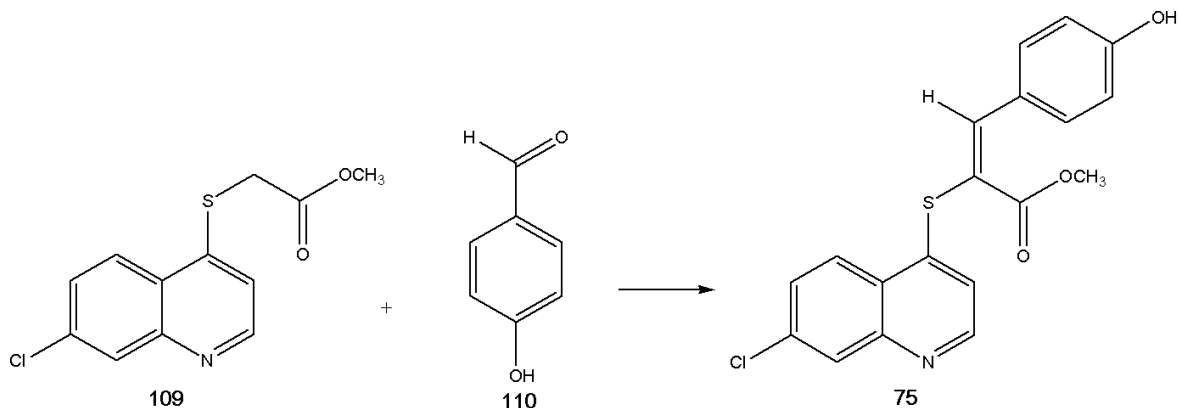
IV.2. Sección Química

IV.2.1. Síntesis de acetato 2-[4-(7-cloro-quinolinilsulfenil)] de metilo (109).



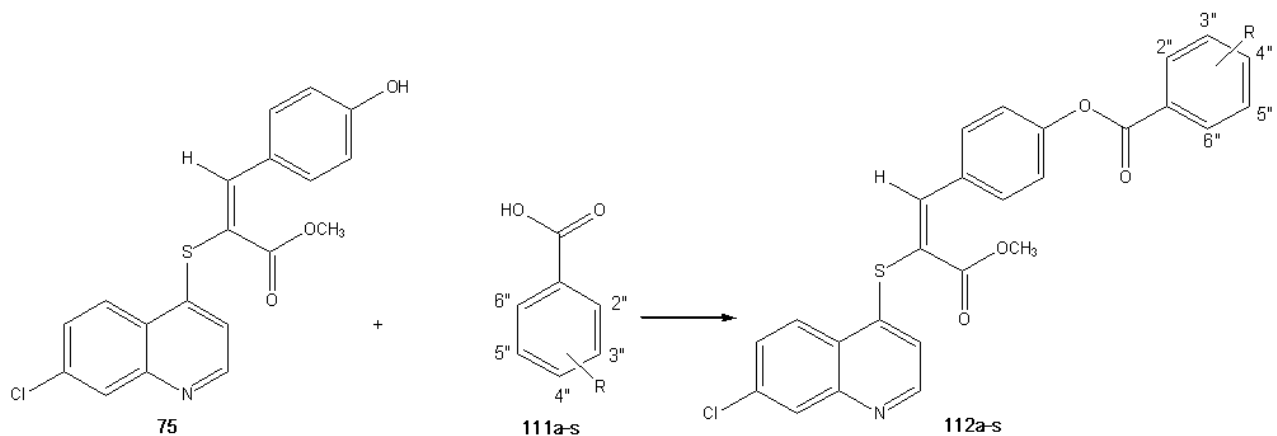
En un balón de 100 mL provisto de un agitador, se agregó 3,3 mmol de metiltioglicolato y 2,15 mmol de Et₃N en 15 mL de MeOH seco, se dejó reaccionar por 10 min y se adicionaron 2,6 mmol de 4,7-dicloroquinolina. La reacción se dejó a reflujo por 24 h. Transcurrido ese tiempo, el solvente se eliminó a vacío y se agregó 25 mL de diclorometano, seguidamente se lavó tres veces con agua destilada. El diclorometano se eliminó a presión reducida y se procedió a recristalizar por cambio de temperatura empleando metanol, para un rendimiento del 90%.¹²⁸

IV.2.2. Síntesis de acrilato 2-(7-cloroquinolinil-4-iltio)-3-(4-hidroxifenil) de metilo (75)



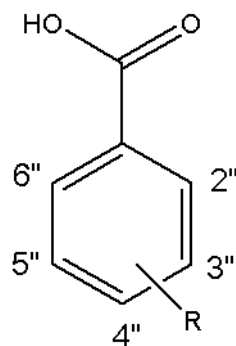
En un balón de dos bocas provisto de un agitador y una trampa Dean-Stark, se disolvieron 1,86 mmol de **109** y 2,26 mmol de p-hidroxibenzaldehído **110** en 25 mL de benceno seco, seguidamente se agregó 1 mL de piperidina y 0,75 mL de ácido acético glacial. La mezcla se reflujo por 24 h, el solvente se eliminó a presión reducida,¹²⁸ el producto de interés se obtuvo por precipitación al agregar una mezcla 1:1 de acetona-agua, con un rendimiento del 95%.

IV.2.3. Procedimiento general para la síntesis de benzoatos de 4-[(E)-2-(metoxicarbonil)-2-(7-cloroquinolil-4-iltio)vinil] fenilo (112a-s).



En un balón de 100 mL provisto de un agitador, se agregaron 0,40 mmol de clorhidrato de 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCI) y 0,32 mmol del ácido correspondiente en 20 mL de diclorometano seco. La mezcla se agitó a temperatura ambiente por 30 min. Seguidamente se agregó 0,08 mmol de 4-dimetilamino piridina (DMAP) y 0,27 mmol de **75** disueltos en 10 mL de diclorometano seco. La reacción se dejó bajo atmosfera inerte, temperatura ambiente y agitación continua por 48 h. Transcurrido este tiempo se lavo con tres porciones de 15 mL de agua destilada y tres veces con 15 mL de NaOH (10%). El solvente de la fase orgánica se eliminó a presión reducida y los compuestos de interés se obtuvieron al lavar con metanol.

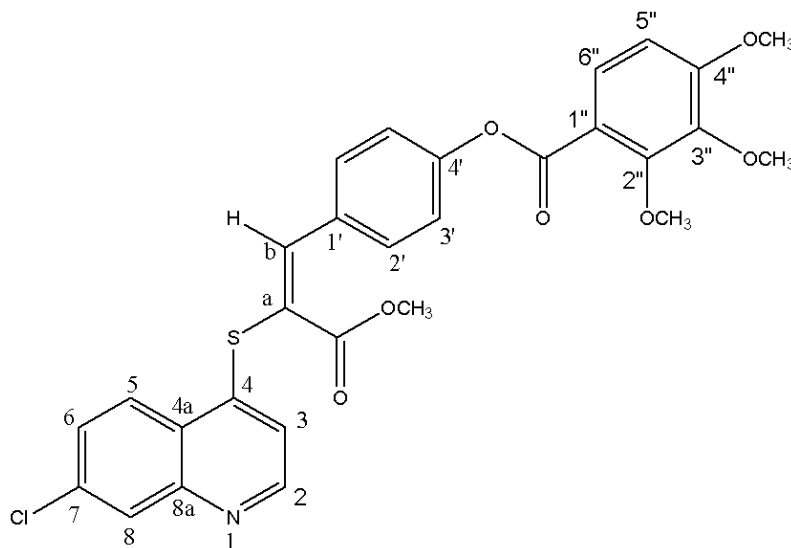
Tabla II. Ácidos de partida **111a-s** para la esterificación de la serie **112a-s**



111a-s

Ácido de partida	R _{2''}	R _{3''}	R _{4''}	R _{5''}	R _{6''}
a	OMe	OMe	OMe	H	H
b	H	OMe	OMe	OMe	H
c	OMe	H	OMe	OMe	H
d	OMe	OMe	H	OMe	H
e	H	OBz	OBz	OBz	H
f	OMe	OMe	H	H	H
g	OMe	H	OMe	H	H
h	OMe	H	H	H	OMe
i	H	OMe	OMe	H	H
j	H	OMe	H	OMe	H
k	OMe	H	H	H	H
l	H	OMe	H	H	H
m	H	H	OMe	H	H
n	H	H	H	H	H
o	H	Cl	H	H	H
p	F	H	H	H	H
q	H	H	Cl	H	H
r	Cl	H	Cl	H	H
s	Cl	H	H	Cl	H

IV.2.3a. 2,3,4-trimetoxibenzoato de 4-[(E)-2-(metoxicarbonil)-2-(7-cloroquinolin-4-iltio)vinil]fenilo (112a).



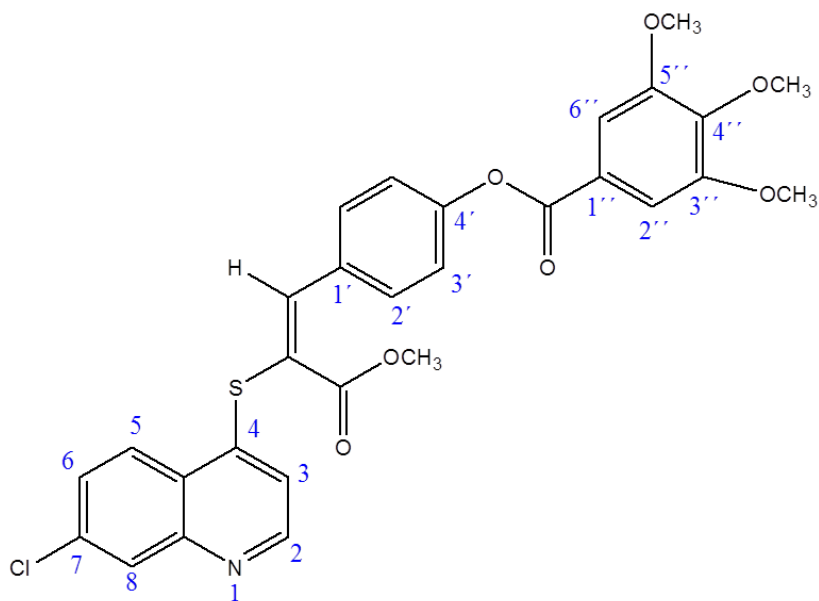
Sólido amarillo; Rendimiento 38%; Punto de Fusión 132-134°C; IR (Zn-Zr) cm^{-1} ; 1742, 1715, 1556, 1198, 1082. RMN^1H (CDCl_3) δ : 3.74 (s, 3H, OCH_3), 3.87 (s, 3H, OCH_3), 3.92 (s, 3H, OCH_3), 3.94 (s, 3H, OCH_3), 6.74 (d, 1H, $\text{H}_{5''}$, $J = 8.9$), 7.07 (d, 1H, H_3 , $J = 4.7$), 7.23 (d, 2H, $\text{H}_{3'}$, $J = 8.6$ Hz), 7.76 (d, 1H, $\text{H}_{6''}$, $J = 8.9$), 7.56 (dd, 1H, H_6 , $J = 9.5$ y 1.7 Hz), 7.90 (d, 2H, $\text{H}_{2'}$, $J = 8.6$ Hz), 8.16 (m, 2H, H_5 , H_8), 8.52 (s, 1H, =CH), 8.63 (d, 1H, H_2 , $J = 4.7$ Hz), RMN^{13}C (CDCl_3) δ : 53.68 (CO_2CH_3), 56.42 (OCH_3), 61.09 (OCH_3), 107 ($\text{C}_{5''}$, $\text{C}_{3'}$), 122 ($\text{C}_{2'}$), 125 (C_5) 128 (C_6 , C_8), 132 (C_b), 131 ($\text{C}_{6''}$), 143 ($\text{C}_{3''}$), 153 (C_1), 155 ($\text{C}_{1''}$, $\text{C}_{4''}$), 163 ($\text{C}=\text{O}$), 165 ($\text{C}=\text{O}$). EM (m/z): 566,06 (M+1), 506,06 (M-60), 194.95 (M-371).

Análisis: **$\text{C}_{29}\text{H}_{24}\text{ClN}_1\text{O}_7\text{S}$ PM: 566,022**

Calculado: **C 61.54 % H 4.27% N 2.47%**

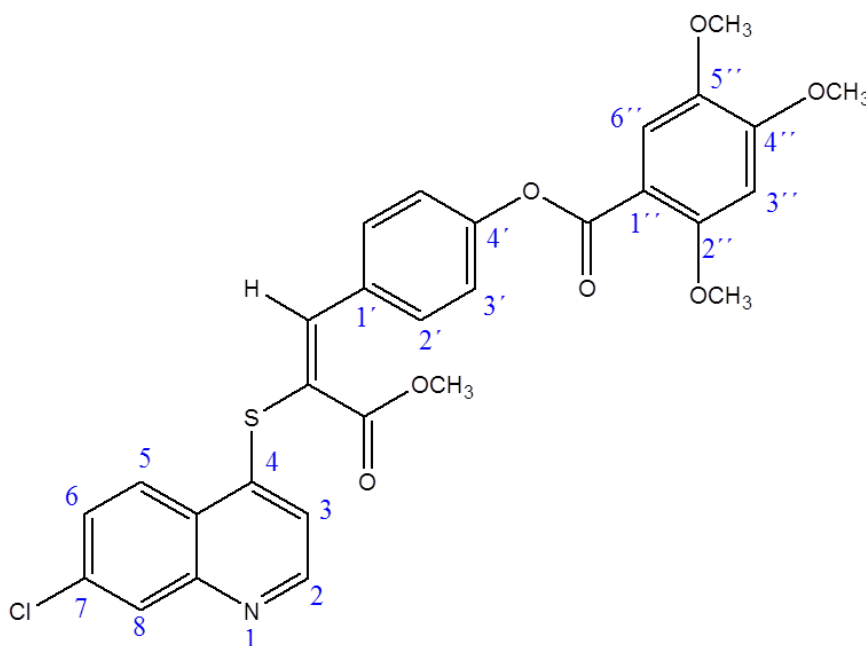
Encontrado: **C 61.87 % H 3.97% N 2.63%**

IV.2.3b. 3,4,5-trimetoxibenzoato de 4-[(E)-2-(metoxicarbonil)-2-(7-cloroquinolin-4-iltio)vinil]fenilo (112b).



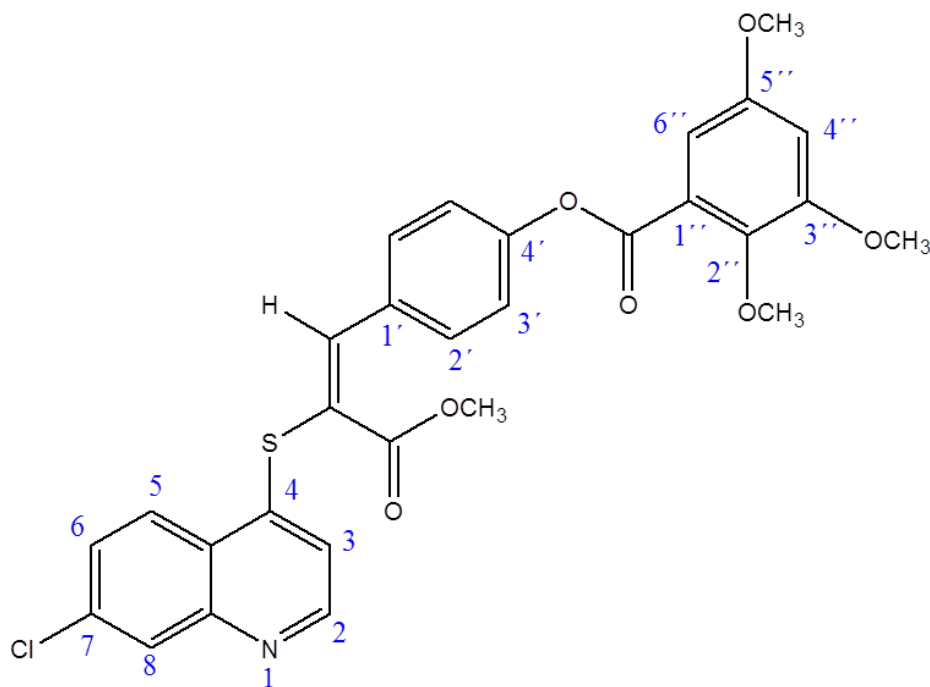
Sólido amarillo; Rendimiento 41%; Punto de Fusión 140-142°C; IR (Zn-Zr) cm^{-1} ; 1742, 1703, 1557, 1198, 1082. RMN^1H (CDCl_3) δ : 3.75 (s, 3H, OCH_3), 3.91 (s, 6H, OCH_3), 3.92 (s, 3H, OCH_3), 7.09 (d, 1H, H_3 , $J = 4.9$), 7.22 (d, 2H, H_3 , $J = 9.2$ Hz), 7.39 (s, 2H, $\text{H}_{2',6''}$), 7.59 (dd, 1H, H_6 , $J = 9.0$ y 2.0 Hz), 7.90 (d, 2H, H_2 , $J = 9.2$ Hz), 8.18 (d, 1H, H_5 , $J = 9.0$ Hz), 8.20 (d, 1H, H_8 , $J = 2.0$ Hz), 8.53 (s, 1H, =CH), 8.63 (d, 1H, H_2 , $J = 4.9$ Hz), RMN^{13}C (CDCl_3) δ : 53.68 ($\text{CO}_2\text{C}\underline{\text{H}}_3$), 56.42 (OCH_3), 61.09 (OCH_3), 107 (C_6), 122 (C_3, C_3), 125 ($\text{C}_{2'}$, C_5), 126 (C_8), 129 ($\text{C}_{2'}$), 152 (C_2), 164 ($\text{C}=\text{O}$), 165 ($\text{C}=\text{O}$). EM (m/z): 566,09 (M+1), 506,09 (M-60), 195,09 (M-371).

IV.2.3c. 2,4,5-trimetoxibenzoato de 4-[(E)-2-(metoxicarbonil)-2-(7-cloroquinolin-4-iltio)vinil]fenilo] (112c).



Sólido amarillo; Rendimiento 43%; Punto de Fusión 120-122°C; IR (Zn-Zr) cm^{-1} ; 1734, 1704, 1576, 1132, 1017. RMN¹H (CDCl₃) δ : 3.74 (s, 3H, OCH₃), 3.86 (s, 3H, OCH₃), 3.89 (s, 3H, OCH₃), 3.95 (s, 3H, OCH₃), 6.54 (s, 1H, H_{3''}), 7.08 (d, 1H, H₃, $J = 4.7$ Hz), 7.22 (d, 2H, H_{3'}, $J = 8.7$ Hz), 7.51 (s, 1H, H_{6''}), 7.57 (dd, 1H, H₆, $J = 8.8, 2.0$ Hz), 7.88 (d, 2H, H₂, $J = 8.6$ Hz), 8.17 (m, 2H, H₅, H₈), 8.53 (s, 1H, =CH), 8.62 (d, 1H, H₂, $J = 4.7$ Hz). RMN¹³C (CDCl₃) δ : 53 (OCH₃), 56 (OCH₃), 57 (OCH₃), 57 (OCH₃), 97 (C_{3''}), 112 (C₆), 166, 122 (C_{3'}), 125 (C_{6''}), 126 (=CH), 127 (C₃), 129 (C_{2''}), 132 (C_{2'}), 152 (C₂), 163 (ArC=O), 165 (H₃COC=O).

IV.2.3d. 2, 3, 5-trimetoxibenzoato de 4-[(E)-2-(metoxicarbonil)-2-(7-cloroquinolin-4-iltio) vinil]fenilo (112d).



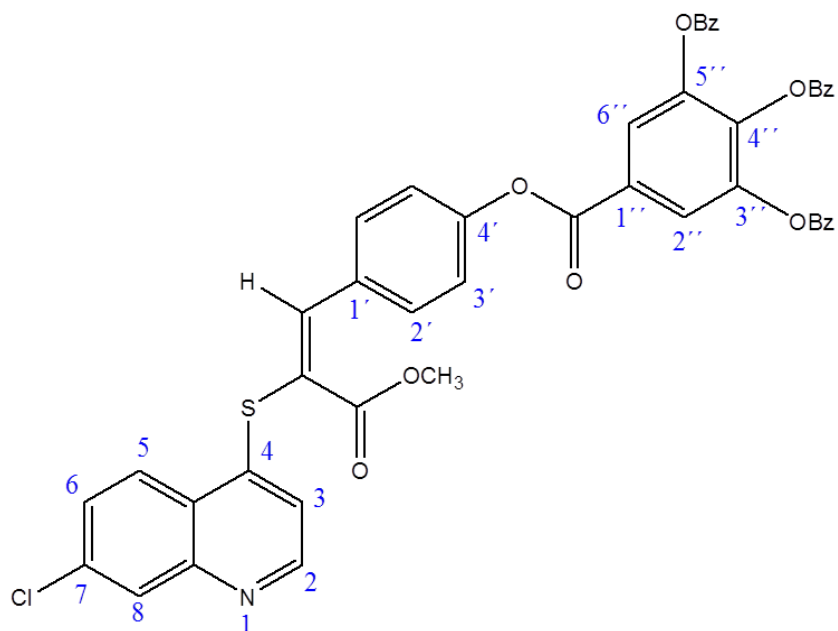
Sólido amarillo; Rendimiento 47 %; Punto de Fusión 152-154°C; IR (Zn-Zr) cm^{-1} : 1711, 1696, 1557, 1152, 1005. RMN¹H (CDCl_3) δ : 3.74 (s, 3H, OCH₃), 3.86 (s, 3H, OCH₃), 3.89 (s, 3H, OCH₃), 3.94 (s, 3H, OCH₃), 6.52 (s, 1H, H_{4''}), 7.10 (d, 1H, H₃, $J=4.7$ Hz), 7.20 (d, 2H, H₃, $J=8.7$ Hz), 7.32 (s, 1H, H_{6''}), 7.50 (dd, 1H, H₆, $J=8.9, 1.8$ Hz), 7.89 (d, 2H, H_{2'}, $J=8.4$ Hz), 8.16 (m, 2H, H₅, H₈), 8.52 (s, 1H, =CH), 8.62 (d, 1H, H₂, $J=4.7$ Hz). RMN¹³C (CDCl_3) δ : 53 (OCH₃), 56 (5''OCH₃), 57 (2''OCH₃, 3''OCH₃), 97 (C_{4''}), 108 (C_{5''}), 112 (C₆), 122 (C_{3'}), 122 (C_{6''}), 126 (=CH), 127 (C₃), 129 (C_{2''}), 132 (C_{2'}), 152 (C₂), 163 (ArC=O), 165 (H₃COC=O).

Análisis: **C₂₉H₂₄ClN₁O₇S** PM: 566,022

Calculado: C 61.54 % H 4.27% N 2.47%

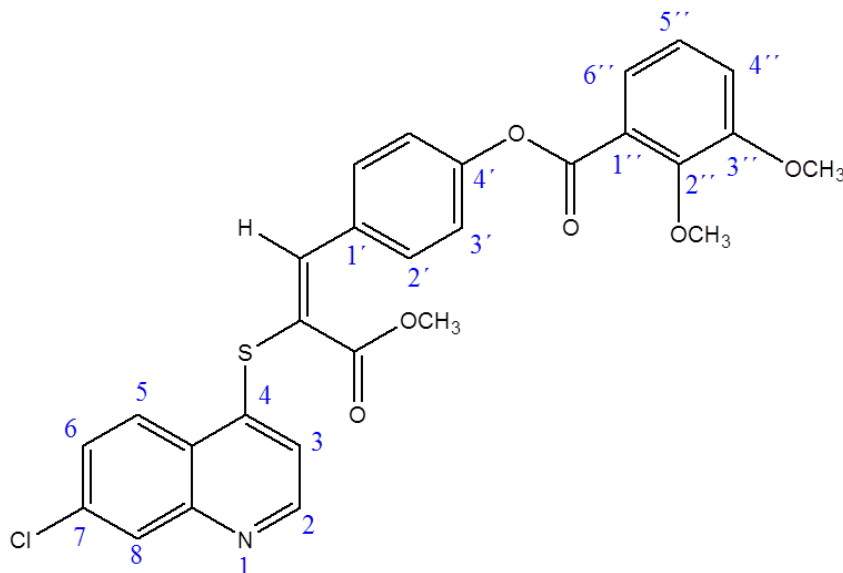
Encontrado: C 61.47 % H 4.33% N 2.72%

IV.2.3e. 3,4,5-trifeniloxibenzoato de 4-[(E)-2-(metoxicarbonil)-2-(7-cloroquinolin-4-iltio)vinil]fenilo (112e).



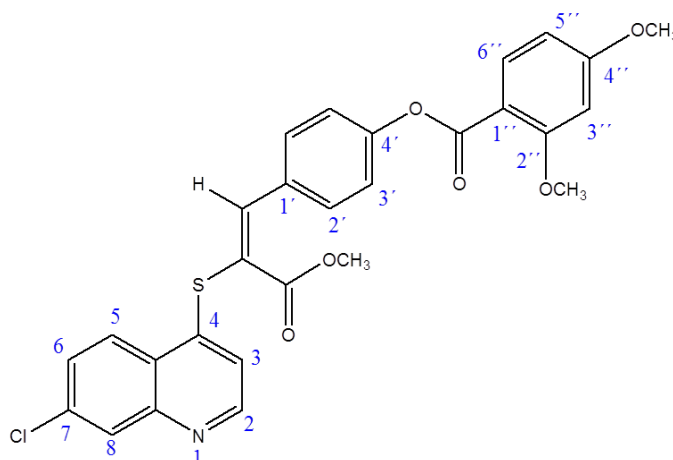
Sólido amarillo; Rendimiento 36%; Punto de Fusión 226-228°C; IR (Zn-Zr) cm⁻¹; 1730, 1703, 1584, 1557, 1121. RMN¹H (CDCl₃) δ: 3.76 (s, 3H, OCH₃), 5.13 (s, 6H, CH₂), 7.13 (d, 1H, H₃, *J*=4.7 Hz), 7.21 (d, 2H, H₃, *J*=8.1 Hz), 7.31(m, 15H, H_{Ph}), 7.46 (s, 2H, H₂, H₆), 7.60 (dd, 1H, H₆, *J*= 8.1, 1.9 Hz), 7.89 (d, 2H, H₂, *J*= 8.1 Hz), 8.21 (d, 1H, H₅, *J*= 8.1 Hz), 8.27 (d, 1H, H₈, *J*= 1.9 Hz), 8.55 (s, 1H, =CH), 8.66(d, 1H, H₂, *J*= 4.7 Hz). RMN¹³C (CDCl₃) δ: 54 (OCH₃), 75 (OCH₂), 112 (C₆), 122 (C₅, C₂, C₆), 128 (C_{Ph}), 126 (=CH), 127(C₃), 132 (C₂), 152 (C₂), 163 (ArC=O), 165 (H₃CO₂C=O). EM (m/z): 794,11 (M+1).

IV.2.3f. 2,3-dimetoxibenzoato de 4-[(E)-2-(metoxicarbonil)-2-(7-cloroquinolin-4-iltio)vinil]fenilo (112f).



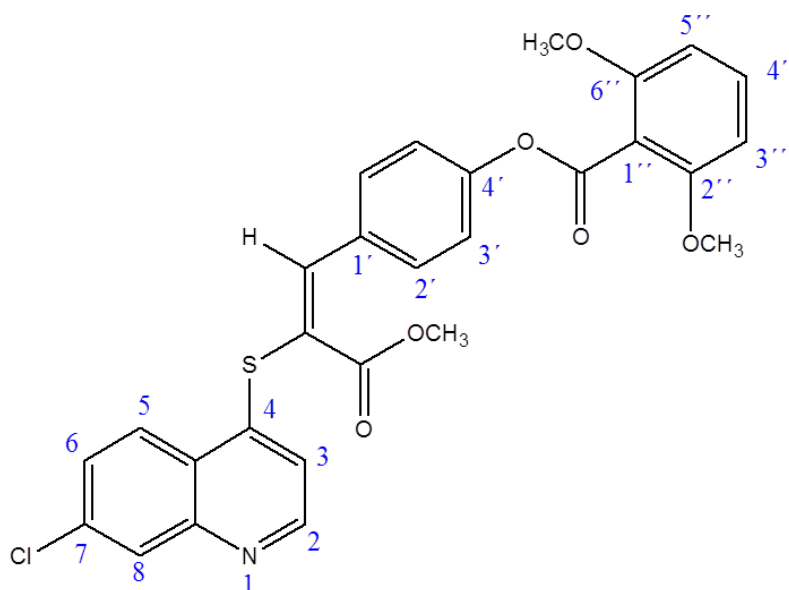
Sólido blanco; Rendimiento 50 %; Punto de Fusión 166-168°C; IR IR 1733, 1696, 1569, 1164, 1012. (Zn-Zr) cm^{-1} ; RMN¹H (CDCl₃) δ : 3.74 (s, 3H, OCH₃), 3.89 (s, 3H, OCH₃), 3.91 (s, 3H, OCH₃), 7.07 (d, 1H, H₃, J = 4.9 Hz), 7.12 (m, 1H, H_{4''}), 7.25 (d, 2H, H_{3'}, J = 8.1 Hz), 7.47 (m, H_{5''}, H_{6''}), 7.57 (dd, 1H, H₆, J = 9.0, 1.5 Hz), 7.90 (d, 2H, H₂, J = 8.4 Hz), 8.16 (m, 2H, H₅, H₈), 8.52 (s, 1H, =CH), 8.64 (d, 1H, H₂, J = 4.7 Hz). RMN¹³C (CDCl₃) δ : 53 (H₃COC=O), 56 (2'',6''OCH₃), 1076(C_{4'}), 107 (C_{2'},C_{6''}), 117 (C₃), 123(C_{3'}), 127 (=CH), 128(C₅ C₈), 132(C_{2'}), 135(C_{6''}), 152 (C₂), 164 (ArC=O), 166 (H₃COC=O).

IV.2.3g. 2,4-dimetoxibenzoato de 4-[(E)-2-(metoxicarbonil)-2-(7-cloroquinolin-4-iltio)vinil]fenilo (112g).



Sólido blanco; Rendimiento 50%; Punto de Fusión 130-132°C; IR (Zn-Zr) cm^{-1} : 1730, 1696, 1568, 1163, 1013. RMN¹H (CDCl₃) δ : 3.73 (s, 3H, OCH₃), 3.88 (s, 3H, OCH₃), 3.86 (s, 3H, OCH₃), 6.51 (m, 2H, H_{3''}, H_{5''}), 7.08 (d, 1H, H₃, $J = 4.9$ Hz), 7.22 (d, 2H, H_{3'}, $J = 8.1$ Hz), 8.00 (d, 1H, H_{6''}, $J = 8.1$ Hz), 7.56 (dd, 1H, H₆, $J = 9.0, 1.5$ Hz), 7.88 (d, 2H, H_{2'}, $J = 8.4$ Hz), 8.15 (m, 2H, H₅, H₈), 8.51 (s, 1H, =CH), 8.61 (d, 1H, H₂, $J = 4.7$ Hz). RMN¹³C (CDCl₃) δ : 53 (OCH₃), 55(4''OCH₃) 57 (2''OCH₃), 99 (C_{5'}), 105 (C_{3''}), 117 (C₃), 123(C_{3'}), 128 (=CH), 128(C₅ C₈), 132(C_{2'}), 135(C_{6''}), 152 (C₂), 163 (ArC=O), 165 (H₃COC=O).

IV.2.3h. 2,6-dimetoxibenzoato de 4-[(E)-2-(metoxicarbonil)-2-(7-cloroquinolin-4-iltio)vinil]fenilo (112h).



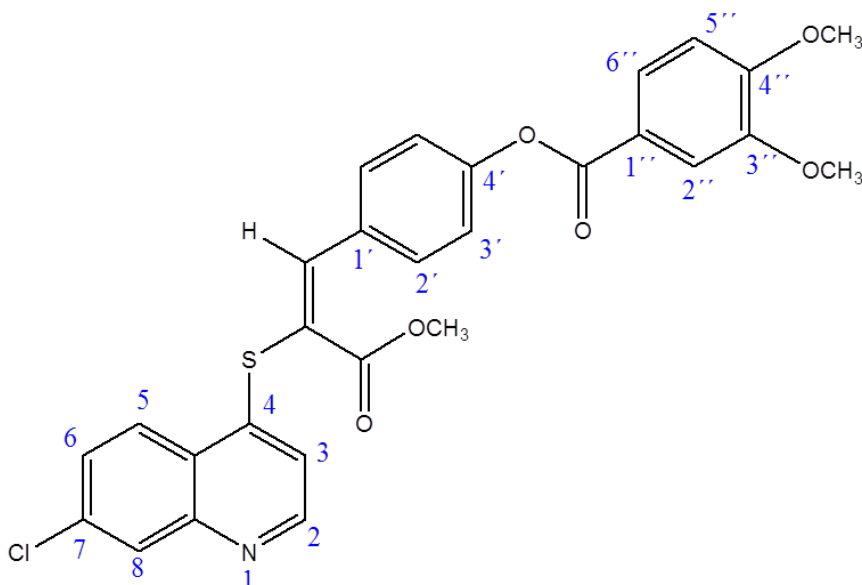
Sólido blanco; Rendimiento 51 %; Punto de Fusión 200-202°C; IR 1732, 1696, 1569, 1164, 1012. (Zn-Zr) cm^{-1} ; RMN¹H (CDCl₃) δ : 3.75 (s, 3H, OCH₃), 3.84 (s, 6H, OCH₃), 6.58 (d, 2H, H_{3''}, H_{5''}, J = 8.7 Hz), 7.06 (d, 1H, H₃, J = 4.9 Hz), 7.29 (m, 4H, H_{3'}, H_{4''}), 7.56 (dd, 1H, H₆, J = 9.0, 1.5 Hz), 7.89 (d, 2H, H_{2'}, J = 8.1 Hz), 8.15 (m, 2H, H₅, H₈), 8.51 (s, 1H, =CH), 8.61 (d, 1H, H₂, J = 4.7 Hz). RMN¹³C (CDCl₃) δ : 53 (H₃COC=O), 57 (2'', 6'' OCH₃), 99 (C_{3''}, C_{5''}, C_{4''}), 105 (C_{3''}), 117 (C₃), 123 (C_{3'}), 128 (=CH), 128 (C₅, C₈), 132 (C_{2'}), 135 (C_{6''}), 152 (C₂), 163 (ArC=O), 165 (H₃COC=O).

Análisis: **C₂₈H₂₂ClN₀S** PM: 535,996

Calculado: **C** 62.74 % **H** 4.14% **N** 2.61%

Encontrado: **C** 62.98 % **H** 4.46% **N** 2.99%

IV.2.3i. 3,4-dimetoxibenzoato de 4-[(E)-2-(metoxicarbonil)-2-(7-cloroquinolin-4-iltio)vinil]fenilo (112i).



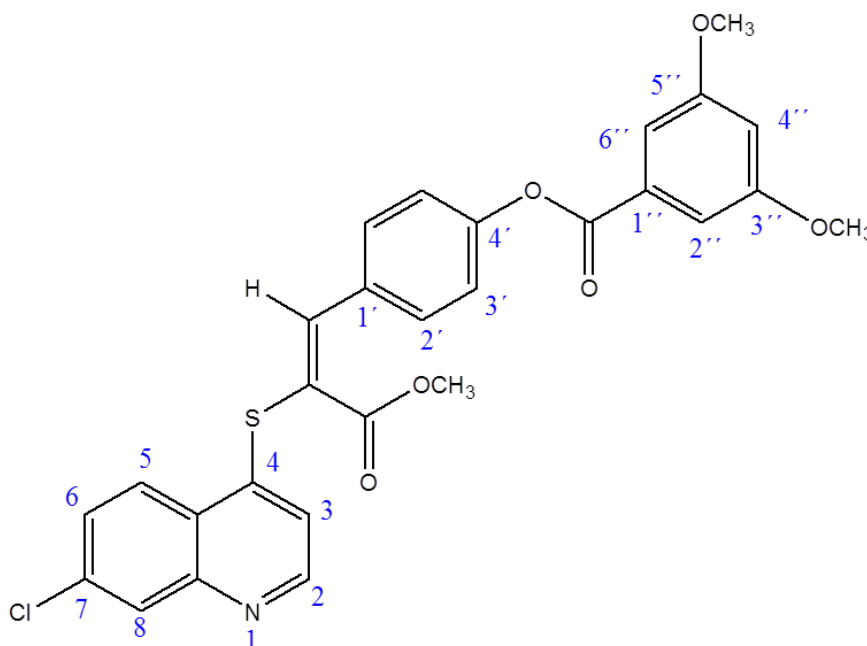
Sólido blanco; Rendimiento 35%; Punto de Fusión 178-180°C; IR (Zn-Zr) cm^{-1} ; 1711, 1696, 1545, 1175, 1074. RMN¹H (CDCl₃) δ : 3.73 (s, 3H, OCH₃), 3.84 (s, 6H, OCH₃), 6.92 (d, 1H, H_{5''}, $J = 8.1$ Hz), 7.09 (d, 1H, H₃, $J = 4.7$ Hz), 7.22 (d, 2H, H₃, $J = 8.4$ Hz), 7.58 (m, 2H, H₆, H_{2''}), 7.80 (d, 1H, H_{6''}, $J = 7.4$ y 1.7 Hz), 7.89 (d, 2H, H_{2'}, $J = 8.4$ Hz), 8.16 (m, 2H, H₅, H₈), 8.52 (s, 1H, =CH), 8.63 (d, 1H, H₂, $J = 4.5$ Hz). RMN¹³C (CDCl₃) δ : 53 (OCH₃), 56 (3''OCH₃, 4''OCH₃), 97 (C_{3'}), 110 (C_{5''}), 112 (C₆), 122 (C_{3'}), 125 (C_{6''}), 126 (=CH), 127 (C₃), 129 (C_{2''}), 132 (C_{2'}), 152 (C₂), 163 (ArC=O), 165 (H₃COC=O).

Análisis: **C₂₈H₂₂ClN₀S** PM: 535,996

Calculado: C 62.74 % H 4.14% N 2.90%

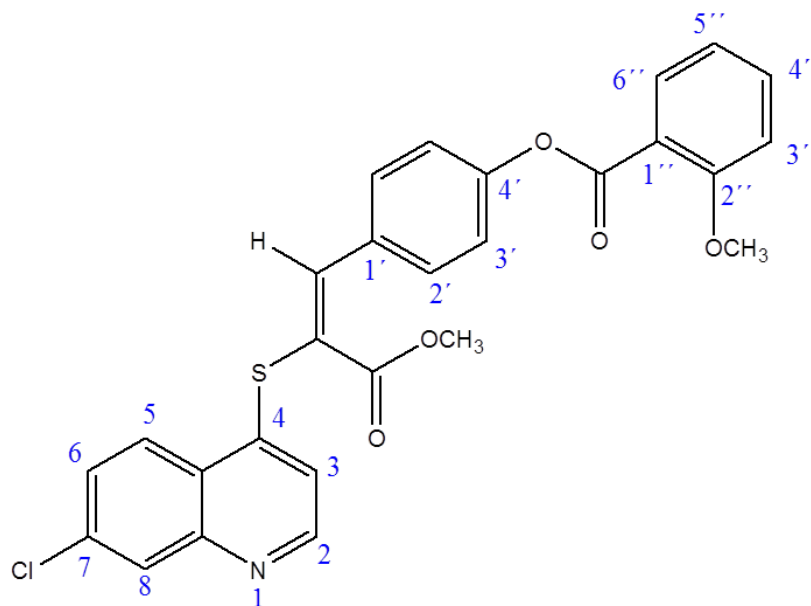
Encontrado: C 63.02 % H 4.39% N 2.99%

IV.2.3j. 3,5-dimetoxibenzoato de 4-[(E)-2-(metoxicarbonil)-2-(7-cloroquinolin-4-iltio)vinil]fenilo (112j).



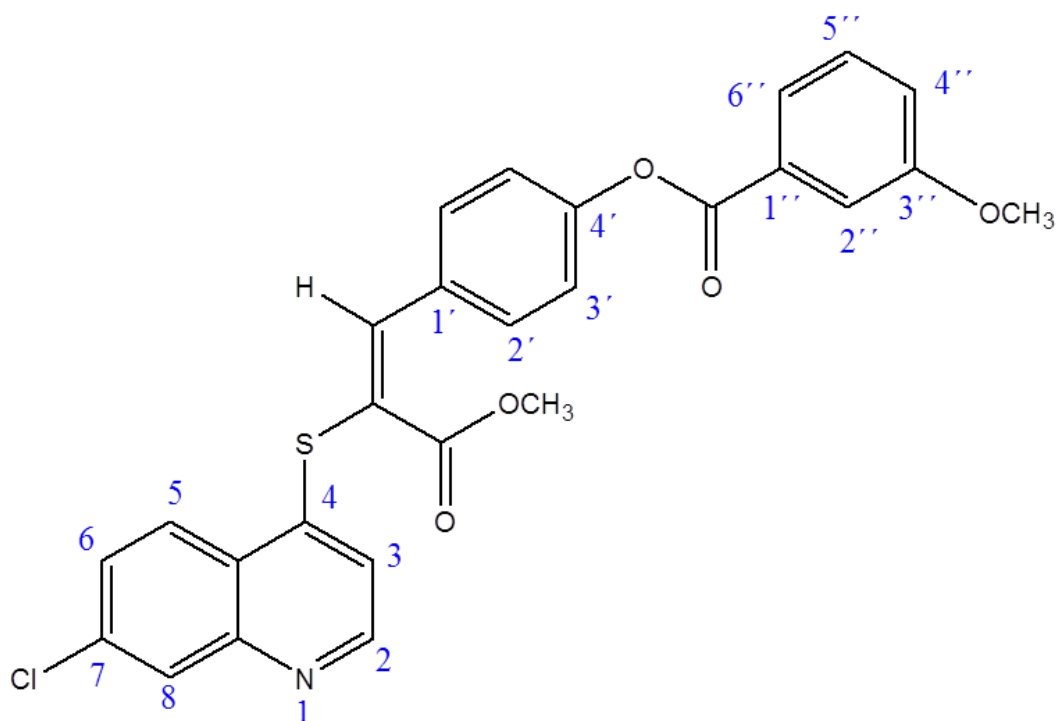
Sólido blanco; Rendimiento 47%; Punto de Fusión 198-200°C; IR 1728, 1696, 1568, 1165, 1015. (Zn-Zr) cm^{-1} ; RMN¹H (CDCl₃) δ : 3.75 (s, 3H, OCH₃), 3.83 (s, 6H, OCH₃), 6.70 (s, 1H, H_{4''}), 7.10 (d, 1H, H₃, $J = 4.9$ Hz), 7.23 (d, 2H, H_{3'}, $J = 8.1$ Hz), 7.27 (s, 2H, H_{2''}, H_{6''}), 7.59 (dd, 1H, H₆, $J = 9.0, 1.5$ Hz), 7.90 (d, 2H, H₂, $J = 8.4$ Hz), 8.19 (m, 2H, H₅, H₈), 8.54 (s, 1H, =CH), 8.63 (d, 1H, H₂, $J = 4.7$ Hz). RMN¹³C (CDCl₃) δ : 53 (H₃COC=O), 56 (3'',5''OCH₃), 106 (C_{4''}), 117 (C₃), 122 (C_{2'}-C_{6''}), 123(C_{3'}), 127 (=CH), 128(C₆), 132(C_{2'}), 152 (C₂), 164 (ArC=O), 166 (H₃COC=O).

IV.2.3k. 2-metoxibenzoato de 4-[(E)-2-(metoxicarbonil)-2-(7-cloroquinolin-4-iltio)vinil]fenilo (112k).



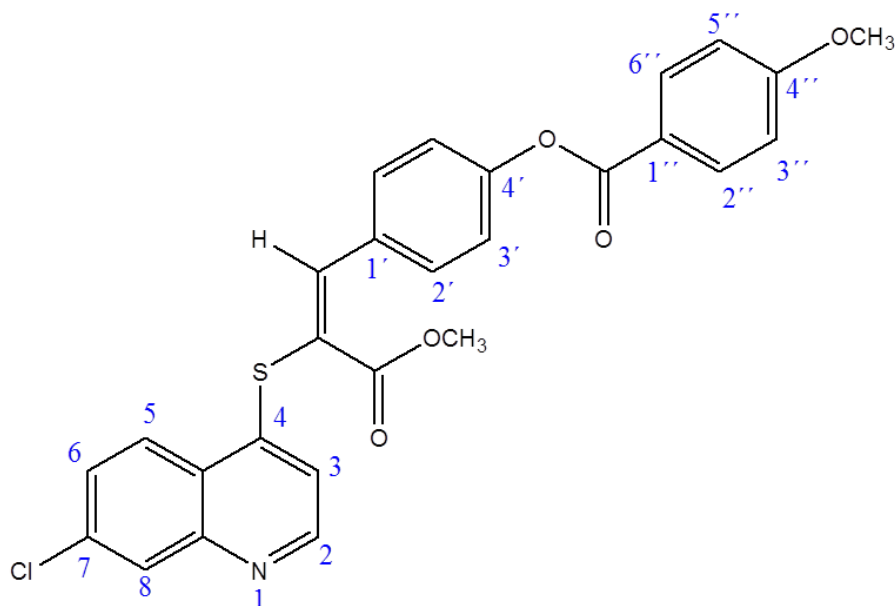
Sólido blanco; Rendimiento 53%; Punto de Fusión 148-150°C; IR (Zn-Zr) cm^{-1} ; 1734, 1703, 1580, 1198, 1105. RMN^1H (CDCl_3) δ : 3.75 (s, 3H, OCH_3), 3.90 (s, 3H, OCH_3), 7.02 (m, 2H, $\text{H}_{4''}$, $\text{H}_{5''}$), 7.10 (d, 1H, H_3 , $J= 4.9$ Hz), 7.24 (m, 2H, $\text{H}_{5''}$, $\text{H}_{3''}$), 7.55 (m, 2H, $\text{H}_{3''}$, H_6), 7.89 (d, 2H, $\text{H}_{2'}$, $J= 8.4$ Hz), 7.97 (dd, 2H, $\text{H}_{6''}$, $J= 8.4$, 1.6 Hz), 8.16 (m, 2H, H_5 , H_8), 8.54 (s, 1H, =CH), 8.62 (d, 1H, H_2 , $J= 4.7$ Hz). RMN^{13}C (CDCl_3) δ : 53 ($\text{H}_3\text{C}\text{C}=\text{O}$), 56 ($2''\text{OCH}_3$), 107 ($\text{C}_{4'}$), 107 ($\text{C}_{2''}\text{C}_{6''}$), 117 (C_3), 123 ($\text{C}_{3'}$), 127 (=CH), 128 (C_5 C_8), 132 ($\text{C}_{2'}$), 135 ($\text{C}_{6''}$), 152 (C_2), 164 ($\text{ArC}=\text{O}$), 166 ($\text{H}_3\text{COC}=\text{O}$). EM (m/z): 506,08 (M+1).

IV.2.3I. 3-metoxibenzoato de 4-[(E)-2-(metoxicarbonil)-2-(7-cloroquinolin-4-iltio)vinil]fenilo (112I).



Sólido blanco; Rendimiento 53 %; Punto de Fusión 154-156°C; IR (Zn-Zr) cm^{-1} : 1732, 1706, 1580, 1196, 1105. RMN^1H (CDCl_3) δ : 3.75 (s, 3H, OCH_3), 3.90 (s, 3H, OCH_3), 7.02 (m, 2H, $\text{H}_{4''}$, $\text{H}_{5''}$), 7.10 (d, 1H, H_3 , $J = 4.9$ Hz), 7.12 (m, 1H, $\text{H}_{4''}$), 7.24 (m, 2H, $\text{H}_{5''}$, $\text{H}_{3''}$), 7.59 (dd, 1H, H_6 , $J = 9.0, 1.5$ Hz), 7.89 (d, 2H, $\text{H}_{2'}$, $J = 8.4$ Hz), 7.97 (m, 2H, $\text{H}_{6''}$, $\text{H}_{2''}$), 8.16 (m, 2H, H_5 , H_8), 8.54 (s, 1H, =CH), 8.62 (d, 1H, H_2 , $J = 4.7$ Hz). RMN^{13}C (CDCl_3) δ : 53 ($\text{H}_3\text{COC=O}$), 56 ($3''\text{OCH}_3$), 106 ($\text{C}_{4''}$), 107 ($\text{C}_{2''}\text{C}_{6''}$), 117 (C_3), 123 ($\text{C}_{3'}$), 127 (=CH), 128 (C_5 C_8), 132 ($\text{C}_{2'}$), 135 ($\text{C}_{6''}$), 152 (C_2), 164 (ArC=O), 166 ($\text{H}_3\text{COC=O}$).

IV.2.3m. 4-metoxibenzoato de 4-[(E)-2-(metoxicarbonil)-2-(7-cloroquinolin-4-iltio)vinil]fenilo (112m).



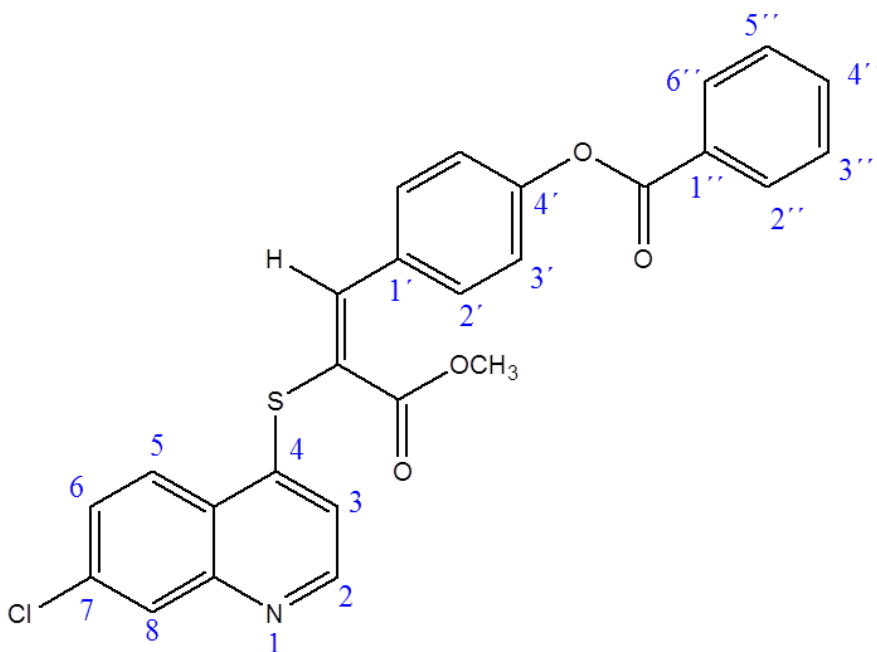
Sólido blanco; Rendimiento 37%; Punto de Fusión 130-132°C; IR (Zn-Zr) cm^{-1} : 1734, 1703, 1580, 1198, 1105. RMN^1H (CDCl_3) δ : 3.74 (s, 3H, OCH_3), 3.86 (s, 3H, OCH_3), 6.94 (d, 1H, $\text{H}_{3''}$, $J = 8.1$ Hz), 7.11 (d, 1H, H_3 , $J = 4.9$ Hz), 7.22 (d, 2H, H_3 , $J = 8.1$ Hz), 7.59 (dd, 1H, H_6 , $J = 9.04, 1.9$ Hz), 7.88 (d, 2H, H_2 , $J = 8.1$ Hz), 8.08 (d, 2H, H_2'' , $J = 8.1$ Hz), 8.20 (m, H_5, H_8), 8.54 (s, 1H, =CH), 8.61 (d, 1H, H_2 , $J = 4.9$ Hz), RMN^{13}C (CDCl_3) δ : 53 (CO_2CH_3), 56 (OCH_3), 61 (OCH_3), 107 (C_6), 122 (C_3, C_3'), 125 (C_2'', C_5), 126 (C_8), 129 (C_2'), 152 (C_2), 164.29 ($\text{C}=\text{O}$), 165.59 ($\text{C}=\text{O}$).

Análisis: $\text{C}_{27}\text{H}_{20}\text{ClN}_2\text{O}_5\text{S}$ PM: 505,970

Calculado: C 64.09 % H 3.98% N 2.77%

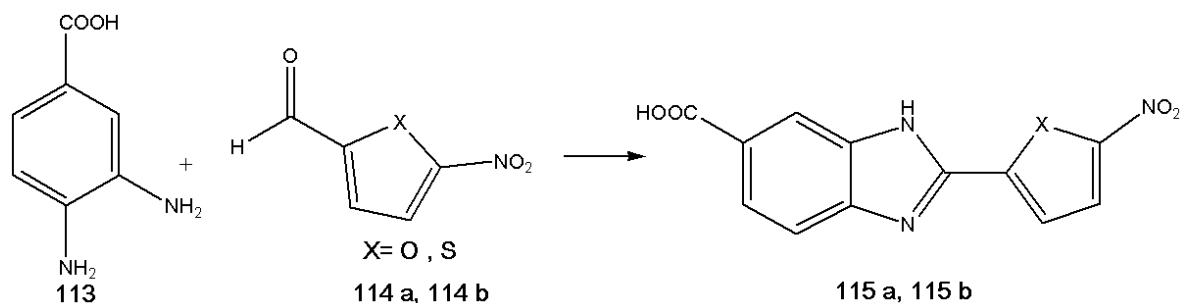
Encontrado: C 63.81 % H 4.15% N 3.01%

IV.2.3n. Benzoato de 4-[(E)-2-(metoxicarbonil)-2-(7-cloroquinolin-4-iltio)vinil]fenilo (112n).



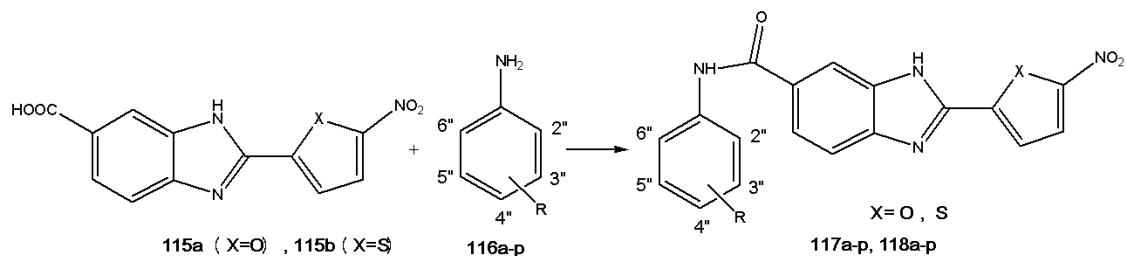
Sólido blanco; Rendimiento 50%; Punto de Fusión 138-140°C; IR (Zn-Zr) cm^{-1} : 1734, 1692, 1568, 1165, 1015. RMN¹H (DMSO-d₆): 3.65 (s, 3H, OCH₃), 7.14 (d, 1H, H₃, $J = 4.9$ Hz), 7.31 (dd, 1H, H_{4''}, $J = 8.4, 1.4$ Hz), 7.24 (m, 3H, H_{3'}, H_{5''}, H_{3''}), 7.66 (dd, 1H, H₆, $J = 9.0, 1.5$ Hz), 7.89 (d, 2H, H_{2'}, $J = 8.4$ Hz), 7.97 (dd, 2H, H_{2''}, H_{6''}, $J = 8.4, 1.7$ Hz), 8.16 (m, 2H, H₅, H₈), 8.56 (s, 1H, =CH), 8.64 (d, 1H, H₂, $J = 4.7$ Hz). RMN¹³C (DMSO-d₆) δ : 53 (H₃COC=O), 107 (C_{2'}C_{6''}), 117 (C₃), 123(C_{3'}), 127 (=CH), 128(C₅ C₈), 132(C₂), 135(C_{6''}), 152 (C₂), 166 (ArC=O), 166 (H₃COC=O).EM (m/z): 476,06 (M+1).

IV.2.4. Síntesis general para los ácidos 2-(5-nitrofuran/tiofen-2-il)-3H-benzo[d]imidazol-6-carboxílico (115a, 115b).



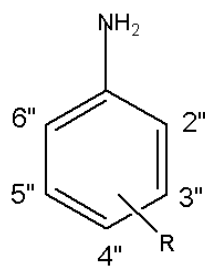
En un balón provisto de 2 bocas y un sistema de agitación se disolvieron 3,30 mmol de ácido 3,4-diaminobenzoico, 2,24 mmol de p-hidroquinona y 3,26 mmol del correspondiente carbaldehído: 5-nitrofuran-2-carbaldehído ó 5-nitrotiofen-2-carbaldehído en 40 mL de etanol seco, la reacción se reflujo por 24 h. La mezcla de reacción se dejó reposar y se le agregó hielo. El sólido resultante se filtró y lavó con suficiente agua destilada, secado y recristalizado de etanol. El punto de fusión para cada compuesto, así como los análisis espectroscópicos se relacionan con los reportados previamente por nuestro grupo.¹³⁸

IV.2.5. Procedimiento general para la síntesis de 2-(5-nitrofuran-2-il)-*N*-fenil-3*H*-benzo[*d*]imidazol-6-carboxamidas (117a-p, 118a-p).



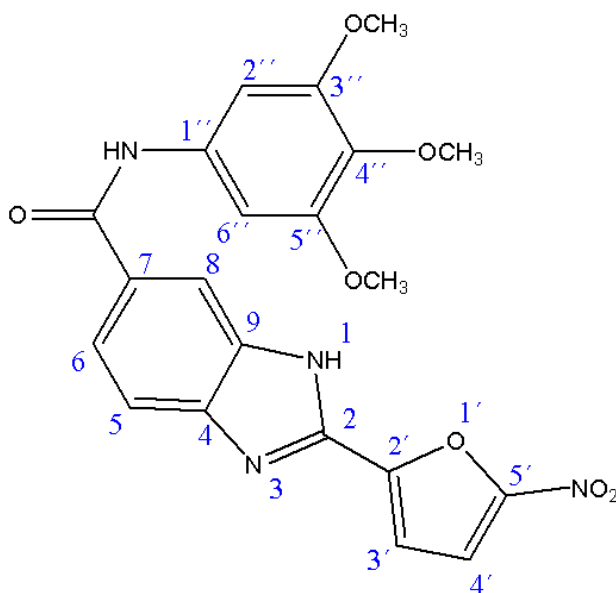
En un balón de dos bocas provisto de un agitador y bajo atmosfera inerte, en un baño de hielo se disolvieron 0,37 mmol de **115a-b** y 0,97 mmol de EDCI en 10 mL de DMF seca, al término de 1 h se adicionó 0,5 mmol de la anilina correspondiente (tabla III) y 0,10 mmol de DMAP, la mezcla se agitó a temperatura ambiente por 48 h. Se agregó agua para detener la reacción, el sólido resultante se lavo con NaOH (10%) y se recristalizó en etanol. El producto recristalizado fue lavado con éter dietílico y se seco a vacío.

Tabla III. Anilinas de partida **116a-p**



Anilina de partida 116	R_2''	R_3''	R_4''	R_5''	R_6''
a	H	OMe	OMe	OMe	H
b	OMe	H	OMe	H	H
c	H	OMe	H	H	H
d	Me	H	Me	H	H
e	Me	H	H	Me	H
f	H	Me	Me	H	H
g	H	Me	H	Me	H
h	H	Me	H	H	H
i	H	H	Me	H	H
j	NO_2	H	OMe	H	H
k	H	Cl	OMe	H	H
l	OMe	H	H	Cl	H
m	Cl	H	H	H	H
n	H	H	Cl	H	H
o	H	H	Br	H	H
p	H	CF_3	H	H	H

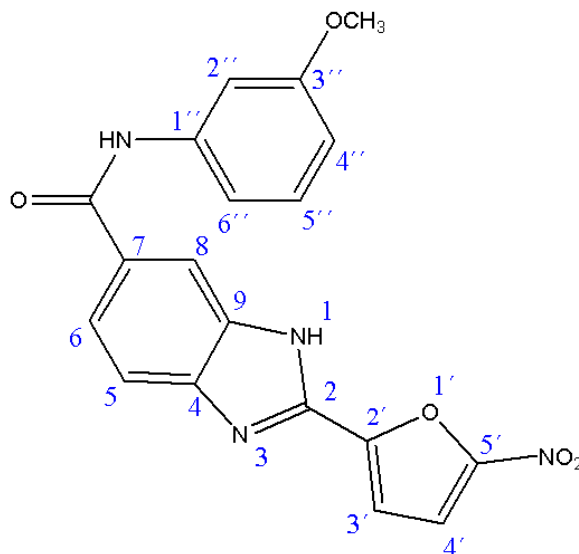
IV.2.5.a N-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-(5-nitrofuran-2-il)-3H-benzo[d]imidazol-5-carboxamida (117a)



Sólido marrón; Rendimiento 55%; Punto de Fusión >300°C; IR (KBr) cm^{-1} : 1678 cm^{-1} (C=O), 3500 cm^{-1} (NH) RMN¹H (DMSO-d₆, 270 Hz): 3.64 (s, 3H, 4''OCH₃), 3.78 (s, 6H, 3'', 5''OCH₃), 7.27 (s, 2H, H_{2''}, H_{6''}), 7.74 (d, 1H, H₅, $J = 8.6$ Hz), 7.90 (m, 2H, H₆, H_{3'}), 8.25 (d, 1H, H_{4'}, $J = 4.4$ Hz), 8.29 (s, 1H, H₈), 10.18 (s, 1H, NH).

RMN¹³C (DMSO-d₆) δ : 56 (3'', 5''OCH₃), 61 (4''OCH₃), 99 (C_{2''}, C_{6''}), 124, 126, 130 (C₆), 131, 134, 136 (C₈), 151, 153, 166 (NHC=O).

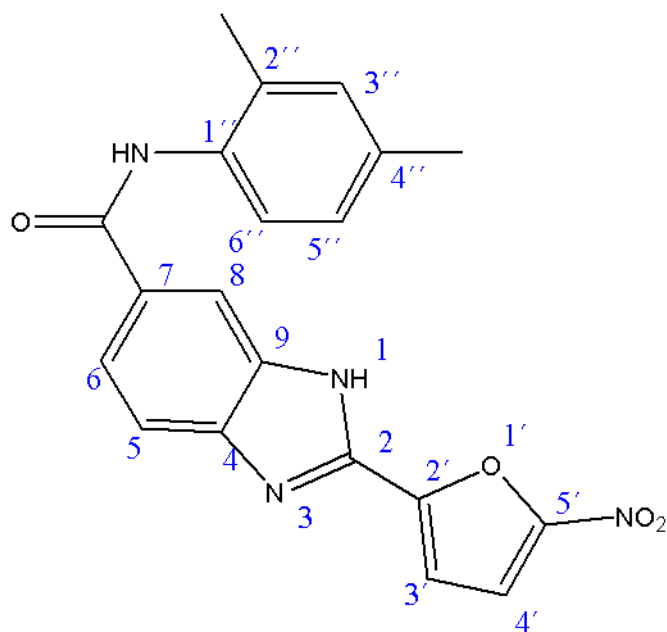
IV.2.5.c *N*-(3-metoxifenil)-2-(5-nitrofuran-2-il)-3*H*-benzo[*d*]imidazol-5-carboxamida (117c)



Sólido verde; Rendimiento 45%; Punto de Fusión >300°C; IR (KBr) cm^{-1} : 1652 ($\text{C}=\text{O}$), 3578 (NH) RMN^1H (DMSO- d_6 , 270 Hz): 3.76 (s, 3H, 3''OCH₃), 6.67 (d, 1H, H_{4''}, $J = 8.2\text{Hz}$), 7.25 (t, 1H, H_{5''}, $J = 8.2\text{Hz}$), 7.40 (d, 1H, H_{6''}, $J = 7.4\text{Hz}$), 7.51 (s, 1H, H_{2''}), 7.74 (d, 1H, H₅, $J = 8.2\text{Hz}$), 7.89 (m, 2H H₆, H₃), 8.24 (d, 1H, H₄, $J = 3.7\text{Hz}$), 8.28 (sa, 1H, H₈), 10.24 (s, 1H, NH).

RMN^{13}C (DMSO- d_6) δ : 56 (3''OCH₃), 107 (C_{2''}), 110 (C_{4''}), 113 (C_{6''}), 123, 126, 130 (C_{5''}), 131 (C₈), 141, 147, 152, 160, 165 (NH-C=O). EM (m/z): 377, 11 (M-1).

IV.2.5.d *N*-(2,4-dimetilfenil)-2-(5-nitrofuran-2-il)-3*H*-benzo[*d*]imidazol-5-carboxamida (117d)



Sólido verde; Rendimiento 40%; Punto de Fusión >300°C; IR (KBr) cm^{-1} : 1652 cm^{-1} (C=O), 3570 cm^{-1} (NH) RMN¹H (DMSO-d₆, 270 Hz): 2.22 (s, 3H, 4''CH₃), 2.29 (s, 3H, 2''CH₃), 7.02 (d, 1H, H_{5''}, *J* = 8.2 Hz), 7.08 (s, 1H, H_{3''}) 7.22 (d, 1H, H_{6''}, *J* = 8.1 Hz), 7.55 (d, 1H, H_{3'}, *J* = 4.0 Hz), 7.73 (d, H₅, *J* = 8.2 Hz), 7.90 (m, 2H, H₆, H_{4'}), 8.30 (s, 1H, H₈), 9.80 (s, 1H, NH).

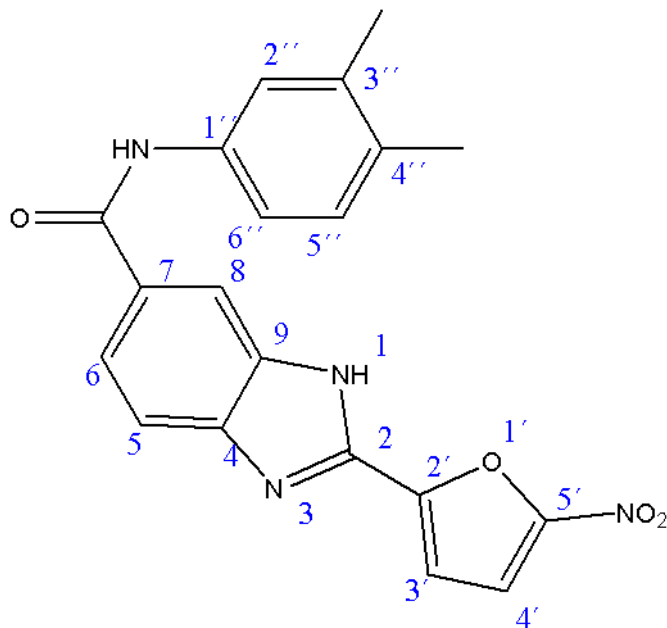
RMN¹³C (DMSO-d₆) δ : 18 (4''CH₃), 21 (2''CH₃), 110 (C_{6''}), 127, 131 (C₆), 165 (NH-C=O).

Análisis: **C₂₀H₁₆N₄O₄** **PM: 376.366**

Calculado: **C 63.82% H 4.28% N 14.89%**

Encontrado: **C 64.12 % H 4.63% N 15.27 %**

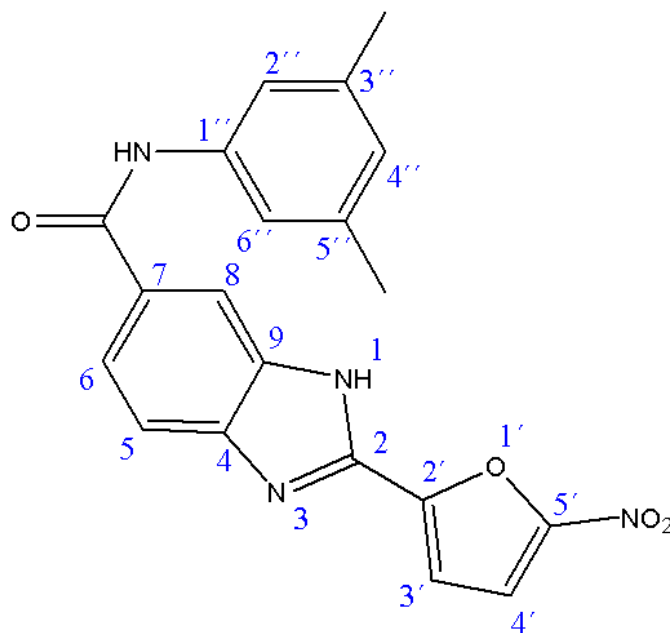
IV.2.5.f *N*-(3,4-dimetilfenil)-2-(5-nitrofuran-2-il)-3*H*-benzo[*d*]imidazol-5-carboxamida (117f)



Sólido marrón; Rendimiento 45%; Punto de Fusión >300°C; IR (KBr) cm^{-1} : 1650 ($\text{C}=\text{O}$), 3568 (NH) RMN^1H (DMSO- d_6 , 270 Hz): 2.19 (s, 3H, 3'' CH_3), 2.22 (s, 3H, 4'' CH_3), 7.10 (d, 1H, $\text{H}_{5''}$, $J = 7.9$ Hz), 7.54 (m, 3H, $\text{H}_{2''}, \text{H}_3, \text{H}_{6''}$), 7.73 (d, 1H, H_5 , $J = 8.6$ Hz), 7.91 (m, 2H, $\text{H}_6, \text{H}_{4'}$) 8.27 (s, 1H, H_8), 10.15 (s, 1H, NH).

RMN^{13}C (DMSO- d_6) δ : 19 (4'' CH_3), 20 (3'' CH_3), 99 ($\text{C}_{2''}\text{C}_{6''}$), 114, 115, 118, 122, 130, 131 (C_6), 137, 165 ($\text{NHC}=\text{O}$). EM (m/z): 375,07 (M-1).

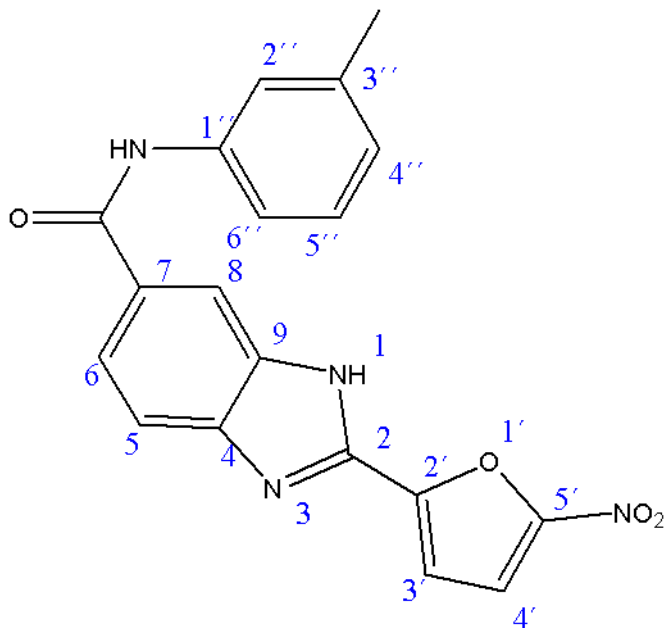
IV.2.5.g *N*-(3,5-dimetilfenil)-2-(5-nitrofuran-2-il)-3*H*-benzo[*d*]imidazol-5-carboxamida (117g)



Sólido marrón; Rendimiento 39%; Punto de Fusión >300°C; IR (KBr) cm^{-1} : 1650 cm^{-1} (C=O), 3565 cm^{-1} (NH). RMN¹H (DMSO-d₆, 270 Hz): 2.28 (s, 6H, 3'',5''CH₃), 6.75 (s, 1H, H_{4''}), 7.44 (s, 2H, H_{2''}, H_{6''}), 7.56 (d, 1H, H_{3'}, *J*=3.5Hz), 7.73 (d, 1H, H_{5'}, *J*= 8.4Hz), 7.91 (m, 2H, H_{4'}, H₆), 8.28 (s, 1H, H₈), 10.14 (s, 1H, NH).

RMN¹³C (DMSO-d₆) δ : 22 (3'',5''CH₃), 99 (C_{2''}C_{6''}), 131(C₆), 163(NHC=O).

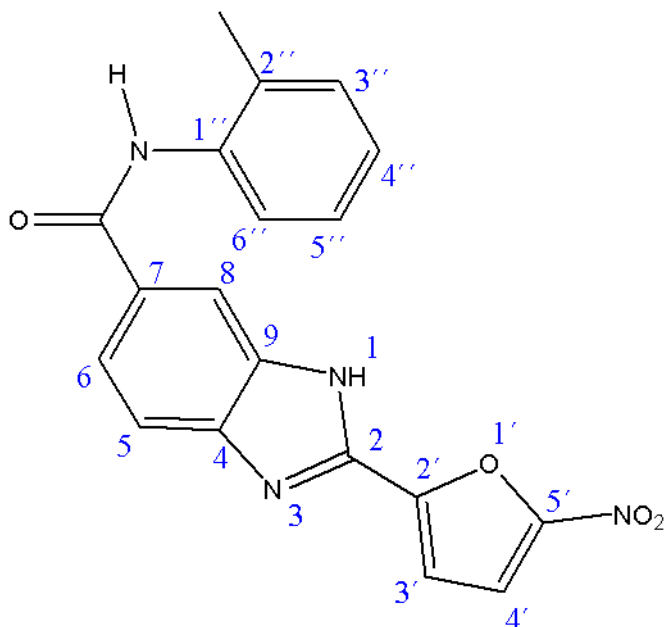
IV.2.5.h *N*-(3-metilfenil)-2-(5-nitrofuran-2-il)-3*H*-benzo[*d*]imidazol-5-carboxamida (117h)



Sólido marrón; Rendimiento 37%; Punto de Fusión >300°C; IR (KBr) cm^{-1} : 1650 cm^{-1} (C=O), 3565 cm^{-1} (NH). RMN¹H (DMSO-*d*₆, 270 Hz): 2.23 (s, 3H, 3'' CH₃), 7.10 (d, 1H, H_{4''}, *J* = 8.2 Hz), 7.50 (d, 1H, H_{5''}, *J* = 8.2 Hz), 7.58 (s, 1H, H_{2''}), 7.72 (d, 1H, H₅, *J* = 8.6 Hz), 7.90 (m, 3H, H₆, H_{3'}, H_{6''}), 8.22 (d, H_{4'}, *J* = 3.9 Hz), 8.28 (s, 1H, H₈), 10.01 (s, 1H, NH).

RMN¹³C (DMSO-*d*₆) δ : 22 (3''CH₃), 112 (C₂'C₆''), 120, 123, 124, 126, 127, 128, 131 (C₆), 141, 147, 152, 163 (NH-C=O).

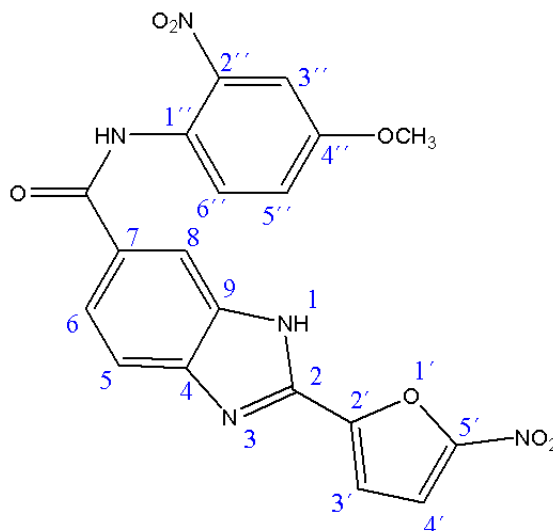
IV.2.5.i *N*-(2-metilfenil)-2-(5-nitrofuran-2-il)-3*H*-benzo[*d*]imidazol-5-carboxamida (117i)



Sólido verde; Rendimiento 39%; Punto de Fusión >300°C; IR (KBr) cm^{-1} : 1659 cm^{-1} (C=O), 3563 cm^{-1} (NH). RMN¹H (DMSO-d₆, 270 Hz): 2.32 (s, 3H, 2'' CH₃), 6.91 (d, 1H, H_{3''}, $J = 8.2\text{Hz}$), 7.23 (t, 1H, H_{4''}, $J = 7.9\text{Hz}$), 7.59 (m, 3H, H_{3''}, H_{5''}, H_{6''}), 7.73 (d, 1H, H₅, $J = 8.9\text{Hz}$), 7.90 (m, H₆, H_{4'}), 8.29 (s, 1H, H₈), 10.19 (s, 1H, NH).

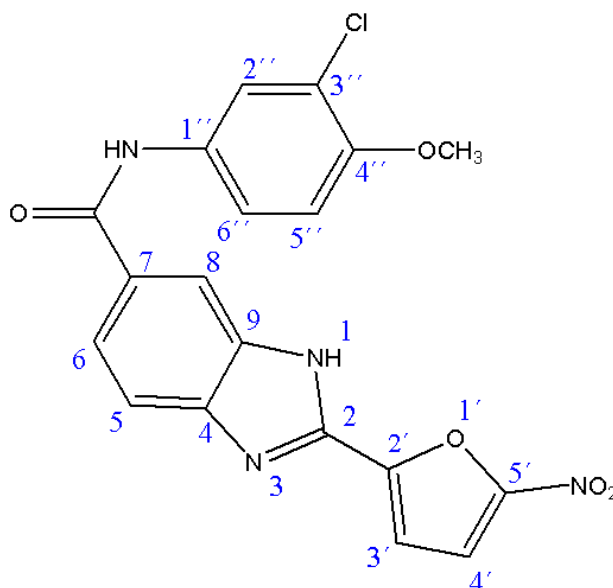
RMN¹³C (DMSO-d₆) δ : 22 (2''CH₃), 114 (C_{6''}), 115 (C₈), 118 (C_{5''}), 122 (C₅), 125 (C_{3''}), 129, 131 (C_{4''}), 138, 140, 143, 147, 152, 163 (NHC=O). EM (m/z): 362, 95 (M⁺).

IV.2.5.j *N*-(4-metoxi-2-nitrofenil)-2-(5-nitrofuran-2-il)-3*H*-benzo[*d*]imidazol-5-carboxamida (117j)



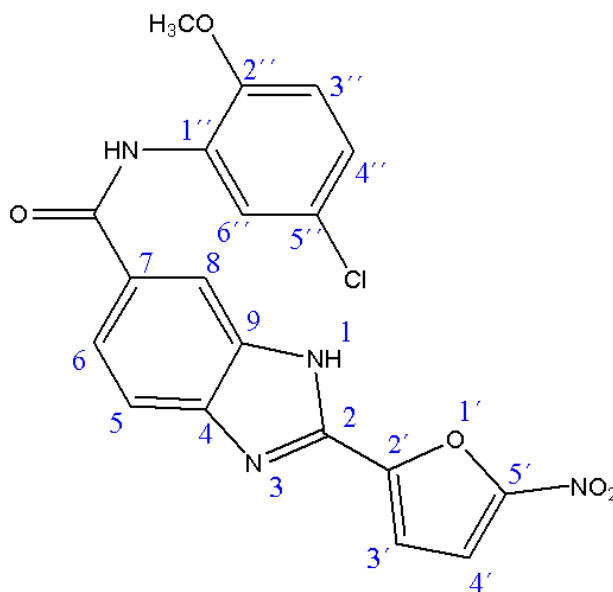
Sólido verde; Rendimiento 31%; Punto de Fusión >300°C; IR (KBr) cm^{-1} : 1660 ($\text{C}=\text{O}$), 3572 (NH) RMN^1H (DMSO- d_6 , 270 Hz): 3.32 (s, 3H, 4''OCH₃), 7.03 (m, 2H, H_{3'}, H_{5''}), 7.22 (m, 1H, H_{6''}), 7.56 (s, 1H, H_{3''}), 7.73 (d, H₅, $J=8.2\text{Hz}$), 7.2 (m, H₆), 8.30 (m, H_{4'}, H₈), 9.78 (s, NH). RMN^{13}C (DMSO- d_6) δ : 56 (4''OCH₃), 108 (C_{6''}), 115, 121, 124, 127, 129, 131 (C₆), 134, 135, 165 (NH $\underline{\text{C}}=\text{O}$).

IV.2.5.k N-(3-cloro-4-metoxifenil)-2-(5-nitrofuran-2-il)-3H-benzo[d]imidazol-5-carboxamida (117k)



Sólido verde; Rendimiento 33%; Punto de Fusión >300°C; IR (KBr) cm^{-1} : 1650 ($\text{C}=\text{O}$), 3568 (NH) RMN^1H (DMSO- d_6 , 270 Hz): 3.85 (s, 3H, 4'' OCH_3), 7.15 (d, 1H, H_5 , $J=7.9$ Hz), 7.56 (s, 1H, H_2), 7.72 (m, 1H, H_3 , H_6), 7.76 (d, H_5 , $J=9.8$ Hz), 7.91 (m, H_6 , H_4), 8.28 (sa, 1H, H_8), 10.24 (s, 1H, NH). RMN^{13}C (DMSO- d_6) δ : 57 (4'' OCH_3), 113 (C_2 '' C_6 ''), 115, 120, 121, 123, 131 (C_6), 134, 148, 152, 165 ($\text{NHC}=\text{O}$).

IV.2.5.I N-(5-cloro-2-metoxifenil)-2-(5-nitrofuran-2-il)-3H-benzo[d]imidazol-5-carboxamida (117I)



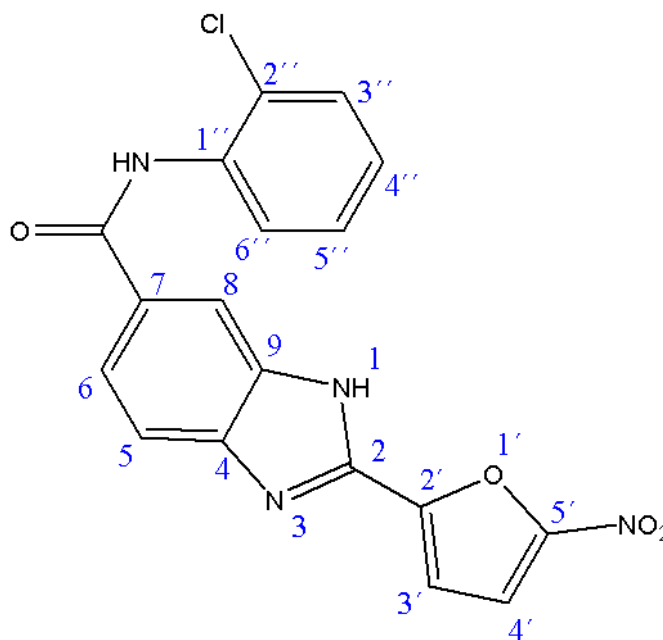
Sólido marrón; Rendimiento 35%; Punto de Fusión >300°C; IR (KBr) cm^{-1} : 1656 ($\text{C}=\text{O}$), 3565 (NH) RMN^1H (DMSO- d_6 , 270 Hz): 3.87 (s, 3H, 2''OCH₃), 7.12 (m, 1H, H_{3''}), 7.19 (m, 1H, H_{4''}), 7.55 (m, 1H, H_{6''}), 7.74 (d, H₅, $J=8.2$ Hz), 7.87 (m, 2H, H₆, H_{3'}), 8.27 (m, 2H, H_{4'}, H₈), 9.46 (s, 1H, NH). RMN^{13}C (DMSO- d_6) δ : 57 (4''OCH₃), 113 (C_{6''}), 115, 123, 131 (C₆), 165 (NH $\underline{\text{C}}=\text{O}$).

Análisis: **C₁₉H₁₃ClN₄O₅** **PM: 412.783**

Calculado: **C 55.28% H 3.17% N 13.57%**

Encontrado: **C 53.21 % H 3.06% N 13.06 %**

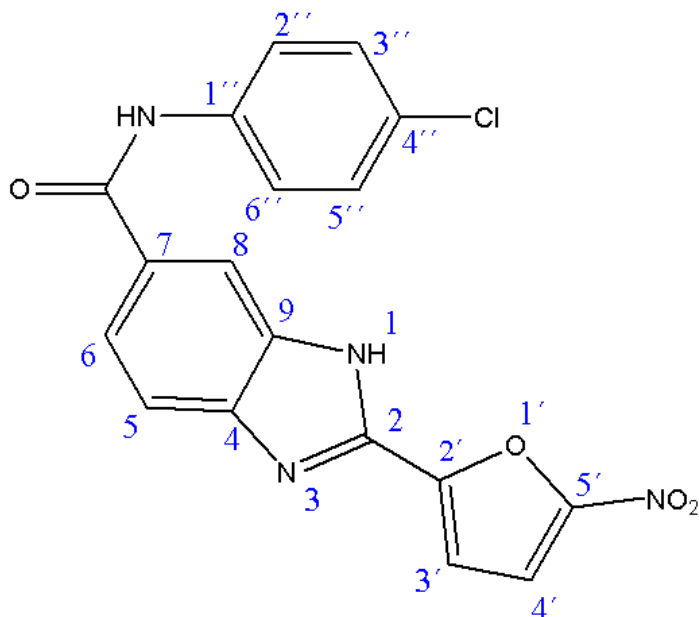
IV.2.5.m ***N*-(2-clorofenil)-2-(5-nitrofuran-2-il)-3*H*-benzo[*d*]imidazol-5-carboxamida (117m)**



Sólido marrón; Rendimiento 32%; Punto de Fusión >300°C; IR (KBr) cm^{-1} : 1652 ($\text{C}=\text{O}$), 3568 (NH). RMN^1H (DMSO- d_6 , 270 Hz): 7.27 (d, 1H, $\text{H}_{3''}$, $J = 8.2\text{Hz}$), 7.39 (t, 1H, $\text{H}_{4''}$, $J = 7.9\text{Hz}$), 7.55 (d, 1H, $\text{H}_{6''}$, $J = 8.1\text{Hz}$), 7.66 (t, 1H, $\text{H}_{5''}$, $J = 7.8\text{Hz}$), 7.75 (d, 1H, H_5 , $J = 8.9\text{Hz}$), 7.93 (m, H_6 , H_3), 8.25 (m, 2H, H_8 , H_4), 10.02 (sa, 1H, NH).

RMN^{13}C (DMSO- d_6) δ : 115 (C_8), 118 ($\text{C}_{5''}$), 122 (C_5), 125 ($\text{C}_{3''}$), 127, 128, 130, 131 ($\text{C}_{4''}$), 166 ($\text{NHC}=\text{O}$).

IV.2.5.n ***N*-(4-clorofenil)-2-(5-nitrofuran-2-il)-3*H*-benzo[*d*]imidazol-5-carboxamida (117n)**



Sólido negro; Rendimiento 36%; Punto de Fusión >300°C; IR (KBr) cm^{-1} : 1652 cm^{-1} (C=O), 3568 cm^{-1} (NH). RMN¹H (DMSO-d₆, 270 Hz): 7.41 (d, 2H, H_{3''}, H_{5''}, $J=9.1\text{Hz}$), 7.74 (d, H₅, $J=8.4\text{Hz}$), 7.84 (d, 2H, H_{5''}, H_{6''}, $J=8.2\text{Hz}$), 7.91 (m, H₆), 8.29 (m, H_{4'}, H₈), 10.32 (s, NH).

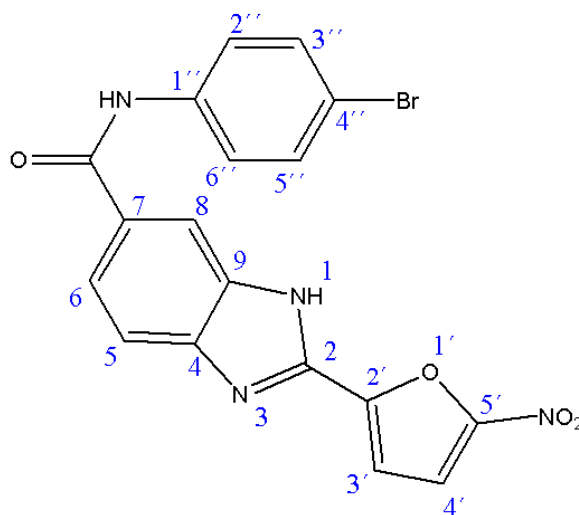
RMN¹³C (DMSO-d₆) δ : 115 (C₈), 118 (C_{5''}), 122 (C₅), 125 (C_{3''}), 131 (C_{4''}), 166 (NH-C=O).

Análisis: **C₁₈H₁₁ClN₄O₄** **PM: 382.757**

Calculado: **C 54.48% H 3.38% N 15.10%**

Encontrado: **C 56.48% H 2.90% N 14.28%**

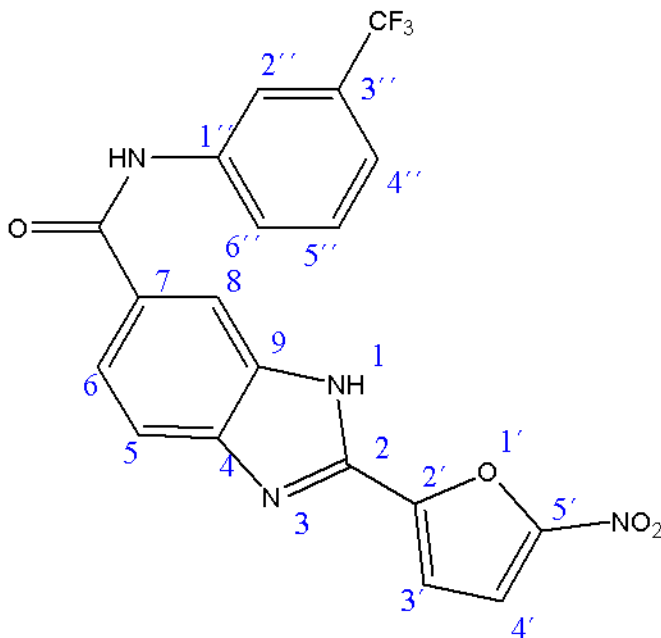
IV.2.5.o *N*-(4-bromofenil)-2-(5-nitrofuran-2-il)-3*H*-benzo[*d*]imidazol-5-carboxamida (117o)



Sólido negro; Rendimiento 38%; Punto de Fusión >300°C; IR (KBr) cm^{-1} : 1656 cm^{-1} (C=O), 3549 cm^{-1} (NH). RMN¹H (DMSO-*d*₆, 270 Hz): 7.52 (d, 2H, H_{3''}, H_{5''}, $J = 8.9$ Hz), 7.77 (m, 3H, H₅, H_{2''}, H_{6''}, $J = 8.1$ Hz), 7.92 (m, 2H, H₆, H_{3'}), 8.29 (m, 2H, H_{4'}, H₈), 10.37 (s, 1H, NH).

RMN¹³C (DMSO-*d*₆) δ : 115 (C₈), 118 (C_{5''}), 122 (C₅), 125 (C_{3''}), 131 (C_{4''}), 166 (NHC=O).

IV.2.5.p Datos espectroscópicos compuesto *N*-(3-(trifluorometil)fenil)-2-(5-nitrofurán-2-il)-3*H*-benzo[*d*]imidazol-5-carboxamida (117p)



Sólido marrón; Rendimiento 36 %; Punto de Fusión >300°C; IR (KBr) cm^{-1} ; 1656 cm^{-1} (C=O), 3549 cm^{-1} (NH). RMN¹H (DMSO-d₆, 270 Hz): 7.44 (d, 1H, H_{4''}, J=7.4 Hz), 7.61 (t, 1H, H_{5''}, J= 8.2Hz), 7.76 (d, 1H, H₅, J= 8.4 Hz), 7.92 (m, 2H, H_{3'}, H_{2'}, H_{6''}), 8.08 (d, 1H, H₆, J= 8.4 Hz), 8.24 (d, 1H, H_{4'}, J= 3.9 Hz), 8.33 (sa, 1H, H₈), 10.55 (s, 1H, NH).

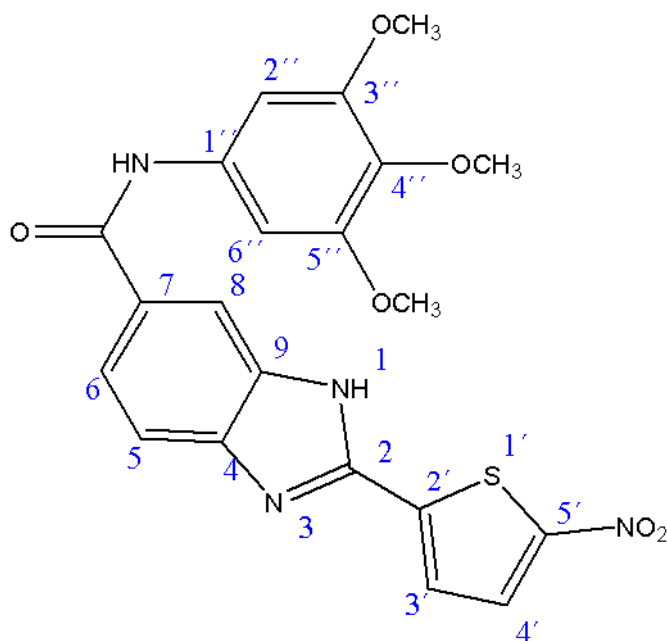
RMN¹³C (DMSO-d₆) δ : 106, 114 (C₈), 117 (C_{5''}), 121 (C₅), 124 (C_{2''}), 129, 130 (C_{4''}), 140, 152, 165 (NH-C=O).

Análisis: **C₁₉H₁₁F₃N₄O₄** **PM: 416.310**

Calculado: **C 54.82% H 2.66% N 13.46%**

Encontrado: **C 55.07 % H 3.01% N 14.28 %**

IV.2.6.a N-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-(5-nitrotiofen-2-il)-3H-benzo[d]imidazol-5-carboxamida (118a)



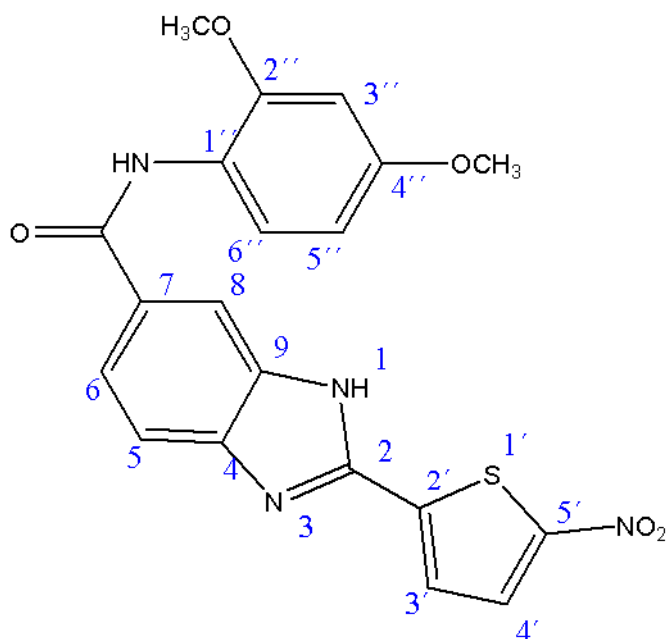
Sólido marrón; Rendimiento 52%; Punto de Fusión >300°C; IR (KBr) cm^{-1} : 1680 ($\text{C}=\text{O}$), 3550 (NH) cm^{-1} RMN¹H (DMSO-d₆, 270 Hz): 3.63 (s, 3H, 4''OCH₃), 3.76 (s, 6H, 3'', 5''OCH₃), 7.24 (s, 2H, H_{2''}, H_{6''}), 7.70 (d, 1H, H₅, $J = 8.5$ Hz), 7.87 (m, 2H, H₆, H_{3'}), 8.23 (m, 1H, H_{4'}), 8.26 (sa, 1H, H₈).
RMN¹³C (DMSO-d₆) δ : 56 (3'', 5''OCH₃), 61 (4''OCH₃), 99 (C_{2''}C_{6''}), 124, 127, 131 (C₆), 134, 136 (C₈), 140, 147, 152, 153, 166 (NHC=O).

Análisis: **C₂₁H₁₈N₄O₆S** PM: 454.457

Calculado: **C 55.50% H 3.99% N 12.33%**

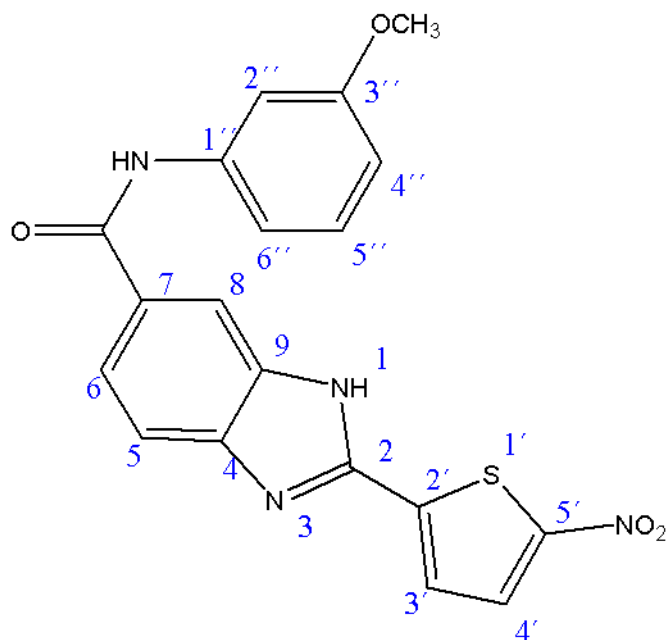
Encontrado: **C 55.91% H 4.28% N 12.78%**

IV.2.6.b *N*-(2,4-dimetoxifenil)-2-(5-nitrotiofen-2-il)-3*H*-benzo[*d*]imidazol-5-carboxamida (118b)



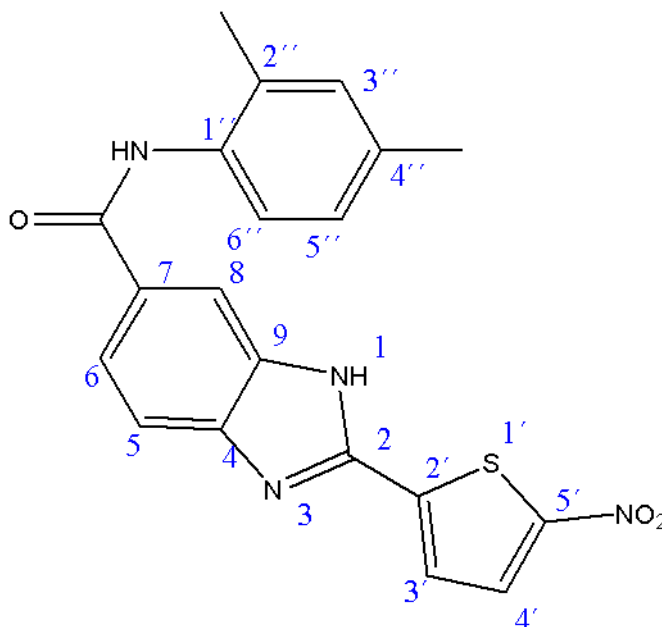
Sólido verde; Rendimiento 51%; Punto de Fusión >300°C; IR (KBr) cm^{-1} : 1650 ($\text{C}=\text{O}$), 3572 (NH) RMN^1H (DMSO- d_6 , 270 Hz): 3.70 (s, 3H, 4''OCH₃), 3.77 (s, 3H, 2''OCH₃), 6.71 (d, 1H, H_{6''}, $J = 8.4\text{Hz}$), 7.01 (dd, 1H, H_{5''}, $J = 8.4, 1.5\text{Hz}$), 7.62 (d, 1H, H_{3''}, $J = 1.5\text{Hz}$), 7.74 (m, 2H, H₅, H_{3'}), 7.88 (d, 1H, H₆, $J = 8.4\text{Hz}$), 8.23 (m, 2H, H_{4'}, H₈), 9.29 (sa, 1H, NH). RMN^{13}C (DMSO- d_6) δ : 56 (4''OCH₃), 57 (2''OCH₃), 109 (C_{6''}), 110, 112, 124, 127, 131 (C₆), 132, 165 (NHC=O).

IV.2.6.c Datos espectroscópicos compuesto *N*-(3-metoxifenil)-2-(5-nitrotiofen-2-il)-3*H*-benzo[*d*]imidazol-5-carboxamida (118c)



Sólido marrón; Rendimiento 51%; Punto de Fusión >300°C; IR (KBr) cm^{-1} : 1648 ($\text{C}=\text{O}$), 3581 (NH) RMN^1H (DMSO- d_6 , 270 Hz): 3.75 (s, 3H, $3''\text{OCH}_3$), 6.67 (d, 1H, $\text{H}_{4''}$, $J = 6.2\text{Hz}$), 7.25 (t, 1H, $\text{H}_{5''}$, $J = 7.7\text{Hz}$), 7.40 (d, 1H, $\text{H}_{6''}$, $J = 7.7\text{Hz}$), 7.51 (s, 1H, $\text{H}_{2''}$), 7.74 (d, 1H, H_5 , $J = 8.4\text{Hz}$), 7.89 (m, 2H, H_6 , H_3), 8.24 (d, 1H, $\text{H}_{4'}$, $J = 4.5\text{Hz}$), 8.28 (sa, 1H, H_8), 10.25 (s, 1H, NH). RMN^{13}C (DMSO- d_6) δ : 56 ($3''\text{OCH}_3$), 107 ($\text{C}_{2''}$), 110 ($\text{C}_{4''}$), 113 ($\text{C}_{6''}$), 126, 130 ($\text{C}_{5''}$), 131 (C_8), 141, 152, 160, 165 ($\text{NHC}=\text{O}$). EM (m/z): 393.03 (M-1), 345.96 (M-48)

V.2.6.d *N*-(2,4-dimetilfenil)-2-(5-nitrotiofen-2-il)-3*H*-benzo[*d*]imidazol-5-carboxamida (118d)



Sólido marrón; Rendimiento 48%; Punto de Fusión >300°C; IR (KBr) cm^{-1} : 1652 ($\text{C}=\text{O}$), 3570 (NH) RMN^1H (DMSO- d_6 , 270 Hz): 2.21 (s, 3H, 4'' CH_3), 2.28 (s, 3H, 2'' CH_3), 7.03 (d, 1H, $\text{H}_{5''}$, $J=8.2$ Hz), 7.07 (s, 1H, $\text{H}_{3''}$), 7.21 (d, 1H, $\text{H}_{6''}$, $J=8.1$ Hz), 7.55 (d, 1H, $\text{H}_{3'}$, $J=4.0$ Hz), 7.72 (d, $\text{H}_{5'}$, $J=8.2$ Hz), 7.92 (m, 2H, H_6, H_4), 8.28 (s, 1H, H_8), 9.79 (s, 1H, NH).

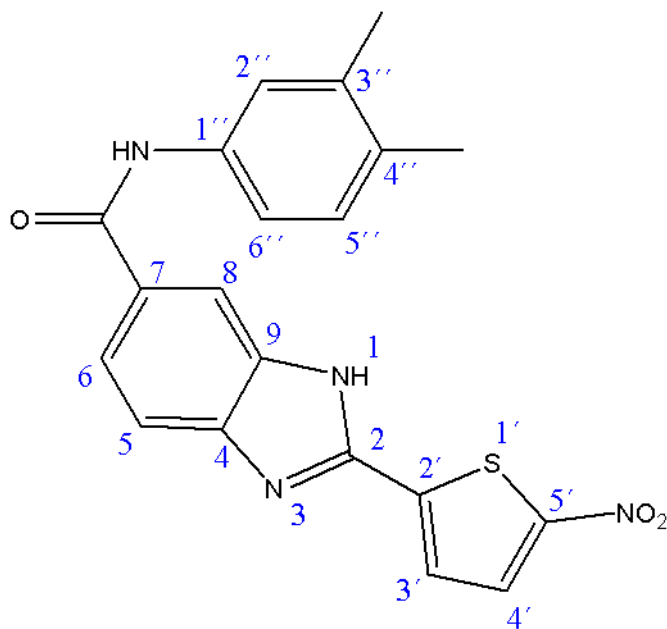
RMN^{13}C (DMSO- d_6) δ : 18 (4'' CH_3), 21 (2'' CH_3), 103 ($\text{C}_{6''}$), 114, 115, 116, 127, 130, 131 (C_6), 134, 135, 165 ($\text{NHC}=\text{O}$).

Análisis: **$\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$** PM: 392.432

Calculado: **C 61.21% H 4.11% N 14.28%**

Encontrado: **C 59.97% H 3.94% N 14.56%**

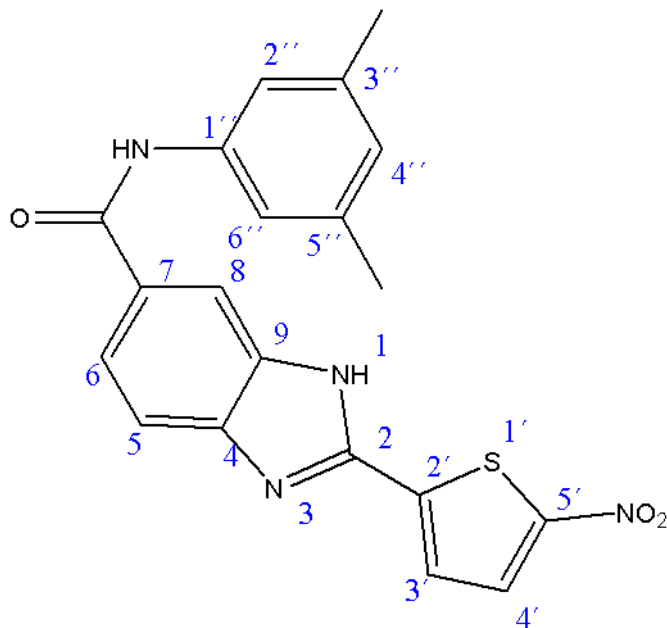
IV.2.6.f *N*-(3,4-dimetilfenil)-2-(5-nitrotiofen-2-il)-3*H*-benzo[*d*]imidazol-5-carboxamida (118f)



Sólido marrón; Rendimiento 45%; Punto de Fusión >300°C; IR (KBr) cm^{-1} : 1648 cm^{-1} (C=O), 3570 cm^{-1} (NH) RMN¹H (DMSO-d₆, 270 Hz): 2.19 (s, 3H, 3''CH₃) , 2.21(s, 3H, 4''CH₃), 7.09 (d, 1H , H_{5''}, *J*= 7.9 Hz), 7.52 (m,3H, H_{2''},H_{3''},H_{6''}), 7.73 (d,1 H, H₅, *J*= 8.6 Hz), 7.91 (m, 2H, H₆, H_{4'}) 8.27 (s, 1H, H₈), 10.16 (s, 1H, NH).

RMN¹³C (DMSO-d₆) δ : 19 (4''CH₃), 20(3''CH₃), 99 (C₂''C₆''), 131(C₆), 165(NHC=O).

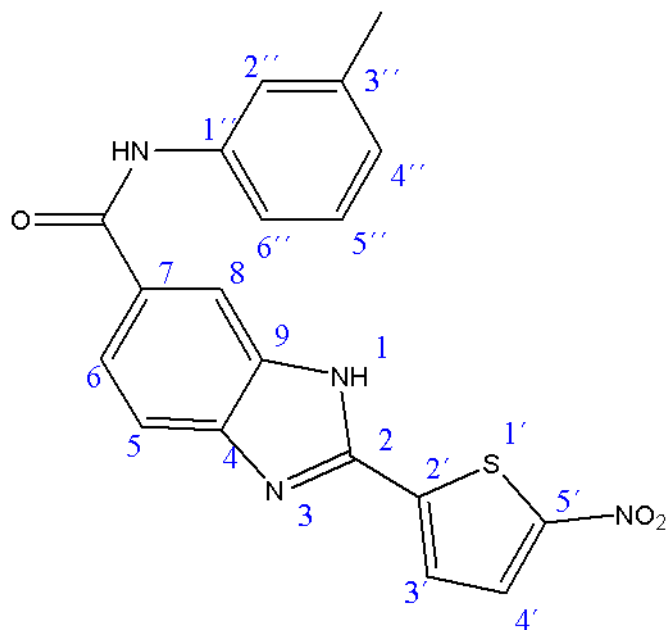
IV.2.6.g *N*-(3,5-dimetilfenil)-2-(5-nitrotiofen-2-il)-3*H*-benzo[*d*]imidazol-5-carboxamida (118g)



Sólido marrón; Rendimiento 51%; Punto de Fusión >300°C; IR (KBr) cm^{-1} : 1652 ($\text{C}=\text{O}$), 3568 (NH) RMN^1H (DMSO- d_6 , 270 Hz): 2.27 (s, 6H, 3'',5'' CH_3), 6.74 (s, 1H, $\text{H}_{4''}$), 7.44 (s, 2H, $\text{H}_{2''}$, $\text{H}_{6''}$), 7.57 (d, 1H, H_3 , $J=3.5\text{Hz}$), 7.73 (d, 1H, H_5 , $J=8.5\text{Hz}$), 7.91 (m, 2H, $\text{H}_{4'}$, H_6), 8.28 (s, 1H, H_8), 10.15 (s, 1H, NH).

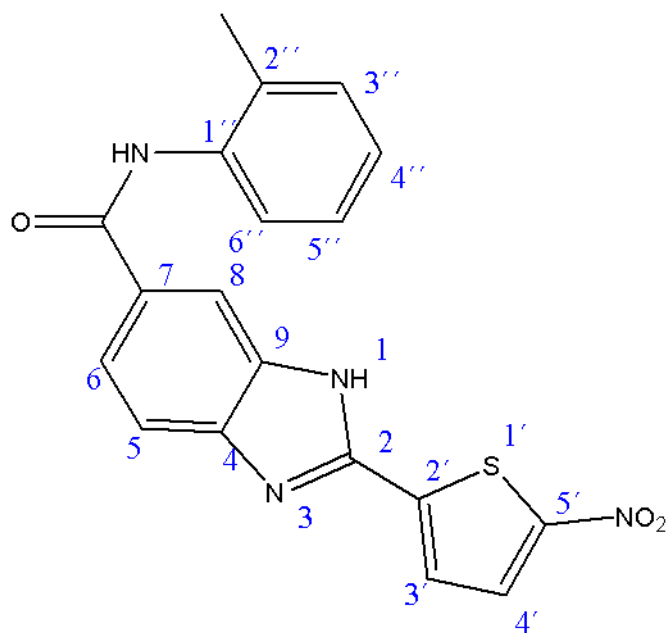
RMN^{13}C (DMSO- d_6) δ : 22 (3'',5'' CH_3), 99 (C_2 , C_6), 118, 124, 127, 135, 143, 152, 155, 163 ($\text{NHC}=\text{O}$).

IV.2.6.h ***N*-(3-metilfenil)-2-(5-nitrotiofen-2-il)-3*H*-benzo[*d*]imidazol-5-carboxamida (118h)**



Sólido marrón; Rendimiento 37%; Punto de Fusión >300°C; IR (KBr) cm^{-1} : 1650 cm^{-1} (C=O), 3565 cm^{-1} (NH). RMN¹H (DMSO-d₆, 270 Hz): 2.24 (s, 3H, 3'' CH₃), 7.10 (d, 1H, H_{4''}, $J=8.2\text{Hz}$), 7.51 (d, 1H, H_{5''}, $J=8.2\text{Hz}$), 7.58 (s, 1H, H_{2''}), 7.72 (d, 1H, H₅, $J=8.6\text{Hz}$), 7.90 (m, 3H, H₆, H_{3'}, H_{6''}), 8.22 (d, H_{4'}, $J=3.9\text{Hz}$), 8.28 (s, 1H, H₈), 10.01 (s, 1H, NH). RMN¹³C (DMSO-d₆) δ : 22 (3'', CH₃), 99 (C_{2''}-C_{6''}), 118, 122, 127, 130, 131 (C₆), 132, 136, 138, 152, 163 (NH-C=O).

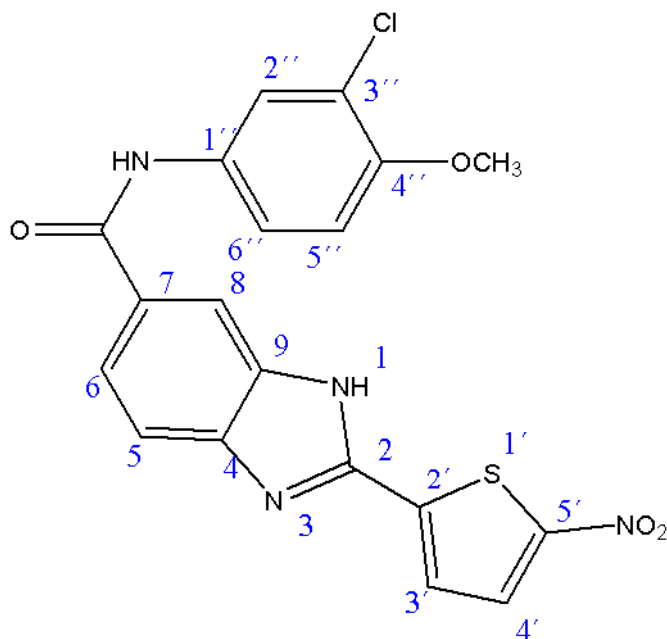
IV.2.6.i ***N*-(2-metilfenil)-2-(5-nitrotiofen-2-il)-3*H*-benzo[*d*]imidazol-5-carboxamida (118i)**



Sólido marrón; Rendimiento 45%; Punto de Fusión >300°C; IR (KBr) cm^{-1} : 1658 cm^{-1} (C=O), 3562 cm^{-1} (NH). RMN¹H (DMSO-d₆, 270 Hz): 2.28 (s, 3H, 2'' CH₃), 6.92 (m, 1H, H_{3''}), 7.15 (t, 1H, H_{4''}, *J* = 7.9Hz), 7.69 (m, 4H, H₅, H_{3'}, H_{5''}, H_{6''}), 7.94 (m, 2H, H₆, H_{4'}), 8.23 (s, 1H, H₈), 10.19 (sa, 1H, NH).

RMN¹³C (DMSO-d₆) δ : 22 (2''CH₃), 114 (C_{6''}), 115 (C₈), 116, 123 (C₅), 133, 138, 143, 156, 131 (C_{4''}), 163(NHC=O).

IV.2.6.k *N*-(3-cloro-4-metoxifenil)-2-(5-nitrotiofen-2-il)-3*H*-benzo[*d*]imidazol-5-carboxamida (118k).

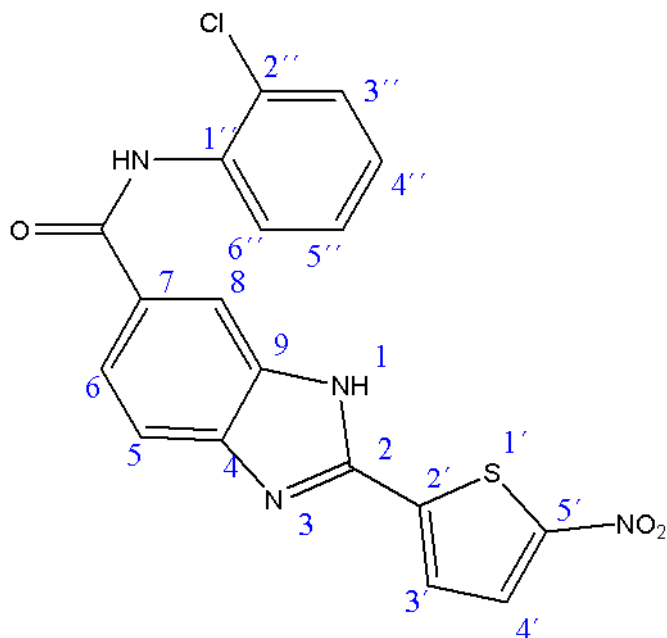


Sólido marrón; Rendimiento 46%; Punto de Fusión >300°C; IR (KBr) cm^{-1} : 1656 cm^{-1} (C=O), 3565 cm^{-1} (NH) RMN¹H (DMSO-d₆, 270 Hz):

3.84 (s, 3H, 4''OCH₃), 7.18 (d, 1H, H_{5''}, J= 7.9 Hz), 7.55 (s, 1H, H_{2''}), 7.72 (m, 1H, H_{3'}, H_{6''}), 7.76 (d, H₅, J= 9.8 Hz), 7.92 (m, H₆, H_{4'}), 8.29 (sa, 1H, H₈), 10.21 (s, 1H, NH).

RMN¹³C (DMSO-d₆) δ : 57 (4''OCH₃), 99 (C_{2''}C_{6''}), 131 (C₆), 165 (NHC=O).

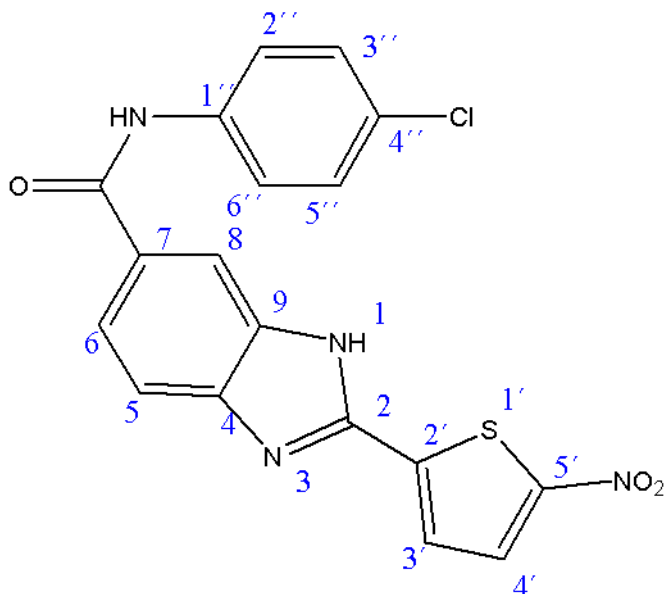
IV.2.6.m ***N*-(2-clorofenil)-2-(5-nitrotiofen-2-il)-3*H*-benzo[*d*]imidazol-5-carboxamida (118m)**



Sólido negro; Rendimiento 37%; Punto de Fusión >300°C; IR (KBr) cm^{-1} : 1652 ($\text{C}=\text{O}$), 3568 (NH). RMN¹H (DMSO-*d*₆, 270 Hz): 7.28 (d, 1H, H_{3''}, $J = 8.2\text{Hz}$), 7.39 (t, 1H, H_{4''}, $J = 7.91\text{Hz}$), 7.65 (m, 2H, H_{5''}, H_{6''}), 7.73 (d, H₅, $J = 8.9\text{Hz}$), 7.92 (m, H₆), 8.24 (m, H_{4'}), 8.30 (m, H₈), 10.03 (s, NH).

RMN¹³C (DMSO-*d*₆) δ : 115 (C₈), 118 (C_{5''}), 122 (C₅), 125 (C_{3''}), 131 (C_{4''}), 166 (NH-C=O).

IV.2.6.n ***N*-(4-clorofenil)-2-(5-nitrotiofen-2-il)-3*H*-benzo[*d*]imidazol-5-carboxamida (118n)**



Sólido negro; Rendimiento 39%; Punto de Fusión >300°C; IR (KBr) cm^{-1} : 1652 cm^{-1} (C=O), 3568 cm^{-1} (NH). RMN¹H (DMSO-d₆, 270 Hz): 7.41 (d, 2H, H_{3''}, H_{5''}, $J = 8.4$ Hz), 7.74 (d, 1H, H₅, $J = 8.4$ Hz) 7.84 (m, 4H, H₆, H_{3'}, H_{5''}, H_{3''}), 8.23 (d, 1H, H_{4'}, $J = 4.2$ Hz), 8.29 (s, 1H, H₈), 10.41 (s, 1H, NH).

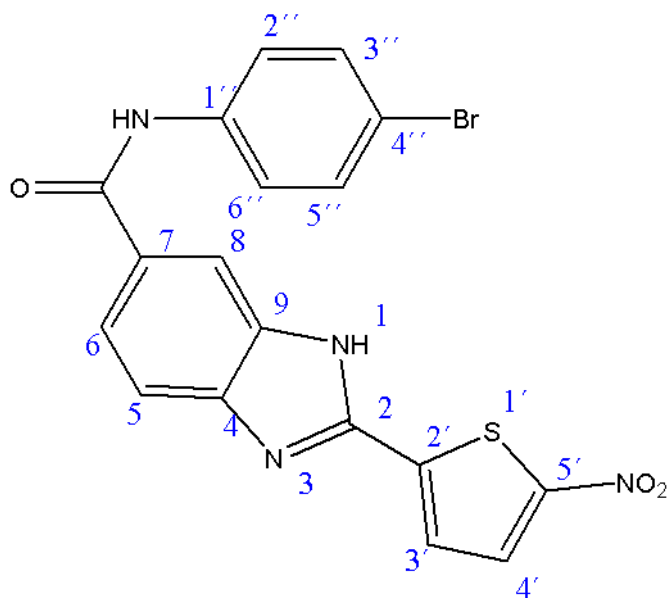
RMN¹³C (DMSO-d₆) δ : 115 (C₈), 118 (C_{5''}), 122 (C₅), 124 (C_{3''}), 127, 129, 132 (C_{4''}), 139, 166 (NH-C=O).

Análisis: **C₁₈H₁₁ClN₄O₃S** PM: 398.824

Calculado: **C 54.21% H 2.78% N 14.05%**

Encontrado: **C 54.56 % H 3.12% N 14.50 %**

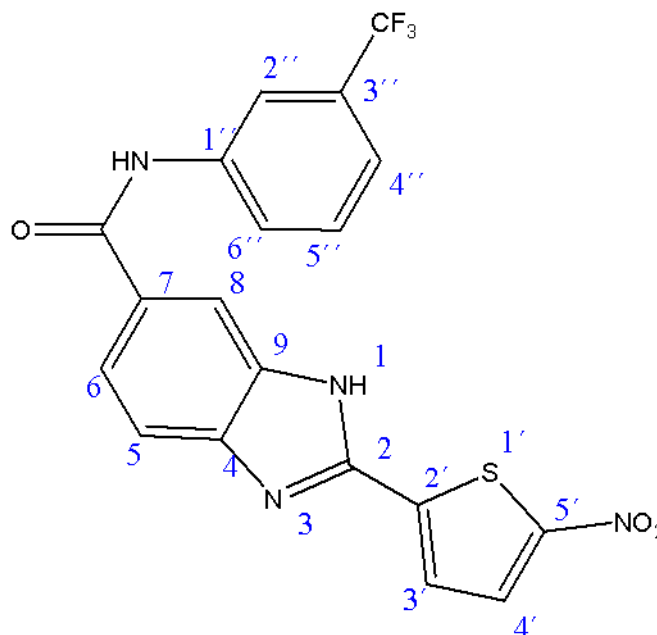
IV.2.6.o *N*-(4-bromofenil)-2-(5-nitrotiofen-2-il)-3*H*-benzo[*d*]imidazol-5-carboxamida (118o)



Sólido marrón; Rendimiento 35%; Punto de Fusión >300°C; IR (KBr) cm^{-1} : 1660 ($\text{C}=\text{O}$), 3565 (NH). RMN¹H (DMSO-*d*₆, 270 Hz): 7.53 (d, 2H, H_{3'}, H_{5'}, $J = 8.9$ Hz), 7.73 (d, 1H, H₅, $J = 8.1$ Hz), 7.80 (d, 2H, H_{2'}, H_{6'}, $J = 8.1$ Hz), 7.89 (m, 2H, H₆, H_{3'}), 8.23 (d, 1H, H_{4'}, $J = 4.4$ Hz), 8.29 (s, 1H, H₈), 10.32 (s, 1H, NH).

RMN¹³C (DMSO-*d*₆) δ : 115 (C₈), 118 (C_{5''}), 123 (C₅), 125 (C_{3''}), 131 (C_{4''}), 132, 166 (NHC=O).

IV.2.6.p N-(3-(trifluorometil)fenil)-2-(5-nitrotiofen-2-il)-3H-benzo[d]imidazol-5-carboxamida (118p)



Sólido marrón; Rendimiento 36 %; Punto de Fusión >300°C; IR (KBr) cm^{-1} ; 1656 cm^{-1} (C=O), 3549 cm^{-1} (NH). RMN¹H (DMSO-d₆, 270 Hz): 7.44 (d, 1H, H_{4''}, $J = 7.4$ Hz), 7.61 (t, 1H, H_{5''}, $J = 8.2$ Hz), 7.76 (d, 1H, H₅, $J = 8.4$ Hz), 7.93 (m, 2H, H_{3'}, H_{2'}, H_{6''}), 8.07 (d, 1H, H₆, $J = 8.4$ Hz), 8.24 (d, 1H, H_{4'}, $J = 3.9$ Hz), 8.32 (sa, 1H, H₈), 10.56 (s, 1H, NH).

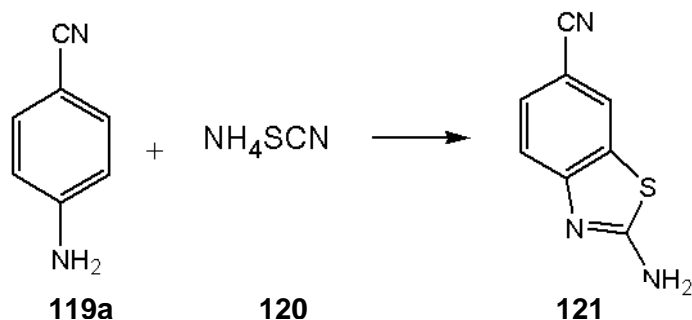
RMN¹³C (DMSO-d₆) δ : 106, 114 (C₈), 117 (C_{5''}), 120 (C₅), 123 (C_{2''}), 124, 125, 127, 130 (C_{4''}), 132, 134, 165 (NH-C=O).

Análisis: **C₁₉H₁₁F₃N₄O₃S** PM: 432.377

Calculado: C 54.78% H 2.56% N 12.96%

Encontrado: C 53.20 % H 2.89% N 13.43 %

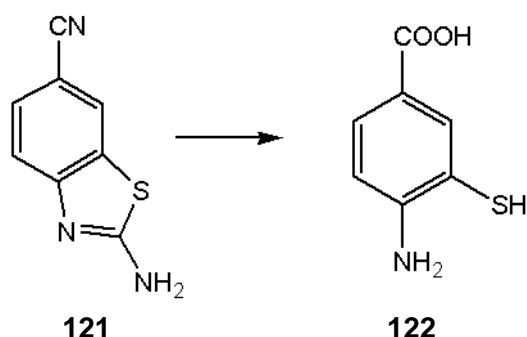
IV.2.6. Síntesis de 2-aminobenzo[d]tiazolil-6-carbonitrilo (**121**)



En un balón provisto de con un agitador y un baño de hielo se disolvieron 14,2 mmol (2g) de p-aminobenzonitrilo **119a** y 46,6 mmol (3.5 g) de tiocianato de amonio **120**, en 40 mL de ácido acético glacial, seguidamente se agregó lentamente desde un embudo de adición una solución de 2 mL de Br₂ disueltos en 5 mL de ácido acético glacial. Finalizada la adición de Br₂, se procedió a retirar el baño de hielo y la mezcla se dejó reaccionar por 18 h. Se agregó agua, el sólido resultante se filtró y se descartó. El filtrado se neutralizó con Na₂CO_{3(s)} precipitando un sólido blanco, que fue recristalizado de etanol. El compuesto de interés se obtuvo con un 70% de rendimiento. El punto de fusión y los análisis espectroscópicos concuerdan con los reportados por nuestro grupo.¹³⁸

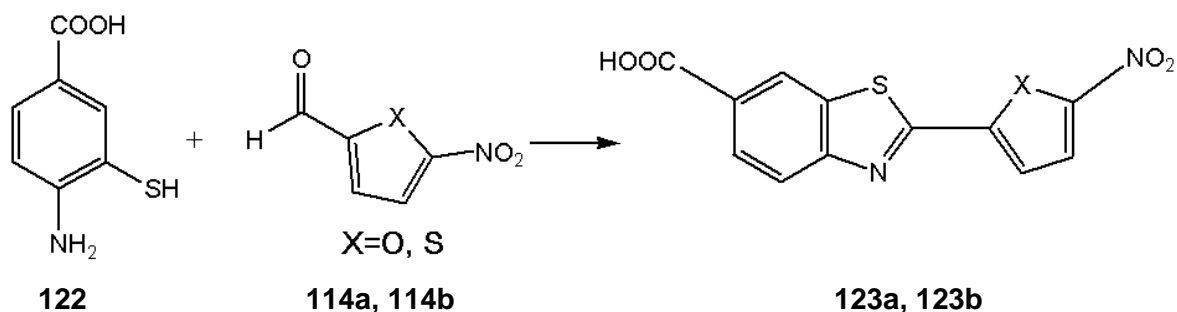
Adicionalmente se empleó como agente activante el bromuro de *N-n*-butilpiridinio, bajo las condiciones de reacción previamente descritas, sin embargo el porcentaje de rendimiento fue de 71%, no lográndose una mejora significativa al rendimiento de esta reacción.

IV.2.7. Síntesis de 4-amino-3-mercaptobenzonitrilo (**122**)



En un balón provisto con un agitador se disolvió 1 g (5,70mmol) de **121** en una solución al 30 % de NaOH/H₂O, la mezcla se dejó a reflujo por 24 horas, finalizada la reacción, la mezcla se colocó en un baño con hielo, se agregó HCl_(conc) hasta la aparición de un precipitado. El sólido resultante se filtró y recristalizó de etanol. El punto de fusión y los análisis espectroscópicos concuerdan con los reportados por nuestro grupo.¹³⁸

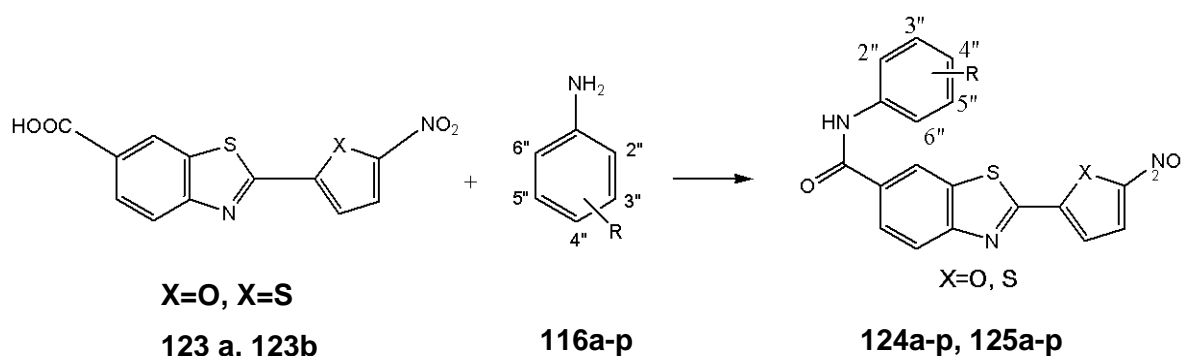
IV.2.8. Procedimiento general para la síntesis de los ácidos 2-(5-nitrofurano/tiofen-2-il)benzo[d]tiazol-6-carboxílico (**123a** , **123b**).



En un balón provisto con 2 bocas y un sistema de agitación se disolvieron 0.5 g (2,95 mmol) de **122**, 0.450 g (2,87 mmol) de 5-nitrofurano/tiofen-2-carbaldehído (**114a/114b**) y 0.405 g (2,87 mmol) de p-hidroquinona en 40 mL de etanol seco,

la reacción se dejó bajo reflujo por 24 h. Finalizada la reacción, se agregó hielo. El sólido resultante se filtró y lavó con suficiente agua destilada. El compuesto resultante se recristalizó de etanol. Se lavó 4 veces con éter dietílico y se seco a vacío. El punto de fusión y los análisis espectroscópicos concuerdan con los reportados por nuestro grupo.^{138,139}

IV.2.9. Procedimiento general para la síntesis de los análogos 2-(5-nitrotiofen-2-il)-N-fenilbenzo[d]tiazol-6-carboxamidas (124a-p , 125a-p).



En un balón de dos bocas provisto de un agitador y bajo atmosfera inerte, en un baño de hielo se disolvieron 100 mg (0,35 mmol) de (**123a** , **123b**) y 150 mg (0,97 mmol) de EDCI en 10 mL de DMF seca, al término de 1h se agregaron (0,5 mmol) de la anilina correspondiente (tabla III) y 0,10 mmol de DMAP, la mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente por 48 h. Se agregó agua para detener la reacción, el sólido resultante se lavo con NaOH (10%) y se recristalizo de etanol.

Bajo esta metodología no se logro obtener los compuestos de interés, a pesar de hacer variaciones en las relaciones estequiometrias y ampliar los tiempos de reacción biológicamente. hasta por 120 horas. Los compuestos se obtuvieron en forma de aceite color oscuro, se aplicaron sucesivas recristalizaciones y lavados con metanol, sin lograr obtenerlo bajo un nivel de pureza que permitiera caracterizarlo y ensayarlo.

IV.3. Pruebas biológicas

IV.3.1. Evaluación antimalárica

La evaluación de la posible actividad antimalárica de los compuestos sintetizados se realizó mediante: La Inhibición de la formación de hemozoína (ensayo *in vitro*) y la Prueba o test supresivo de Peters (ensayo *in vivo*).

Ensayo de inhibición en la formación de hemozoína (IFH):

El ensayo de IFH se realizó de acuerdo al protocolo reportado por Baelmans y colaboradores.¹⁴⁵ Para ello, se empleó una solución 4 mM de clorhidrato de hemina en dimetil sulfóxido (5,2 mg/mL), la cual se distribuyó en microplacas de 96 pozos, (50 μ L/pozo). Se adicionaron los compuestos a ensayar disueltos en DMSO (a concentraciones entre 100 μ M y 1 μ M) por triplicado (50 μ L), en los pozos contentivos de hemina para obtener concentraciones finales por pozo entre 2,5 mM y 125 μ M. Los solventes se emplearon como controles negativos: agua (50 μ L) y DMSO (50 μ L).

La formación de la β -hematina se inició mediante la adición de buffer fosfato (100 μ L, 0,2 M, pH 4,4) a cada uno de los pozos. Las microplacas se incubaron a 37 °C por 48 horas para permitir la completa reacción, se centrifugaron a 4000 rpm por 15 min. en una centrífuga IEC-CENTRA, MP4R, el sobrenadante se descartó (hemina no cristalizada) mediante inversión de la placa y el sedimento hemozoína), se lavó dos veces con DMSO (200 μ L) para eliminar totalmente la hemina libre. Finalmente, se disolvió con hidróxido de sodio (200 μ L, 0,2 N) para hidrolizar la hemozoína a hemina. En otra placa, se diluyeron los agregados solubilizados 1:2 con hidróxido de sodio (0,1 N) y se les determinó la absorbancia a 405 nm en lector de placas Microplate Reader, BIORAD-550. Se utilizó la CQ como control positivo.¹⁴⁵

El porcentaje de inhibición de la formación de la hemozoína se determinó de acuerdo a la siguiente expresión matemática:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 \times (1 - [\text{DO Muestra}]_{405\text{nm}} / [\text{DO Control}]_{405\text{nm}})$$

Donde:

DO Muestra = Dispersión óptica de la Muestra

DO Control = Dispersión óptica del Control

Prueba de Peters¹⁴⁶

Ratones INH machos, con un peso entre 18-22 g, mantenidos con una dieta comercial de Ratarina® y agua *ad libitum*, se infectaron con el *P. berghei* por vía intraperitoneal (ip) usando un inóculo de 1×10^6 eritrocitos infectados, diluidos en buffer fosfato (PBS, 10 mM, pH 7,4, 0,1 mL). El curso de la infección se evaluó mediante el examen de extendidos de sangre tomada a través de un pequeño corte de la cola del ratón, coloreados con Giemsa, por microscopía de luz.

El día del inicio de la prueba de Peters, se preparó un inóculo similar (10^6 parásitos/0,1 mL) a partir de la sangre de un ratón donante con parasitemia alta (>60%). Se infectaron 5 ratones (n = 5) para cada grupo experimental (para cada compuesto a ensayar), el control positivo (CQ) y los controles infectados sin tratamiento (Grupo control, que reciben el vehículo). Los compuestos a ensayar se disolvieron en DMSO (100-200 μ L) y a partir de esta solución, se prepararon dispersiones en solución Salina-Twen 80 al 2 % (vehículo), a fin de tratar a los animales con una dosis de 20 mg/Kg de cada compuesto, por administración ip. de 0,1 mL de la dispersión. La CQ se preparó en agua destilada y se administró en una dosis de 20 mg/Kg por vía ip de 0,1 mL de la solución.

En cada grupo, el tratamiento se inicia el día 0, dos horas después de la infección, y a partir de entonces, se tratan diariamente, una vez al día, a la misma hora, durante 4 días, por administración de 0,1 mL de la preparación del compuesto, o vehículo, hasta el día 4. Dos horas después del último tratamiento, se procede a la preparación de extendidos de sangre obtenida de la cola de cada ratón, teñidos con Giemsa a fin de determinar la parasitemia

(parasitemia al 4° día), mediante examen del extendido de sangre de la cola coloreado con Giemsa por microscopía de luz. La parasitemia observada se expresa en términos de porcentaje (parásitos por cada 100 eritrocitos). Durante el experimento, se lleva un registro de la mortalidad de los ratones a fin de calificar efectos tóxicos y de calcular el tiempo de sobrevivencia post infección expresado en días (DSPI), de los ratones tratados, en relación al grupo control.

Análisis estadístico: Para determinar si se presentan diferencias significativas entre los grupos de tratamiento y los controles no tratados, los resultados se analizaron por una Prueba de T (t-student) no apareada y por un Análisis de Varianza de una sola vía (ANOVA) asumiendo un 95% de intervalo de confianza.

IV.3.2. Evaluación citotóxica-antitumoral

Los ensayos citotóxicos-antitumorales se realizaron en el Instituto de Inmunología los Laboratorios de Investigación y Desarrollo, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, utilizando la Prueba del MTT. De Mosmann y colaboradores en 1983.¹⁴⁷

Ensayo del MTT (Bromuro de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio]):

La proliferación de las células se determinó mediante el ensayo descrito por Mosmann¹⁴⁷ en 1983, para lo cual se utilizaron cuatro líneas celulares humanas neoplásicas: Células leucémicas Jurkat E6.1, células leucémicas HL60, y linfocitos humanos normales obtenidos de sangre periférica. Para realizar este procedimiento se colocaron las células en crecimiento de forma exponencial en placas de 96 pozos fondo plano (5x10⁴/pozo) en 200 µL de medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor, y conteniendo 1x10⁻⁹ M-1x10⁻³ M de los compuestos y tratadas durante 24, 48 y 72 h a 37 °C. Las células normales se trataron con

concentraciones crecientes de los compuestos seleccionados por 24h y las células controles se trataron con vehículos acuosos, DMSO 0,1%; y como controles positivos se utilizaron el trióxido de arsénico (As_2O_3) en cantidades 1 μM , 2,5 μM , 4,5 μM , 7,5 μM , 10 μM y 25 μM y la quercetina, en cantidades 1 μM , 5 μM , 10 μM , 25 μM , 50 μM y 100 μM . Al finalizar los períodos de incubación, se añadió 50 μL de una solución de MTT de 0,5 mg/mL en PBS (0.15 μM NaCl, 0.1 M fosfato de potasio pH 7.4) a cada pozo, las placas se incubaron a 37 °C por 4h adicionales. Al finalizar el tiempo de incubación se centrifugaron las placas a 1800 rpm durante 5 min., seguidamente se removieron los sobrenadantes cuidadosamente, se disolvieron los cristales de formazán (azul púrpura) en 200 μL de DMSO puro y se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Seguidamente se determinó la absorbancia de las soluciones de formazán sobre un lector de microplacas de elisa a una longitud de onda de 540 nm, para cada concentración de los compuestos se realizaron cuatro réplicas, se calcularon y reportaron los promedios más o menos la desviación standard (\pm SD) como el porcentaje de crecimiento contra el control. Se determinó la reducción en un 50% del número de células en relación a los controles (CI_{50}) por una regresión no lineal de las curvas de dosis-respuesta usando el programa Graph Pad Prism versión 5.

Luego se precisó el índice de selectividad (IS) de los derivados seleccionados el cual es definido como la relación de citotoxicidad entre las células normales y las células Jurkat E6.1: CI_{50} (linfocitos T normales) / CI_{50} células neoplásicas). Cuando el IS es > 1 la citotoxicidad para las células neoplásicas supera a la citotoxicidad en las células normales.¹⁴⁸⁻¹⁴⁹

Ensayo de unión de Anexina V

La actividad sobre el proceso de apoptosis de los derivados se identificó mediante la presencia del fosfolípido fosfatidilserina de la interfase citoplasmática de la membrana en la superficie celular y su unión con la proteína anexina V, la cual se encuentra conjugada con el colorante fluorescente isotiocianato de fluoresceína (FITC). La metodología seguida consistió en tratar 5×10^4 células con los derivados sintéticos, con As_2O_3 y con quercetina como controles positivos, que son inductores de la apoptosis en las células leucémicas Jurkat E6.1 y HL60. Este tratamiento se llevó a cabo durante 24 y 48h a 37 °C, al finalizar los tiempos de incubación las células se lavaron en una oportunidad con PBS y se resuspendieron en 200 μ L del buffer de unión (150 mM NaCl, 1.8 mM $CaCl_2$, 10 mM HEPES, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$) conteniendo anexina V-FITC, e incubaron durante 15 minutos a 4 °C en la oscuridad. Finalmente, se adicionaron 100 μ L yoduro de propidio (PI) (50 μ g/mL) durante al menos 10 minutos a 4 °C en la oscuridad y se analizó el doble marcaje, dentro de 1 hora, por citometría de flujo.¹⁵⁰⁻¹⁵¹

ANÁLISIS ESTADÍSTICO: Todos los experimentos fueron llevados al menos tres veces por cuadruplicado. Los valores de CI_{50} fueron determinados por una regresión no-lineal de los experimentos individuales, utilizando el programa Graph Pad Prism®, version 5.

IV.3.3. Evaluación antimicrobiana

Los ensayos *in vitro* se realizaron utilizando el método de difusión sobre placas de agar¹⁵². Las muestras fueron resuspendidas en la mezcla de solventes: Las series **117a-p** y **118a-p** fueron resuspendidas en la mezcla DMSO/H₂O/EtOH/Acetona 30:50:10:10. La serie **112a-m** fue resuspendida en la mezcla: CHCl₃/H₂O/EtOH/Acetona 50:30:10:10.

Se prepararon soluciones de aproximadamente 2 - 5 mg en 1 mL (C= 1-3 mg/mL).

Las referidas muestras fueron colocadas en discos de papel absorbente ($\varnothing = 5$ mm, 5 μ L).

La actividad biológica se evaluó contra los microorganismos Gram-positivos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25963) y *Bacillus cereus* (ATCC 14579), y los microorganismos Gram-negativos: *Escherichia coli* (ATCC 35218) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145). Se evaluó la actividad antimicótica utilizando la levadura *Candida tropicalis* MLDM 345611. *P. aeruginosa*, *B. cereus* y *C. tropicalis* fueron incubados a 30 °C, mientras que *E. coli* y *S. aureus* fueron incubados a 37 °C.

Como controles positivos se utilizaron los antibióticos comerciales: Amikacina, Ampicilina-Sulbactam, Ofloxacina, Tilmicosin y Polimixina B (BBL-Sensi-Disc); como control negativo se empleó la mezcla de solventes utilizada para solubilizar las muestras.

0,1 mL de los cultivos microbianos crecidos en placas LB preparado en el laboratorio¹⁵³, y ajustados en solución salina (0,85% v/v) a la concentración correspondiente al Standard de McFarland N° 0,5, fueron sembrados en superficie en agar Mueller-Hinton (Merck 1.05437).

En el caso de *Candida tropicalis* se utilizó una placa de YPD para la evaluación, ya que las levaduras crecen mejor en este medio.

Sobre el césped microbiano se colocaron los discos de papel de filtro con las diferentes muestras y los controles. Se midió el halo de inhibición a las 24 h, reportando esos valores en diámetro de inhibición en mm.

ATCC: American Type Culture Collection

MLDM: Micoteca Lorenzo De Montemayor (USB)

IV.4. Cálculo de propiedades, construcción y optimización de la geometría

En esta sección, se describen los programas computacionales y servidores web para el cálculo de algunas propiedades estimadas para las series sintetizadas.

- Programa de modelado molecular CAChe WorkSystem PRO versión 3.0 (CAChe group, Fujitsu America)
- Programa ProjectLeader (CAChe WorkSystem PRO versión 3.0, CAChe group, Fujitsu America)
- Programa Accord para Excel version 7.1.5, Accelerys.
- Programa ACD/CHEMSKETCH, Modulo LogP v.12.01.

IV.4.1 Optimización y cálculo de energía

Para los cálculos de energía las estructuras se construyeron y optimizaron, para ello se procedió de la siguiente manera:

Las estructuras fueron construidas a partir de la librería de fragmentos del modulo fujitsu del programa CAChe 3.0. Se verificó que la hibridación y la valencia de cada átomo en la molécula construida fuera la correcta. La geometría se optimizo empleando mecánica molecular (MM), en un campo de fuerza MM3 aumentado.

Se emplearon como algoritmos de minimización:

- a) Gradiente conjugado

- b) Block diagonal Newton-Raphson.

Como valor de convergencia se estimo 0.001Kcal/mol.

Una vez optimizadas las estructuras según lo descrito anteriormente, se procedió a la búsqueda del conformero de menor energía, empleando las siguientes condiciones:

- a) Campo de fuerza CAChe MM3 aumentado.
- b) Condiciones de simulación: Temperatura 300K, Período de equilibrio 5 ps, duración de la simulación: 20 ps, Timestep:0.001 ps.

IV.4.2 Cálculo de propiedades

- La estimación del coeficiente de partición octanol-agua LogP, Programa ProjectLeader (CAChe WorkSystem PRO versión 3.0.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1. Sección química

La estrategia diseñada para la síntesis total de los derivados planteados (**112a-n**), involucró un proceso lineal de tres pasos que permitió la preparación de 14 compuestos finales. En el diseño de estos derivados se incorporó uno o varios grupos metoxi, sobre la base de que este grupo funcional proporciona propiedades electrónicas-lipofílicas favorables para las actividades biológicas citotóxicas-antitumorales, antimaláricas y antimicrobianas, esto de acuerdo con los reportes encontrados en la literatura.^{85, 132}

La estrategia sintética diseñada para las series **117a-p**, **118a-p** se fundamentó cada una en un proceso lineal de tres pasos que permitió la obtención de 32 compuestos. Se incorporaron sustituyentes como grupos metilo, metoxi, nitro, cloro, bromo y trifluorometil en la estructura final para establecer la dependencia de su naturaleza electrón dador-atrayente, sobre las actividades biológicas evaluadas.

El diseño del total de todos los compuestos se realizó con la intención de que puedan actuar como profármacos, herramienta eficaz ampliamente utilizada en química medicinal para aumentar la potencia y superar inconvenientes asociados a formulación y administración de fármacos. En el primer grupo de derivados se incorporó la función éster (**112a-n**) mientras que en los derivados **117a-p**, **118a-p** se incorporó la función amida. Basados en el uso de una estrategia de profármaco que con frecuencia, mejora las propiedades fisicoquímicas y/o farmacocinéticas de un fármaco.¹⁵⁴ De hecho, los beneficios combinados asociados con los profármacos lo han convertido en una herramienta muy usada, al punto que hoy en día cerca del 10 % de todos los medicamentos aprobados en todo el mundo se clasifican como profármacos.¹⁵⁵

V.1.1. Síntesis de 2-[4-(7-cloro-quinolinilsulfinil)] acetato de metilo (109)

La síntesis del compuesto **109** procede selectivamente vía sustitución nucleofílica aromática sobre el cloro de la posición 4, reacción reportada por nuestro grupo de investigación. El mecanismo propuesto se puede apreciar en la figura siguiente:

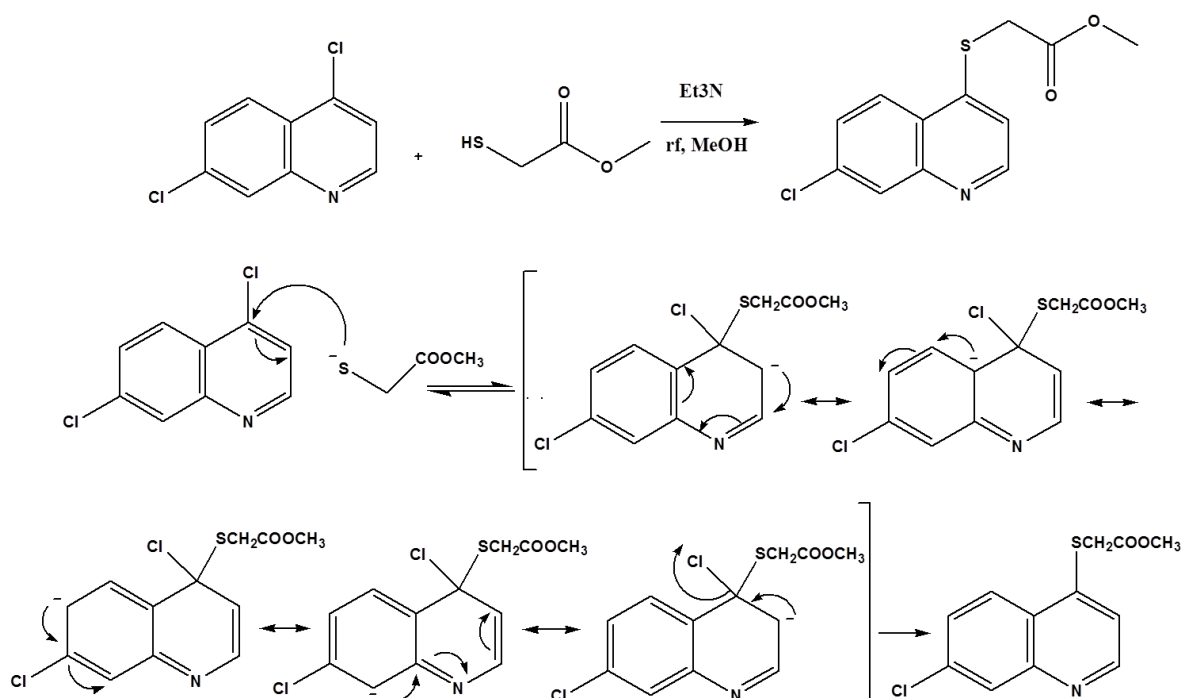


Figura 51. Mecanismo propuesto para la síntesis de 2-[4-(7-cloro-quinolinilsulfinil)] acetato de metilo (**109**).

El compuesto de interés se obtuvo en forma de agujas blancas con un rendimiento del 97% y punto de fusión de 96-98°C, coincidiendo con lo reportado en la literatura.¹²⁸

V.1.2. Síntesis de 2-(7-cloroquinolinil-4-iltio)-3-(4-hidroxifenil) acrilato de metilo (75)

La síntesis del compuesto **75** fue reportada por nuestro laboratorio en el año 2009, la misma involucra una reacción de condensación tipo Knoevenagel, catalizada por un buffer piperidina-ácido acético glacial. El mecanismo propuesto se muestra en la figura 52, por medio de difracción de rayos X se determinó la configuración (E) del acrilato resultante.¹²⁸

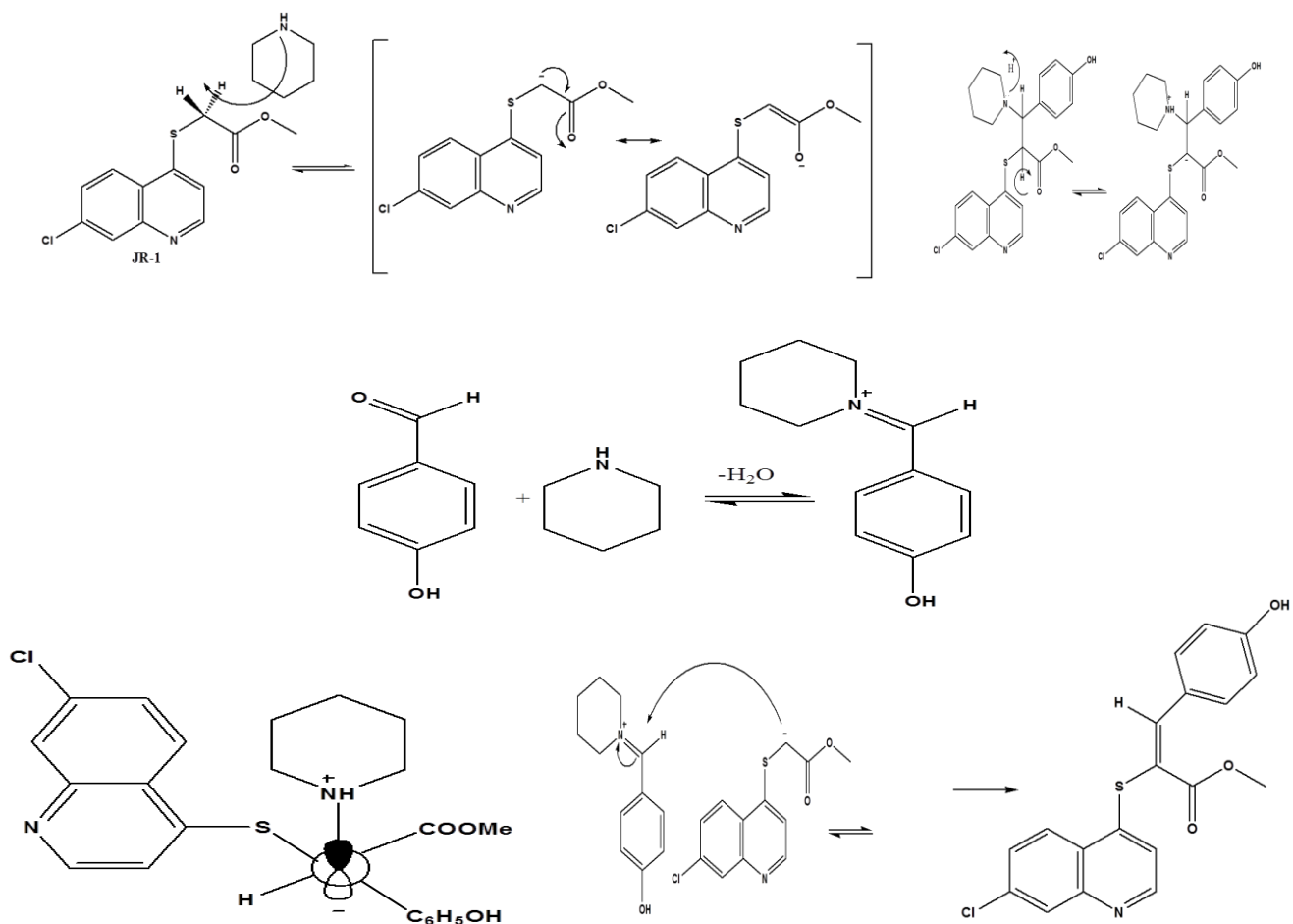


Figura 52. Mecanismo de la reacción de condensación Knoevenagel.

Un aporte significativo de este trabajo al reporte previo de esta reacción lo representa el procedimiento de aislamiento y purificación del compuesto de

interés, para ello reemplazamos el método de cromatografía en columna en fase normal (empleando mezcla acetato de etilo:Hexano, 3:7) que presentaba un 48% de aislamiento del compuesto de interés, por dos procedimientos:

1-Extracción con bisulfito de sodio al 15 %:

Con este método se extrae el *p*-hidroxibenzaldehído remanente mediante una reacción de adición de bisulfito al grupo carbonilo, mediante este procedimiento se logró aumentar la recuperación del compuesto **104** a un 85%.

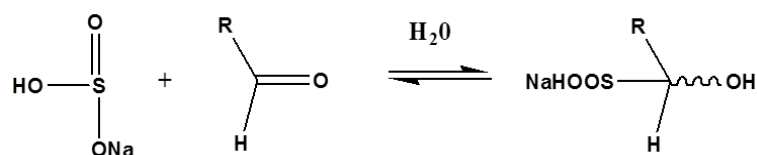


Figura 53. Reacción general de una adición bisulfitica a un carbonilo.

2- Precipitación:

Buscando un procedimiento sencillo y eficaz, luego de eliminar el solvente (benceno) a vacío, al producto crudo de reacción se le agregó una mezcla acetona:agua (1:1), a fin de eliminar las trazas de buffer y reactantes remanentes. Obteniendo el compuesto de interés en un 96% de rendimiento, permitiendo así preparar a una mayor escala el compuesto de interés, minimizando los gastos y tiempo.

El compuesto **75**, se obtuvo en forma de un sólido amarillo con punto de fusión 210-212°C, coincidiendo con lo reportado en la literatura.¹²⁸

V.1.3. Síntesis de benzoatos de 4-[(E)-2-(metoxicarbonil)-2-(7-cloroquinolil-4-iltio)vinil]fenilo (112a-n).

Para la síntesis de la serie **112a-n**, inicialmente se propuso la preparación de los correspondientes cloruros ácidos empleando cloruro de tionilo (SOCl_2) como agente clorante y benceno como solvente, estrategia ampliamente utilizada para la preparación de ésteres, esta transformación permitiría activar los ácidos haciéndolos más reactivos frente al fenol **75**, ver figura 54.

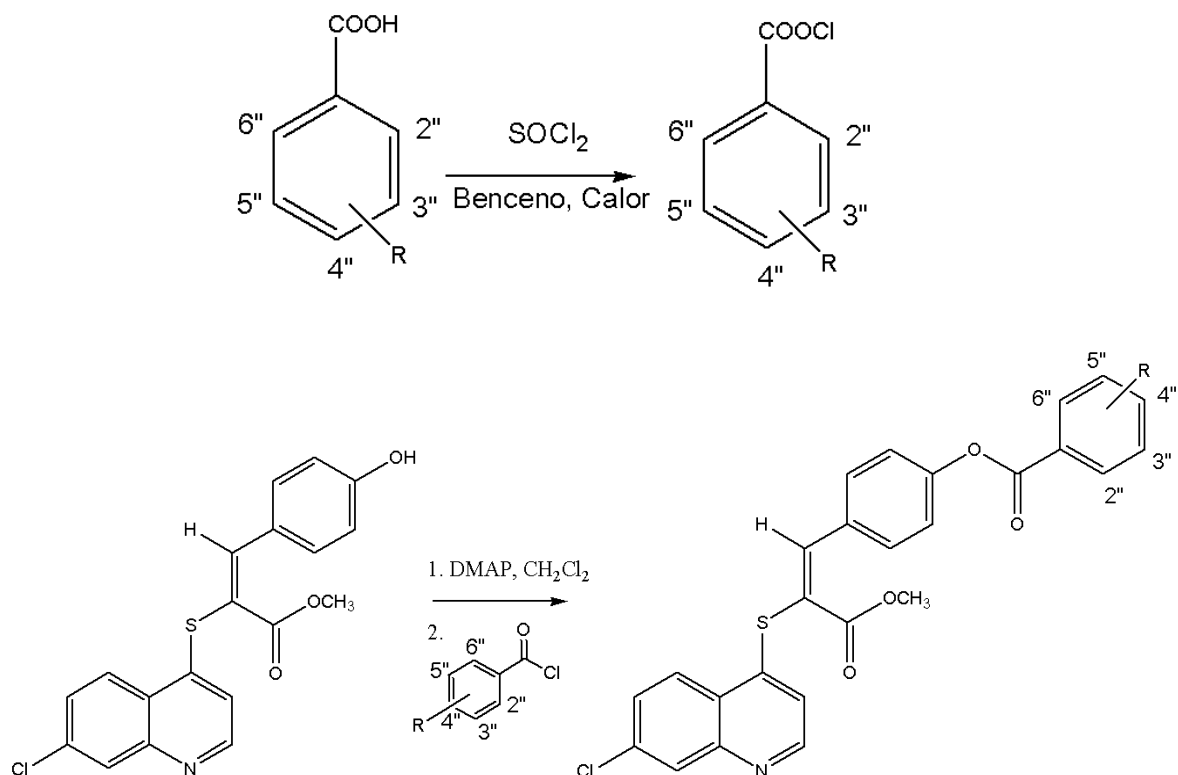


Figura 54. Reacción de esterificación propuesta para la síntesis de la serie **112a-n**.

Sin embargo, bajo las condiciones presentadas la reacción de esterificación no se consiguió con éxito.

A pesar de que en esta investigación no se hizo un estudio de velocidades de reacción, se evaluaron una serie de parámetros con el fin de estudiar si la reacción podía llevarse a cabo. Para ello se procedió a variar sistemáticamente cada condición:

1. Temperatura.
2. Orden de añadir los reactivos.
3. Relaciones estequiométricas.
4. Tiempo de reacción.
5. Solvente.

La reacción es denominada sustitución acílica y consiste en una secuencia de dos reacciones:

1. El ataque del nucleófilo al carbono acílico el cual cambia su hibridación de sp^2 a sp^3 .
2. La salida del grupo $-X$, restableciéndose la hibridación sp^2 del carbono.

La velocidad neta y éxito de la sustitución acílica depende de la facilidad con la cual los grupos X o Nu se pierdan a partir del intermediario tetraédrico. Si Nu sale más rápido que X la reacción se revierte a los reactantes; si por el contrario, X sale más fácil que Nu la reacción de sustitución procede.¹⁵⁶

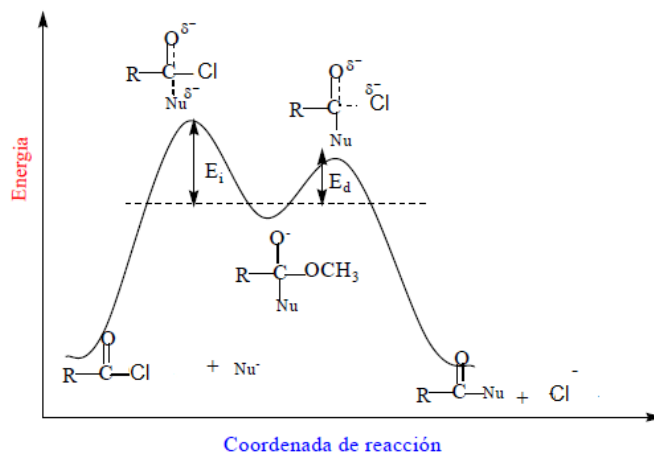


Figura 55. Perfil de energía para una reacción de sustitución acílica general.

Esto implica que las energías de activación E_i y E_d , es decir, las energías necesarias para alcanzar los dos estados de transición a partir del intermediario

tetraédrico, controlan la reacción de descomposición del intermediario. La reacción se ve favorecida en la medida que exista un buen grupo saliente, en este caso se transformo el grupo hidroxilo del ácido al correspondiente halogenuro de acilo (-Cl).

La naturaleza del nucleófilo juega un papel importante en esta reacción y a ello se le adjudico la no obtención del producto de interés, al ocurrir la reacción ácido-base entre el fenol **75** y el DMAP, se obtiene una base conjugada altamente estabilizada hacia el sistema fenilacrilato, lo cual disminuye la nucleofilicidad de la misma impidiendo así que el ataque al carbono acílico pueda llevarse a cabo. Estas estructuras las podemos apreciar en la siguiente figura:

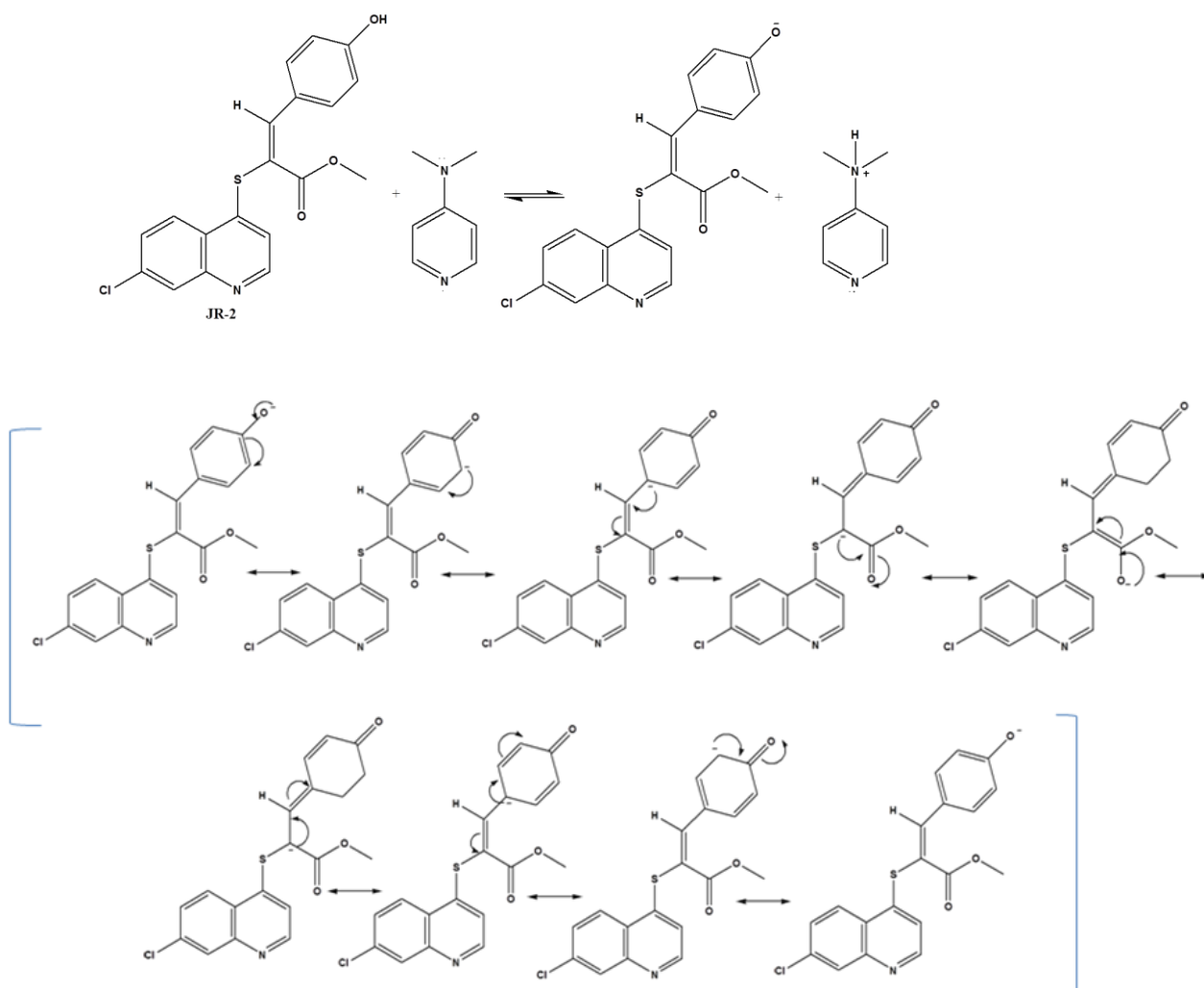


Figura 56. Estructuras resonantes de la base conjugada del compuesto **75**.

En vista a la no obtención de los fenilbenzoatos correspondientes, se procedió a emplear como agente activante el hidrocloreto de 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCI o EDAC), mediante la reacción de esterificación modificada de Steglich (ver figura 57). Una reacción suave, que permite la conversión de sustratos estéricamente exigente y lábiles en medio ácido o compuestos con baja capacidad nucleofílica, este último es el caso de la síntesis anteriormente presentada.¹⁵⁷

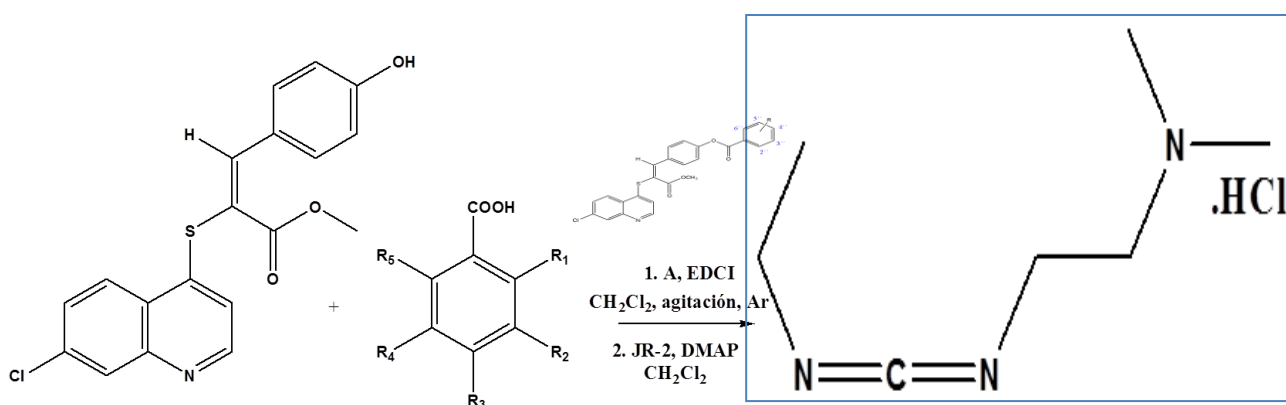


Figura 57. Reacción modificada de Steglich, síntesis de serie 112a-n.

Dentro de la propuesta mecanística, se ha reportado que el EDCI y el ácido carboxílico son capaces de formar un intermedio de O-acilisourea, que ofrece una reactividad similar a la del anhídrido de ácido carboxílico correspondiente. Se propone que la reacción inicie con una reacción ácido base entre el ácido carboxílico y uno de los nitrógenos del EDCI, seguida por una reacción de adición del carboxilato resultante al carbono diimidico, generando así el intermediario O-acilisourea. Una vez formado este intermediario, el fenóxido generado entre el compuesto **75** y el DMAP, puede adicionarse al carbono acílico promoviendo la reacción de trans-esterificación, liberando la sal de urea correspondiente y el compuesto de interés (figura 58). En este tipo de reacciones se ha encontrado que la presencia de al menos 5-10% de DMAP es

importante para que la reacción pueda llevarse a cabo, se propone que el DMAP actué como base para formar el fenóxido y además tenga como función actuar como reactivo de transferencia de acilo, al adicionarse al intermediario O-acilisourea formando una “amida activa”,¹⁵⁷ de esta manera y subsiguiente reacción con el fenóxido da el éster (figura 59).

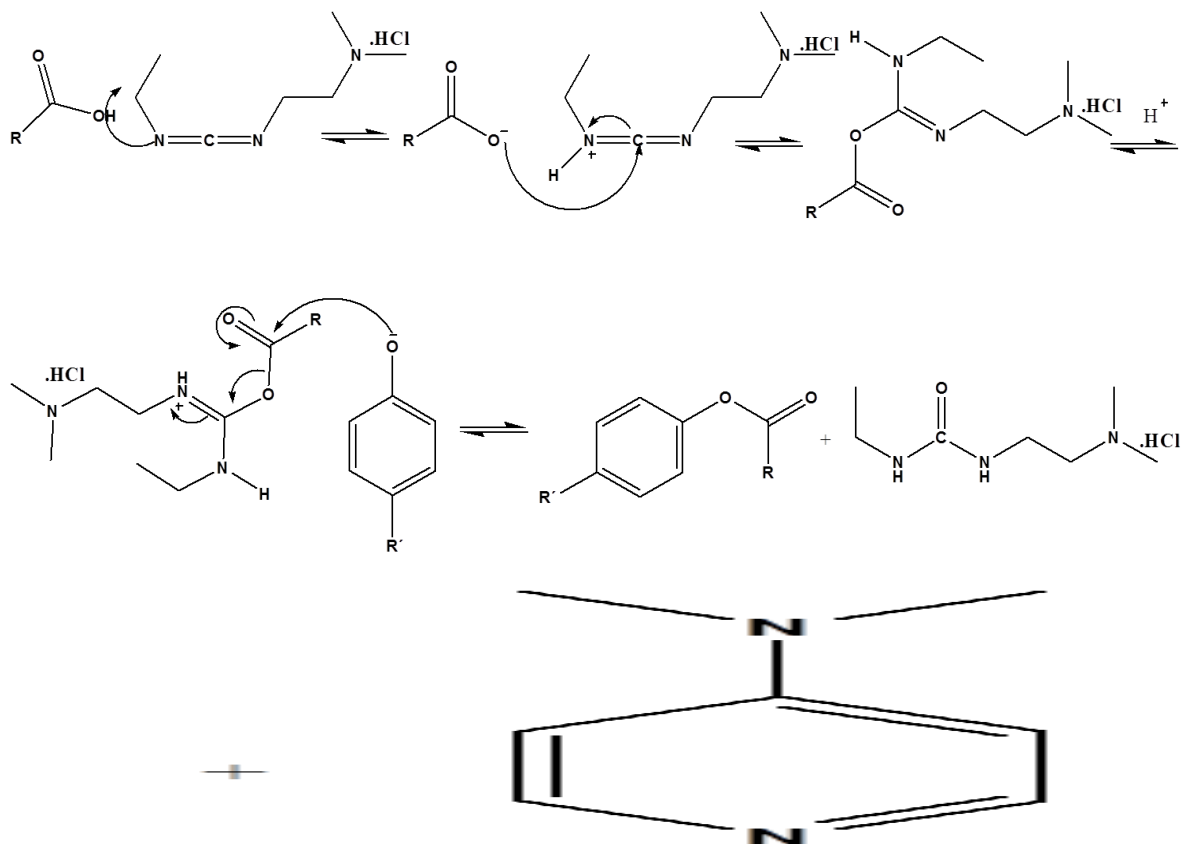


Figura 58. Mecanismo propuesto para la reacción modificada de Steglich.

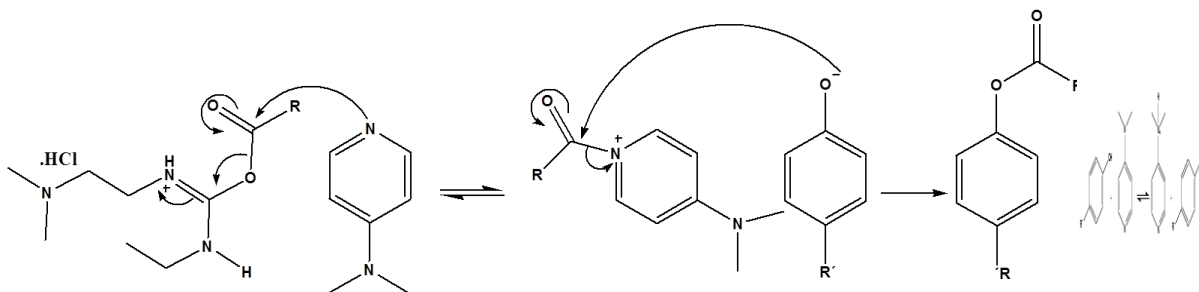


Figura 59. Mecanismo propuesto para la catálisis con DMAP, formación de “amida activa”.

La tabla IV, resume las condiciones optimas encontradas, para la obtención de los esteres **112a-n**.

Tabla IV. Condiciones optimas encontradas en la esterificación de la serie **112a-n**

Relación estequiométrica 75:109a-n:EDCI:DMAP	1: 1,2: 1,5: 0,3
Tiempo	48 h
Temperatura	Ambiente

La purificación de los compuestos se realizó empleando como método la recristalización en metanol. Con rendimientos entre 30-60%.

Tabla V. Porcentajes de rendimiento y características físicas y químicas de la serie **112a-n**.

Compuesto	R ₂ ⁿ	R ₃ ⁿ	R ₄ ⁿ	R ₅ ⁿ	R ₆ ⁿ	Punto de fusión °C	Rendimiento %	Color	^a LogP
112 ^a	OMe	OMe	OMe	H	H	132-134	38	Amarillo	4.602
112b	H	OMe	OMe	OMe	H	140-142	41	Amarillo	4.602
112c	OMe	H	OMe	OMe	H	120-122	43	Amarillo	4.602
112d	OMe	OMe	H	OMe	H	152-154	47	Amarillo	4.602
112e	H	OBz	OBz	OBz	H	226-228	36	Blanco	9.932
112f	OMe	OMe	H	H	H	166-168	50	Blanco	4.855
112g	OMe	H	OMe	H	H	130-132	50	Blanco	4.855
112h	OMe	H	H	H	OMe	200-202	51	Blanco	4.855
112i	H	OMe	OMe	H	H	178-180	35	Blanco	4.855
112j	H	OMe	H	OMe	H	198-200	47	Blanco	4.855
112k	OMe	H	H	H	H	148-150	53	Blanco	5.107
112l	H	OMe	H	H	H	154-156	53	Blanco	5.107
112m	H	H	OMe	H	H	130-132	37	Blanco	5.107
112n	H	H	H	H	H	138-140	50	Blanco	5.360

^a Calculado a partir del modulo Project Leader del Programa CaChe 3.0

Las estructuras de los derivados **112** fueron establecidas de manera inequívoca mediante el análisis de los espectros IR, RMN¹H en una y dos dimensiones, RMN¹³C, experimentos HETCOR y FLOCK, así como algunos espectros de masas y análisis elementales.

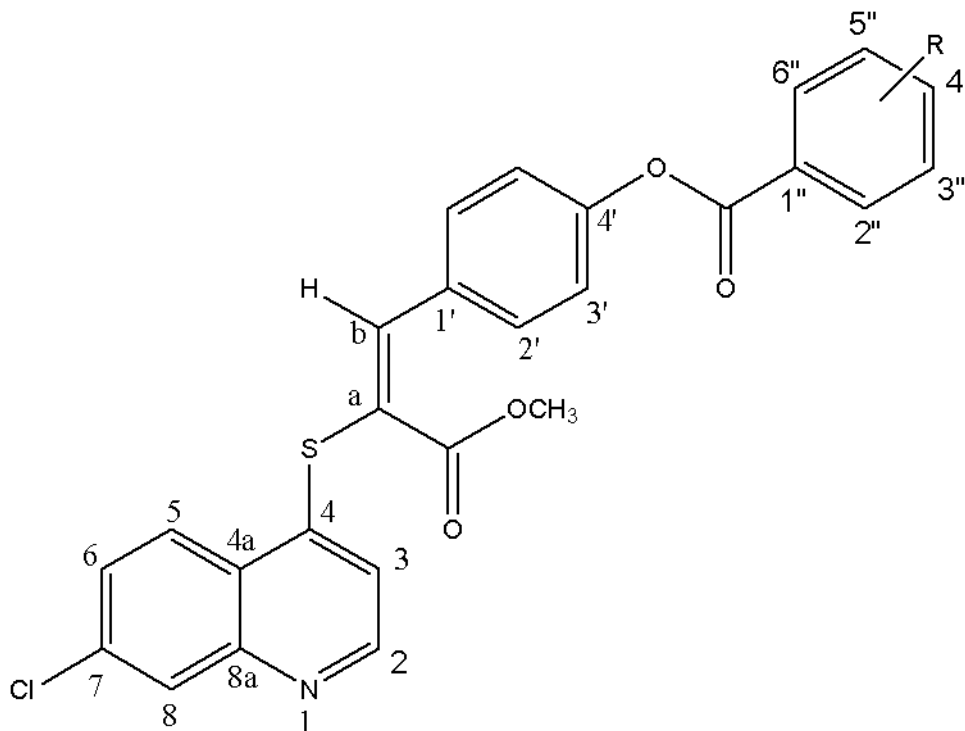


Figura 60. Estructura general y numeración de los derivados **112**.

En el análisis de los espectros IR de la serie **112a-n**, en general, se observan las bandas características del estiramiento C=O de los ésteres metílicos y del sistema benzoato. En intervalos de 1705-1690 cm⁻¹ y 1735-1711cm⁻¹ respectivamente. Además la ausencia de la banda de estiramiento OH del fenol o ácido de partida en la zona de 3400-3000 cm⁻¹, con lo cual se confirma el acoplamiento. Se pueden identificar otras bandas que carecen de importancia práctica.

En los espectros de RMN¹H, se pueden identificar de forma general a campo alto las siguientes señales: Los protones del grupo metoxi presente en el éster metílico, en forma de singlete con desplazamientos entre 3.76-3.74 ppm,

así como las señales de los protones de los grupos metoxi del anillo benzoato según el patrón de los diferentes ésteres sintetizados, con desplazamientos de los singletes entre 3.94-3.86 ppm, exceptuando los compuestos **112e** y **112n** que no presentan grupos metoxilados sobre el sistema benzoato.

En la región aromática se evidencian la mayoría de las señales, comenzando con los protones del sistema benzoato que presentan desplazamientos entre 7.46-6.40 ppm dependiendo del patrón de sustitución. En general se desplaza a campos más bajos los protones en 2" y 6" en comparación con los protones en 4" y 3" y 5" por la presencia del cono de anisotropía del carbono acílico.

Las señales características del anillo quinolínico se pueden encontrar alrededor de 7.10 ppm, se identifica un doblete asignado al protón H-3 con una constante de acoplamiento típica de 4.7 Hz, acoplado con un doblete alrededor de 8.63 ppm asignado al protón H-2.

De forma característica se puede observar alrededor de 7.56 ppm un doblete de doblete asignado al protón H-6, con constantes de acoplamiento orto y meta $J_{6-5}=9.5\text{Hz}$, $J_{6-8}=1.7\text{Hz}$ respectivamente, acoplado con los protones H-5 y H-8 cuyas señales se ven inmersas en un multiplete alrededor de 8.15 ppm, otra señal característica para todo el grupo de compuestos de esta serie es un singlete alrededor de 8.52 ppm y se asigna al protón olefínico del sistema acrilato H-b.

Las señales características del sistema A'B' fenilico se centran en 7.23 ppm a modo de doblete asignado al protón H-3' con constante de acoplamiento $J_{2'-3'}=8.6\text{ Hz}$ desdoblado con el protón H-2' asignado al doblete en 7.90 ppm del sistema A'B' fenilico.

En el caso del compuesto **112e**, se puede identificar la señal característica de los protones metilénicos del grupo bencilo en 5.13 ppm.

En los espectros de RMN¹³C, se observan las señales características de los 21 carbonos de la estructura general, y adicionalmente para cada derivado en específico se observan las señales correspondientes a los carbonos de los grupos metoxi a campo alto, alrededor de 60 ppm. A campo ligeramente más alto en 56 ppm se identifica el carbono de la porción alcohólica del éster metílico. Con ayuda del experimento en dos dimensiones de correlación heteronuclear proton-carbono (HETCOR) y el experimento a larga distancia FLOCK se identificaron inequívocamente los siguientes carbonos; C-3' (107 ppm), C-3 (116ppm), C-2' (122 ppm), C-5 (125 ppm), C-6 y C-8 (128 ppm), carbono vinílico =CH (132 ppm), carbono C-2 (153 ppm). Además, se asignó la señal en 153 ppm al carbono cuaternario C1' mediante la correlación con los protones H2'.

En cuanto a los espectros de masas se identificaron los picos más resaltantes entre ellos el pico correspondiente al fragmento M+1 que se relaciona con la masa molecular de los compuestos evaluados. Se identificaron además los picos correspondientes a las escisiones típicas de los ésteres, se presenta un pico característico de (M-60) atribuido a la pérdida del grupo acetilo y el correspondiente pico asignado a la escisión del enlace carbono acílico-oxígeno del benzoato, atribuida a la pérdida de la parte fenólica del éster (M-371).

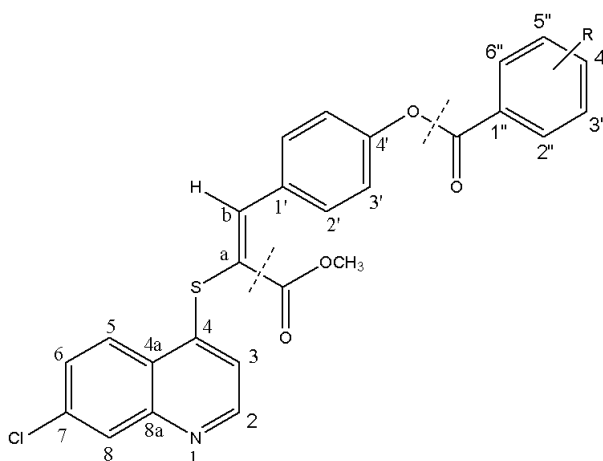


Figura 61. Escisiones principales encontradas en los espectros de masas de los derivados **112**.

Para la discusión espectroscópica de la serie se selecciono el compuesto **112a**: 2,3,4-trimetoxibenzoato de 4-(E)-2-(metoxicarbonil)-2-(7-cloroquinolin-4-iltio)vinil)fenilo.

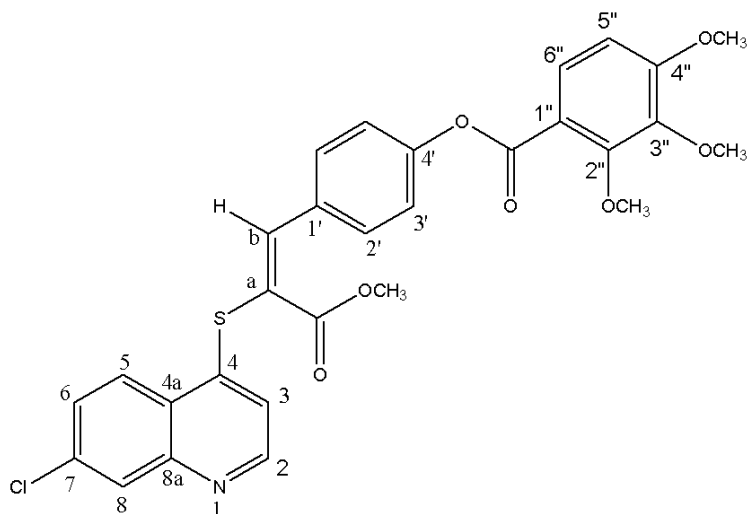
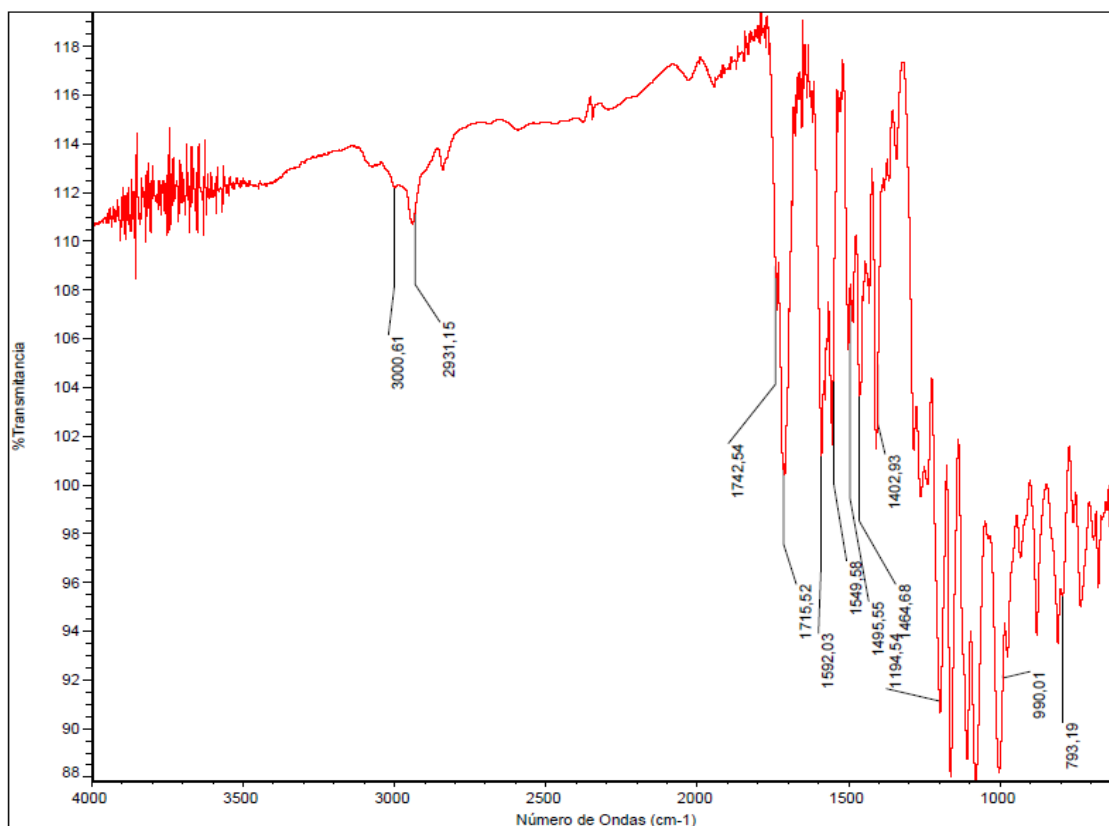


Figura 62. Estructura química del compuesto **112a**.

En el espectro IR, (espectro 1), tomado con un equipo Nicolet IS5 con celda iD3 Zn-Zr, destacan dos bandas agudas atribuidas a las vibraciones C=O de los carbonos acílicos. A 1742cm^{-1} banda asignada al carbono acílico del éster metílico y en 1715cm^{-1} la banda asignada al carbono acílico del benzoato. Además la ausencia de la banda de estiramiento OH del fenol de partida o ácido de partida en la zona de $3400\text{-}3000\text{cm}^{-1}$.



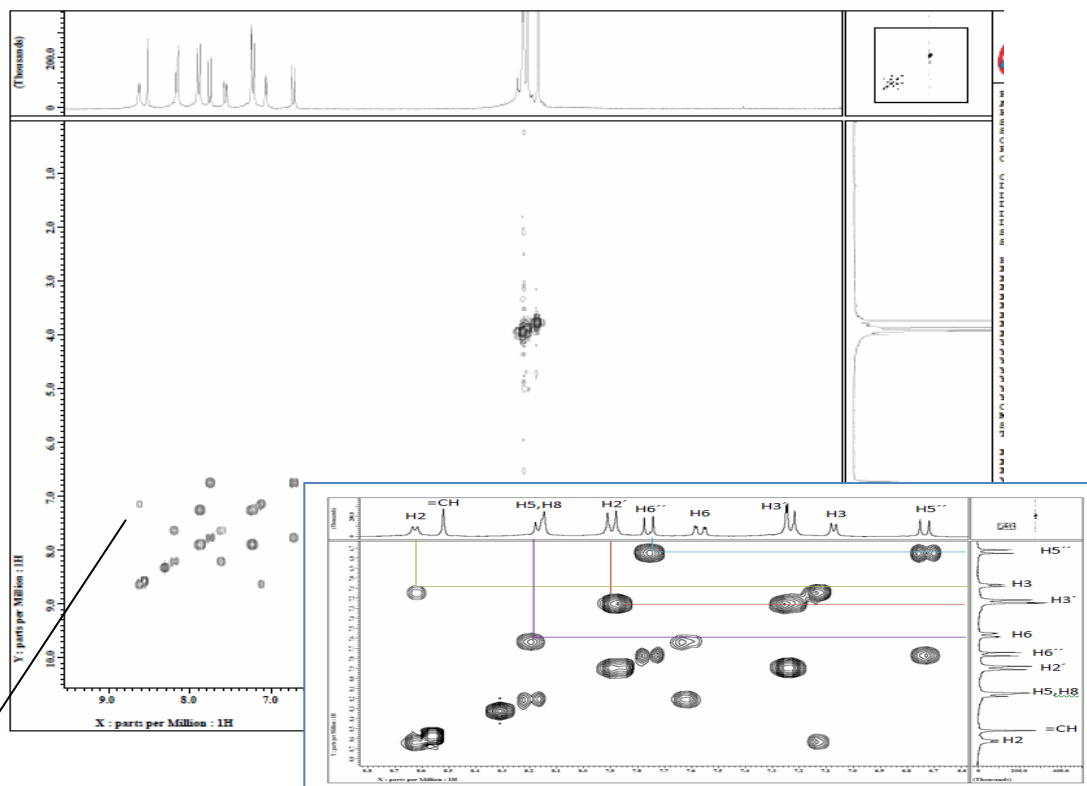
Espectro 1. Espectro IR del compuesto **112a**.

En el espectro de RMN¹H, (CDCl₃, 270 MHz) (espectro 2) se identificaron las siguientes señales, comenzando a campo más alto: se observa un singlete en 3.74 ppm que integra para 3 protones que corresponden a la porción alcohólica del éster metílico. Seguidamente se evidencia los protones correspondientes a los metoxidos del benzoato para un patrón de sustitución 2, 3, 4. Cada señal se observa como singletes integrando para 3 protones cada uno, el singlete a 3.87 ppm, 3.92 ppm y 3.94 ppm.

En 6.74 ppm se observa un doblete que integra para un protón y es asignado al protón H-5'' con $J_{5''-6''}=8.9$ Hz, acoplado con H6'' que es asignado al doblete encontrado en 7.76 ppm. En 7.07 ppm se observa una señal en forma de doblete que integra para un protón asignada a H-3 del sistema quinolínic, acoplado con el doblete a 8.63 ppm del sistema estudiado, que integra para un

protón y es asignado a H-2 con J de acoplamiento de 4,7 Hz. En 7.23 ppm se identifico un doblete asignado al protón H-3' con constante de acoplamiento $J_{2-3'}=8.6$ Hz desdoblado con el protón H-2' asignado al doblete en 7.90 ppm del sistema A'B' fenilico.

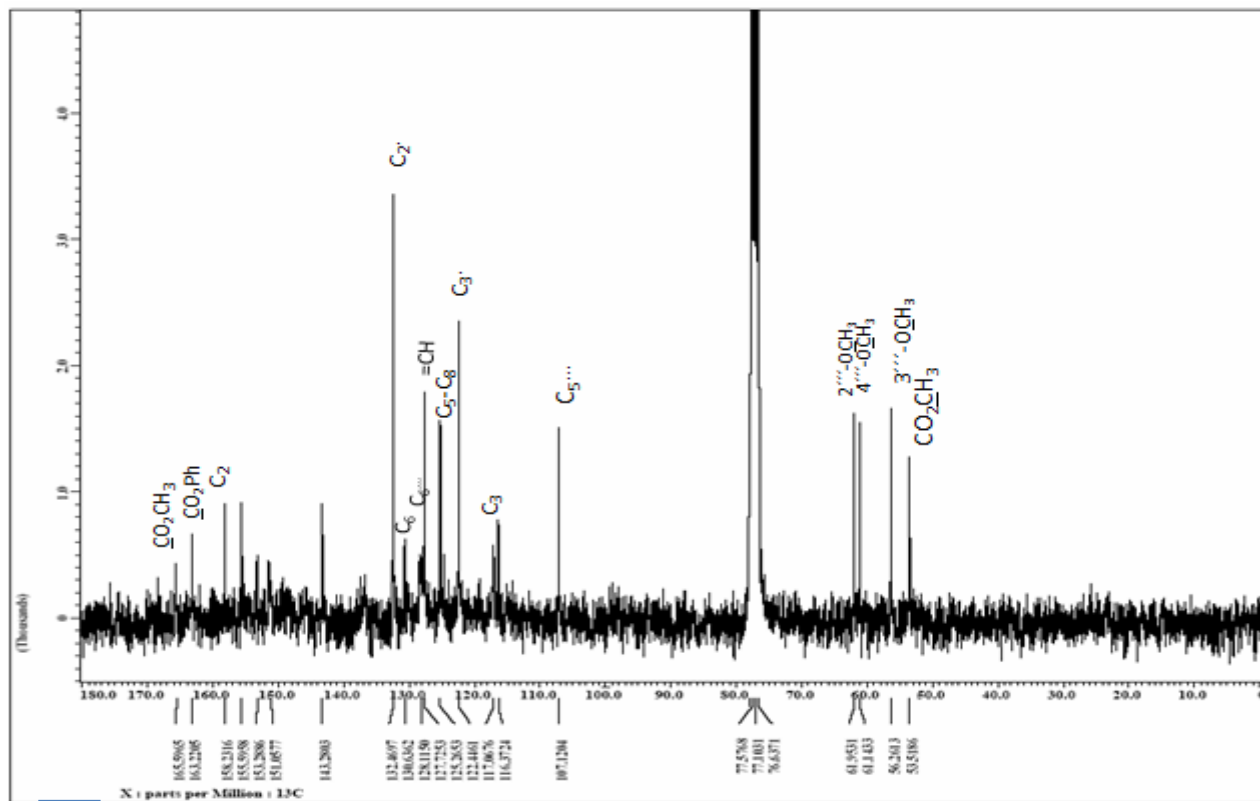
En 7.56 ppm se observa un doblete de doblete asignado al protón H-6, con constantes de acoplamiento orto y meta $J_{6-5}=9.5\text{Hz}$, $J_{6-8}=1.7\text{Hz}$ respectivamente, acoplado con los protones H-5 y H-8 cuyo desplazamiento se asignó al multiplete en 8.16 ppm (señales solapadas). A 8.52 ppm se observo un singlete que integra para un protón y es asignado al protón olefínico del sistema acrilato. Los acoplamientos se corroboraron con el experimento COSY. (Espectro 3).



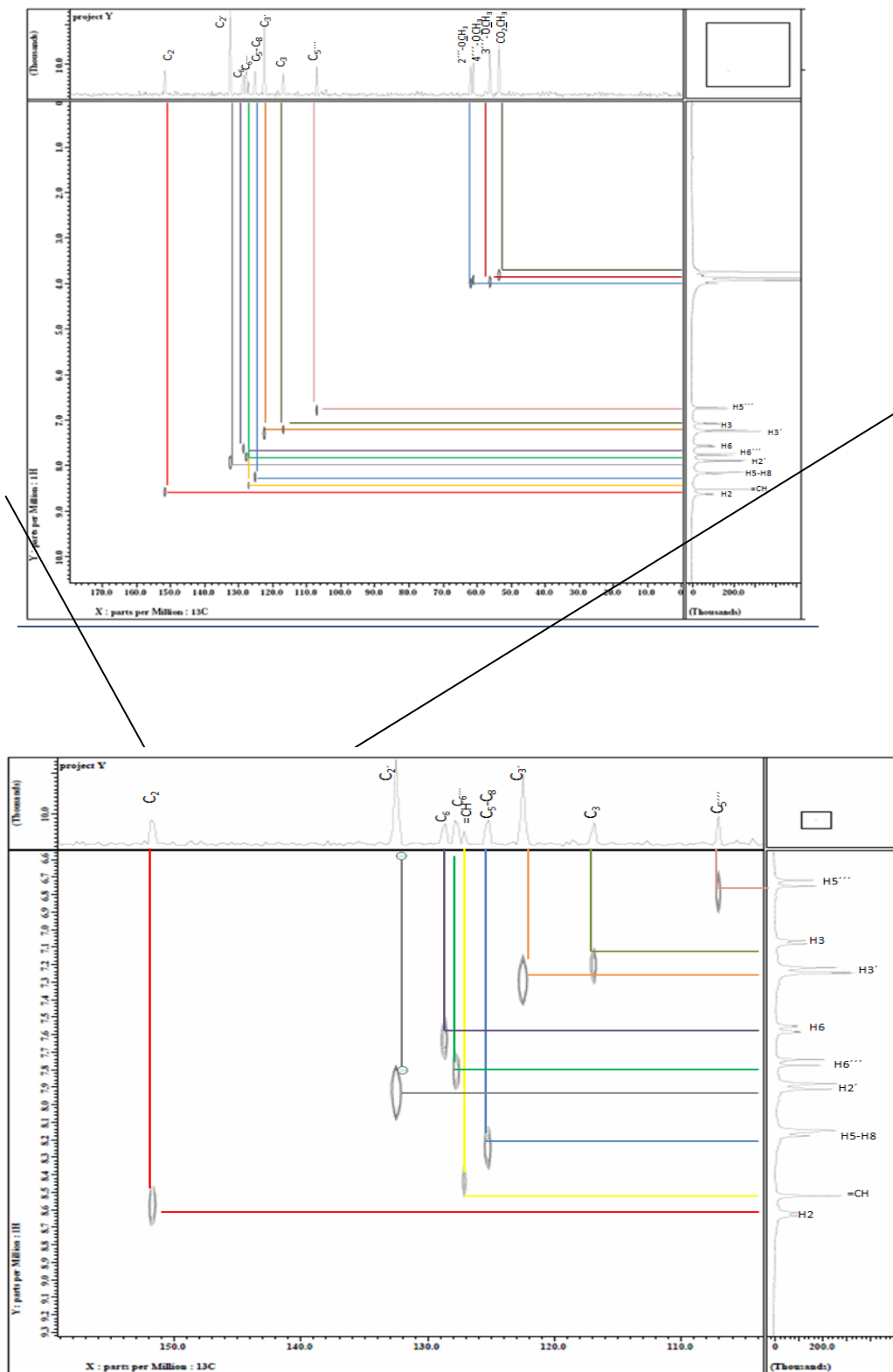
Espectro 3. Espectro COSY de compuesto **112a** y su ampliación.

En el espectro de RMN¹³C, (CDCl₃, 67,94 MHz) (espectro 4), se pueden distinguir a campo bajo dos señales en 163 ppm y 165 ppm asignadas a los carbonos acílicos de los esteres benzoato y metílico respectivamente.

Con ayuda del experimento en dos dimensiones de correlación heteronuclear protones-carbono (HETCOR, espectro 5), se identificaron inequívocamente los siguientes carbonos; C-3' y C-5'' (107 ppm), C-3 (116ppm), C-2' (122 ppm), C-5(125 ppm), C-6 y C-8 (128 ppm), carbono vinílico =CH (132 ppm), C-6''(131ppm), carbono C-2 (153 ppm).

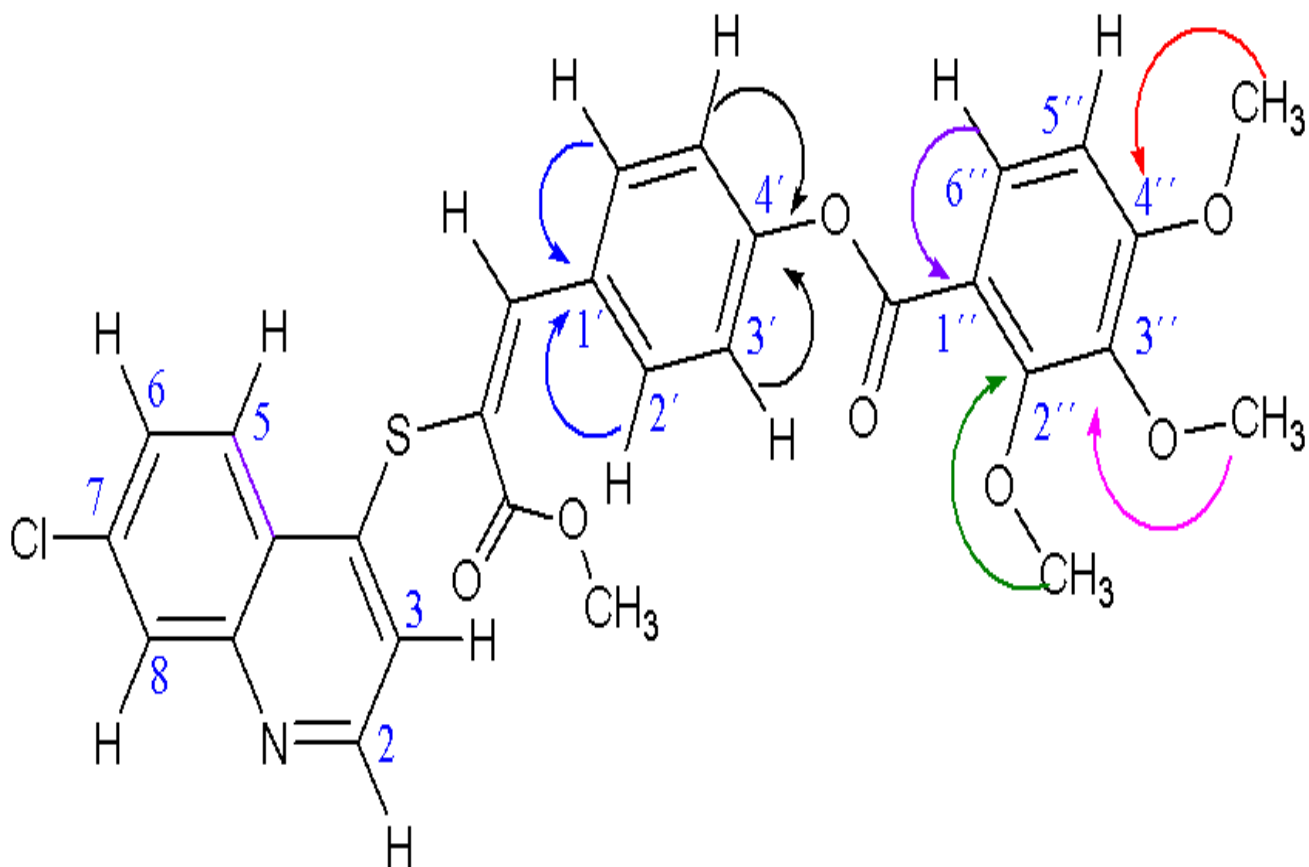
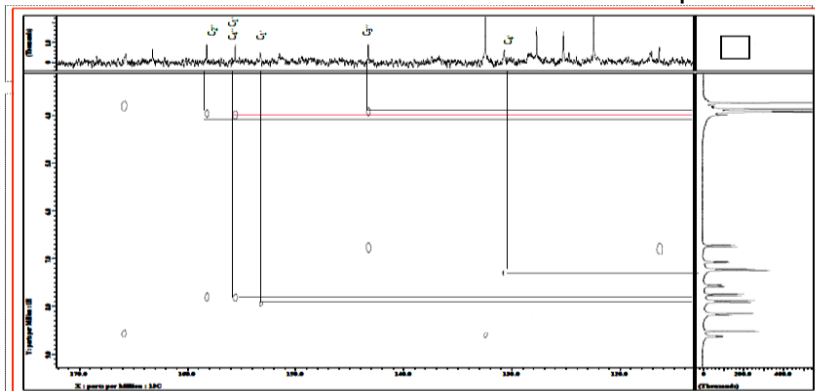


Espectro 4. Espectro RMN¹³C de **112a** y su ampliación.



Espectro 5. Espectro HETCOR de compuesto **112a** y su ampliación.

Empleando el experimento a larga distancia FLOCK se identificaron el resto de los carbonos (ver espectro 6): Los protones del grupo 3''-OCH₃ se correlacionan con el carbono C-3'' asignado a la señal en 143 ppm. Se asignó la señal en 153 ppm al carbono cuaternario C-1' mediante la correlación con los protones H-2'. El carbono C-4'' correlacionado con los protones del metoxi 4''-OCH₃ se asignó a la señal en 155 ppm, en cuyo desplazamiento también se asignó al carbono cuaternario C-1''' correlacionado con el protón H-6''.



Espectro 6. Espectro FLOCK de compuesto 112a.

En el espectro de masas del compuesto **112a** (espectro 7), se identificaron los picos más resaltantes entre ellos el pico correspondiente al fragmento M+1 en 566,06 m/z que se relaciona con la masa molecular del compuesto **112a**. Se identificaron además los picos correspondientes a las escisiones típicas de los ésteres, se presenta un pico en 506.06 m/z (M-60) atribuido a la pérdida del grupo acetilo. En 194,95 m/z se identifica un pico asignado a la escisión del enlace carbono acílico-oxígeno, atribuida a la pérdida de la parte fenólica del benzoato (M-371).

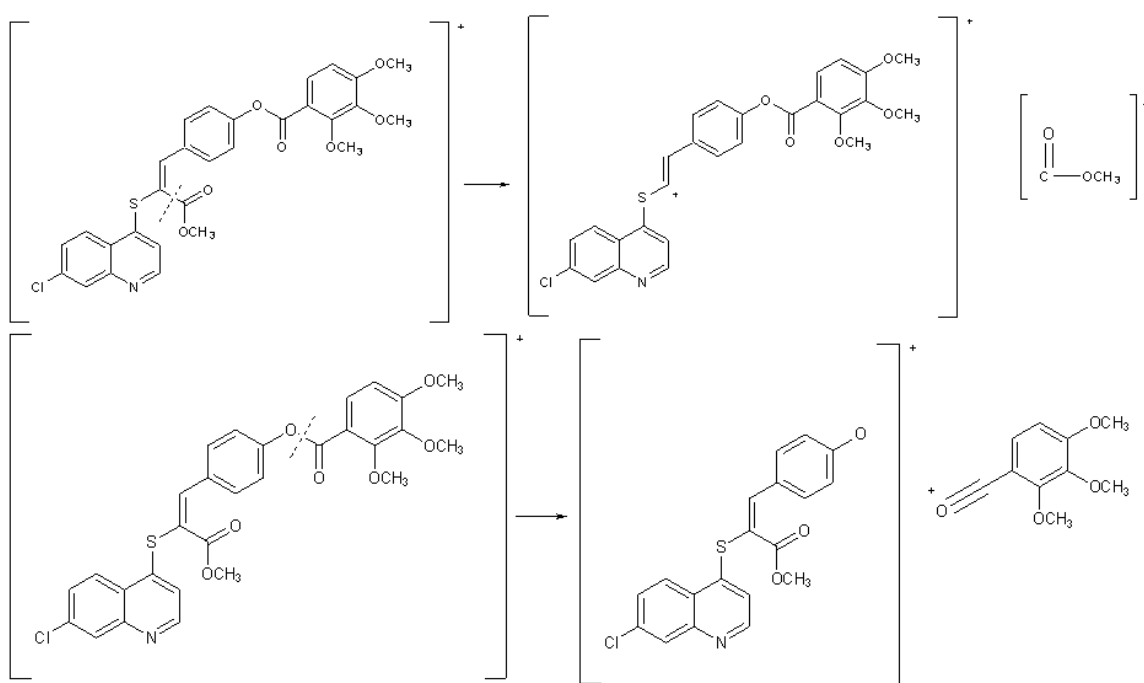
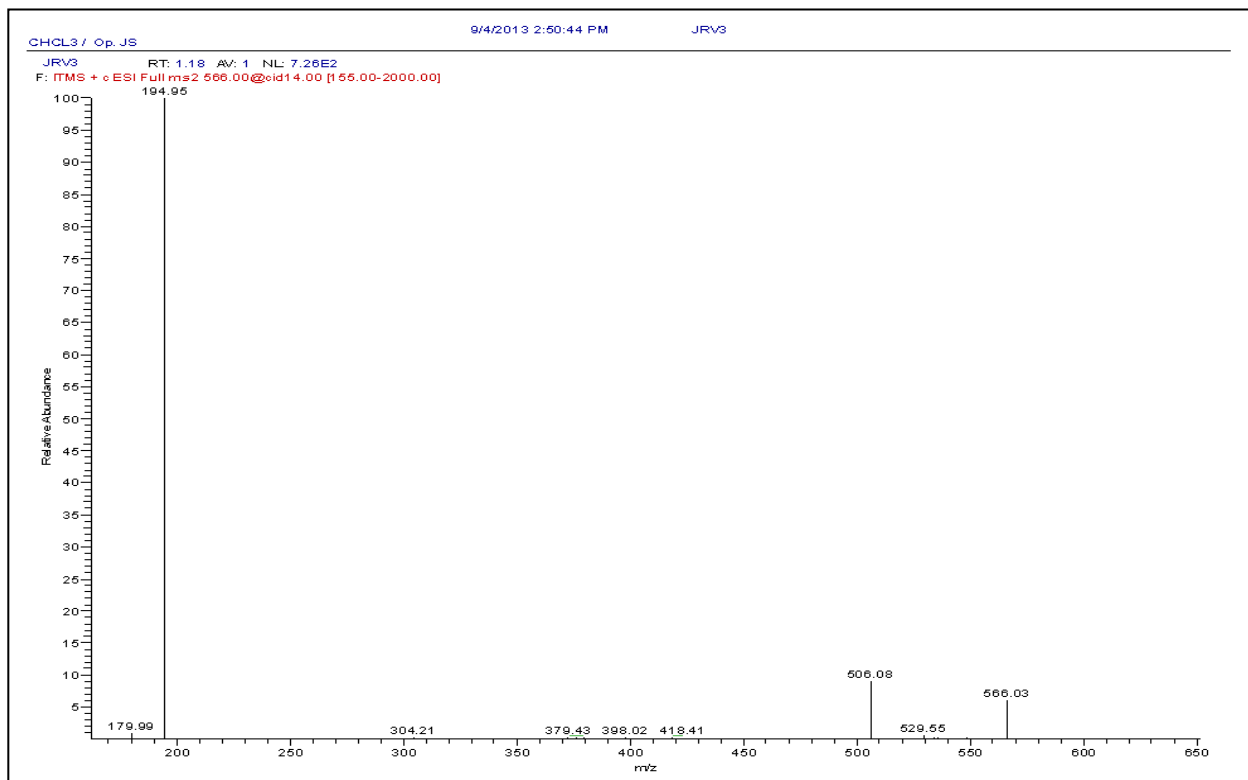


Figura 63. Patrón de fragmentación propuesta para el espectro de masas del compuesto **112a**.



Espectro 7. Espectro masas de compuesto **112a**.

En relación al análisis elemental, fueron determinados para algunos derivados. Los resultados fueron entre ± 0.4 de los valores calculados.

Para el compuesto **112a** se encontró lo siguiente:

Calculado: **C** 61.54 % **H** 4.27% **N** 2.47%

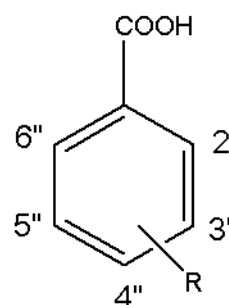
Encontrado: **C** 61.87 % **H** 3.97% **N** 2.63%

Inicialmente dentro de la estrategia de farmacomodulación, se considero sólo la incorporación de sistemas metoxilados en los benzoatos finales, motivado por los reportes en la literatura de la importancia que estos grupos

han tenido dentro de estructuras que presentan actividad antimalárica y citotóxica-antitumoral.¹⁵⁷⁻¹⁶¹ Sin embargo, en vista de los resultados biológicos obtenidos (V.2. Sección biológica) se propuso la incorporación de halógenos con el fin de variar la lipofilicidad y características electrónicas en posiciones claves que permitieran profundizar un estudio estructura química actividad. Para ello se procedió a ensayar con los siguientes ácidos carboxílicos disponibles en el laboratorio:

Tabla VI: Patrón de sustitución de los ácidos halogenados ensayados

Compuesto	R ₂ ''	R ₃ ''	R ₄ ''	R ₅ ''	R ₆ ''
112o	F	H	H	H	H
112p	Cl	H	H	H	H
112q	H	Cl	H	H	H
112r	Cl	Cl	H	H	H
112s	Cl	H	Cl	H	H



Al someter a los ácidos mostrados en la tabla VI con el compuesto **75**, a las condiciones de esterificación encontradas en la reacción modificada de Steglich, (tabla VI, página 142), no se pudo obtener un acoplamiento efectivo.

Se propone que por la naturaleza electrón atrayente de los sustituyentes del ácido, la formación del éster activo o del intermediario O-acilisourea se puede ver disminuida. Como se propuso en el mecanismo para la formación del intermediario, es necesario una adición del carboxilato al carbono diimidico, de esta manera el carácter nucleofílico de este carboxilato lo podemos relacionar con la energía total de la molécula, para ello se calculó mediante métodos *in-silico* la energía de los carboxilatos a fin de dar una explicación teórica a las evidencias experimentales encontradas. El cálculo de la energía se realizó empleando mecánica molecular para un campo extendido MM3, utilizando el programa Cache3.0. Se realizó una primera optimización empleando un campo de fuerza MM3 aumentado por gradiente conjugado. Un método que describe a

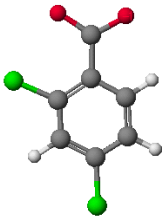
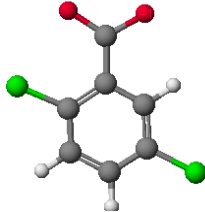
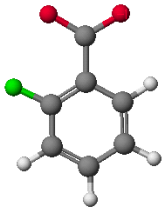
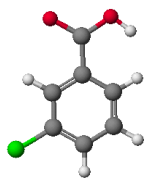
una molécula como una colección de átomos mantenidos juntos por fuerzas. Basados en esta descripción, cada una de las muchas estructuras moleculares en 3D es caracterizada por un valor de energía. Este valor es luego usado para optimizar la geometría de la estructura 3D. Este campo de fuerza se compone de lista de tipos de átomos, de cargas atómicas asociadas, parámetros de referencia y funciones matemáticas asociadas a cada término.

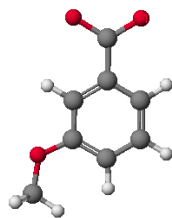
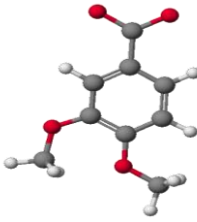
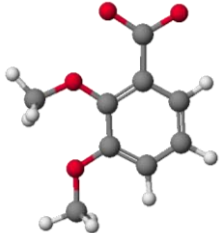
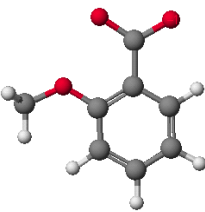
Se fijo una restricción con un máximo de interacciones de 500 y/o 0,001 Kcal/mol. Siendo en todos los casos la convergencia a 0,0001 cut off. Seguidamente se sometió a un proceso de optimización con un nivel de cálculo más fino empleando Block-Diagonal con un máximo de iteraciones de 500 y/o 0,001 Kcal/mol.

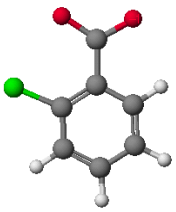
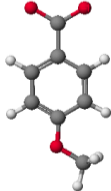
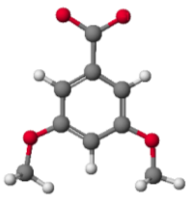
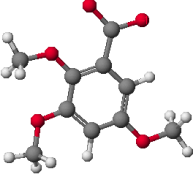
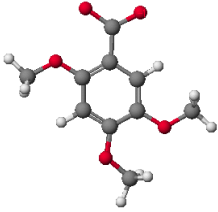
Una vez optimizadas las estructuras según lo descrito anteriormente, se procedió a la búsqueda de la conformación más estable, mediante un procedimiento de dinámica molecular con campo de fuerza MM3-Aumentado y un set de parámetros estándar. La simulación se realizó a una temperatura de 300 K, con un período de equilibrio de 5 ps, y una duración de 20 ps, estos parámetros se escogieron con el fin de no acelerar tanto la partícula y lograr simular o reproducir el movimiento natural de los átomos.

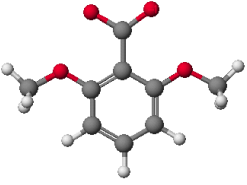
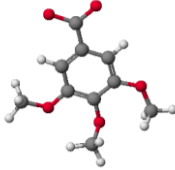
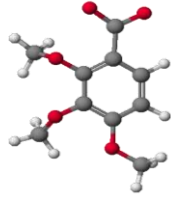
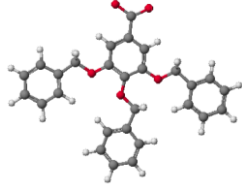
Una vez obtenido los mapas correspondientes se consideraron las estructuras que presentaron los mínimos valores de energía, las cuales se muestran en la tabla VII.

Tabla VII. Energías asociadas a los carboxilatos correspondientes.

Estructura carboxilato	Energía Kcal/mol
2,4-diclorobenzoato 	0,0700
2,5-diclorobenzoato 	1,7965
2-fluorobenzoato 	1,8680
3-clorobenzoato 	4,1484
2-clorobenzoato	4,6494

Estructura carboxilato	Energía Kcal/mol
3-metoxibenzoato 	10,2453
3,4-dimetoxibenzoato 	10,4229
2,3-dimetoxibenzoato 	13,0158
2-metoxibenzoato 	13,1428
2,6-dimetoxibenzoato	14,2715

	
4-metoxibenzoato	6,8400
	
Benzoato	7,6315
	
3,5-dimetoxibenzoato	8,5035
	
2,3,5-trimetoxibenzoato	9,0881
	
2,4,5-trimetoxibenzoato	9,2938

	
3,4,5-trimetoxibenzoato	14,4466
	
2,4-dimetoxibenzoato	15,1792
	
2,3,4-trimetoxibenzoato	16,7792
	
3,4,5-tribenzoilbenzoato	24,0926

*La energía de estas estructuras se calculo empleando el modulo CAChe 3.0, mediante mecánica molecular y dinámica molecular. Empleando un campo MM3.

En la tabla VII, se puede observar que la energía total de los carboxilatos es menor en el caso de sustituyentes como cloro y flúor, siendo el efecto aditivo al aumentar el número de heteroátomos en la estructura. Debido a la naturaleza electrón atrayente, los halógenos estabilizan el carboxilato disminuyendo así su nucleofilia y por tanto la formación del intermediario O-acilisourea se ve disminuida, que aunado a la baja reactividad del fenóxido de **75** previamente discutida, no permiten la obtención de los ésteres halogenados. En el caso de los derivados sintetizados a partir de los benzoatos metoxilados y benzoilados, la energía total de la molécula es en todos los casos mayores a 6.84 Kcal/mol; evidencias que son interesantes a considerar, en estrategias sintéticas futuras que empleen reactantes similares.

Se evaluaron las condiciones de reacción tal como en la optimización inicial, ensayándose otras condiciones que incluyeron cambio de solvente (tolueno, benceno y DMF), relaciones estequiométricas, además de ampliar los tiempos de reacción (monitoreo hasta 120 horas). En las reacciones que involucran EDCI el aumento de temperatura para favorecer los choques moleculares efectivos o energía al sistema no se puede realizar, puesto se ha reportado que tanto el EDCI como los intermediario tipo O-acilisourea se descomponen por encima de 25°C. Realizado este estudio de condiciones de reacción no se obtuvieron los compuestos deseados **112o-s**. Esto motivó al planteamiento de una nueva estrategia de síntesis, en función al esquema de retrosíntesis mostrado en la (figura 64). Es importante señalar que se consideró como equivalentes sintéticos los ácidos **111o-s** a pesar de lo antes descrito, ya que se emplea un compuesto con mayor capacidad nucleofílica como lo es la base conjugada del p-hidroxibenzaldehído, en relación al fenóxido de **75** (figura 65).

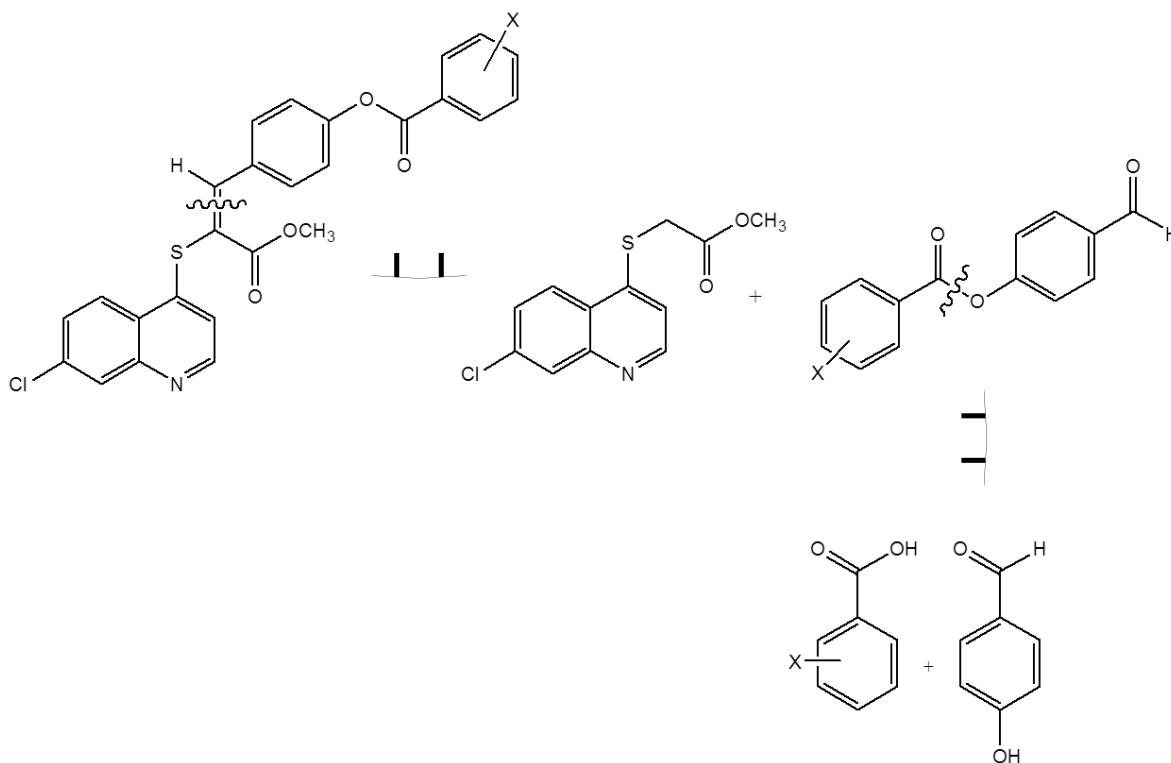


Figura 64. Esquema retrosíntesis para la síntesis de la serie **112o-s**

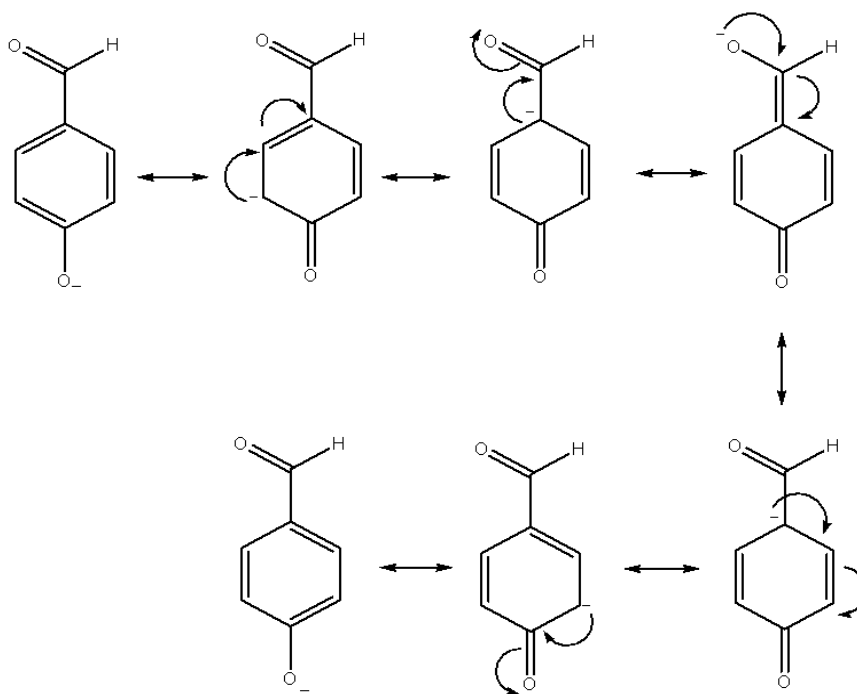


Figura 65. Estructuras de resonancia propuestas para la base conjugada de **110**.

La síntesis del primer grupo de intermediarios se llevó a cabo mediante las condiciones encontradas en la síntesis de la serie **112a-n**, empleando EDCI como agente activante y DMAP como catalizador. La purificación de los compuestos se realizó por medio de cromatografía de columna en fase normal empleando como fase móvil una mezcla acetato de etilo: Hexano (4:6), con rendimientos entre el 50-60%.

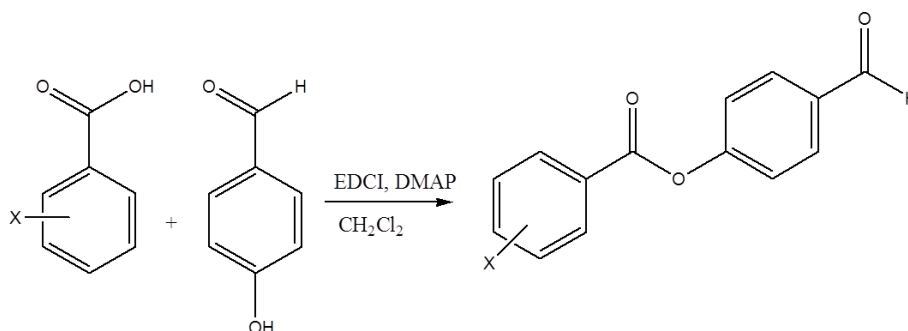


Figura 66. Síntesis de la serie **112o-s**

Sin embargo el acoplamiento final entre el aldehído esterificado y el compuesto 2-[4-(7-cloro-quinolinilsulfenil)] acetato de metilo **109** en presencia del buffer piperidina-ácido acético (Glacial), fue fallido.

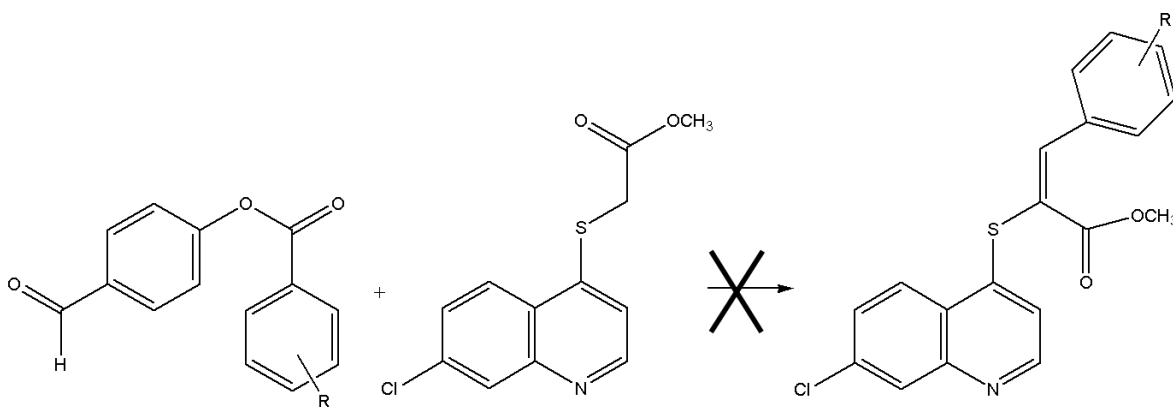


Figura 67. Reacción propuesta tipo Knoevenagel para la síntesis de **112o-s**.

V.1.4. Síntesis de análogos del bencimidazol

V.1.4.1. Síntesis de Ácido 2-(5-nitrofuran/tiofen-2-il)-3*H*-benzo[*d*]imidazol-6-carboxílico (115a-b)

Empleando como material de partida el ácido 3,4-diaminobenzoico y los nitrofuril-tienil aldehídos correspondientes, se procedió a la preparación de los bencimidazoles (**115a-b**). Para la síntesis del núcleo bencimidazol se han reportado varios métodos, en todos los casos es indispensable un ambiente oxidante a fin de obtener el núcleo bencimidazol.¹⁵⁹

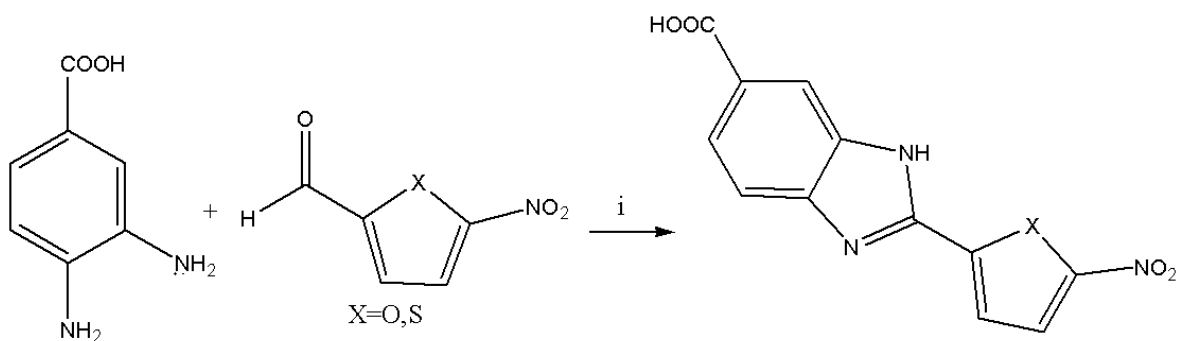


Figura 68. Síntesis de Ácido 2-(5-nitrofuran/tiofen-2-il)-3*H*-benzo[*d*]imidazol-6-carboxílico (**115a** (X=O) y **115b** (X=S))

Se propone que la reacción se lleve a cabo mediante una ciclocondensación-oxidación, mediante la adición del dinucleófilo al carbono carbonílico del aldehído. Se propone la formación de una enamina por la deshidratación del sistema y la posterior adición del grupo amino al carbono de la enamina recién formada. Seguidamente la reacción ácido-base entre el grupo carbonilo de la *p*-benzoquinona y el protón del anillo 2,3-dihidro-1*H*-bencimidazol promoviendo la oxidación de este último sistema y la reducción-aromatización de la *p*-benzoquinona a la hidroquinona correspondiente, este mecanismo se puede apreciar en la Figura 69.

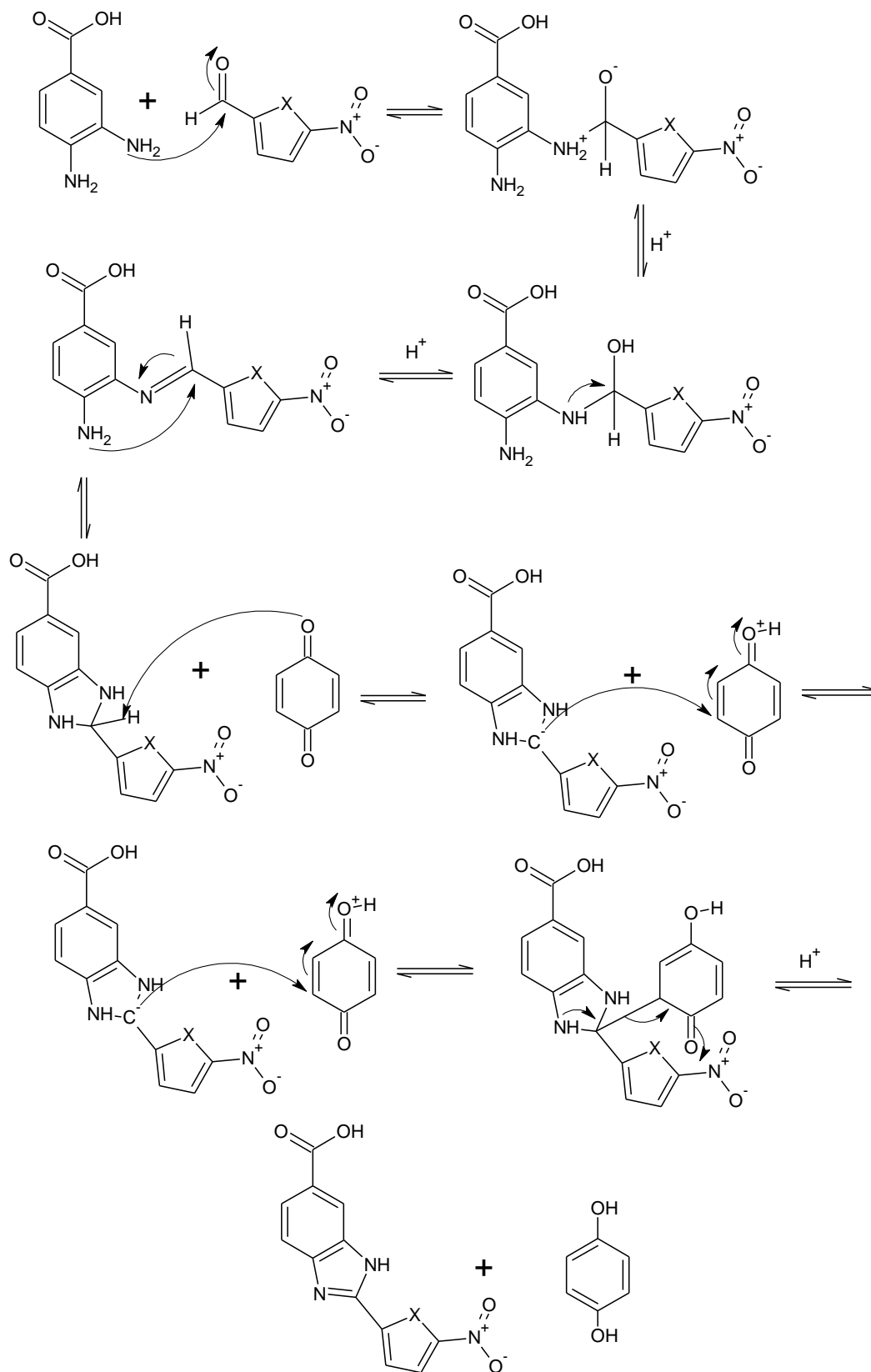


Figura 69. Mecanismo propuesto para la síntesis de bencimidazoles **115a-b**

La reacción de ciclo condensación entre dinucleófilos aromáticos y aldehídos ha sido ampliamente estudiada,¹⁵⁹⁻¹⁶⁴ se ha reportado por ejemplo el empleo de agentes oxidantes, el tratamiento de nitroanilinas con aldehídos en presencia de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_2$ (ditionita de sodio), así como el tratamiento de 2-haloanilinas con aldehídos en presencia de cloruro de cobre (I) y azida de sodio. Para la síntesis del núcleo bencimidazol en este trabajo se evaluaron tres agentes oxidantes:

- 1) Nitrobenceno
- 2) Aire
- 3) p-benzoquinona.

Estos dos últimos empleando etanol como solvente. De los sistemas estudiados el que presentó mayor ventaja en su utilización y rendimientos fue el agente oxidante p-benzoquinona (95 %) frente a un 65 % empleando nitrobenceno y un 15 % empleando aire (con tiempos de reacción de 48 horas).

V.1.4.2. 2-(5-nitrofuran/tiofen-2-il)-N-fenil-3H-benzo[d]imidazol-6-carboxamidas (117a-s, 118a-s)

Para la síntesis de las series **117a-s**, **118a-s** se propuso la siguiente reacción general (Figura 70).

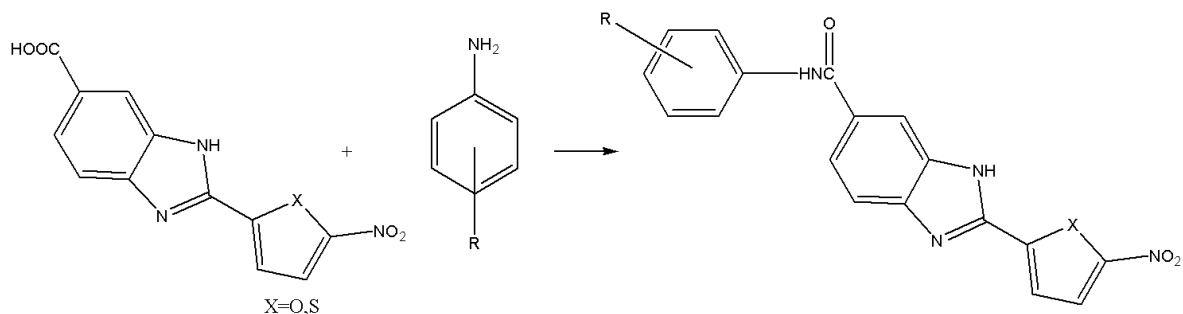


Figura 70. Reacción general, síntesis de **117a-s**, **118a-s**.

En la síntesis propuesta se evaluaron como agentes activantes el pentacloruro de fósforo (PCl_5), cloruro de tionilo (SOCl_2) y 1-Etil-3-(3-imetilaminopropil)carbodiimida (EDCI o EDAC).

-Empleo de Pentacloruro de fósforo (PCl_5):^{165,166}

La reacción de un ácido carboxílico con pentacloruro de fósforo produce un cloruro de ácido. La reacción va en primer lugar por un estado de transición cíclico con la eliminación de HCl. A continuación, a través de una adición nucleofílica de cloruro de donde el grupo acilo está protonado simultáneamente. El paso final es un estado de transición cíclico para formar el cloruro de ácido, HCl y oxicloruro de fósforo. Como se puede apreciar en la figura 71.

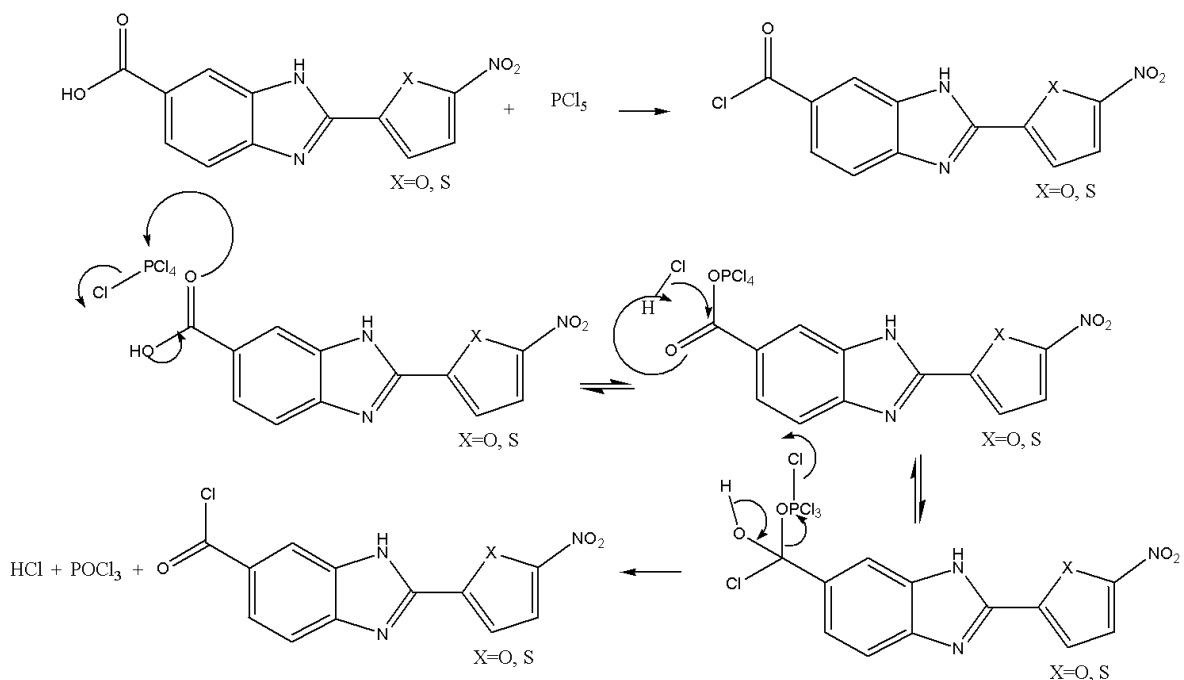


Figura 71. Mecanismo propuesto para la formación de cloruro ácido empleando pentacloruro de fósforo.

A pesar del amplio reporte de este tipo de reacción para la formación de cloruros ácidos, la obtención de los productos no es tan eficiente, motivado a la alta reactividad del halogenuro de fósforo empleado y a la generación de productos colaterales. Una vez formado el cloruro de acilo correspondiente se trató de incorporar las anilinas correspondientes, sin lograr aislar con un grado de pureza que permitirá caracterizar el producto de interés. Motivo por el cual se ensayo con cloruro de tionilo, un reactivo un poco más selectivo.

-Empleo de cloruro de tionilo (SOCl₂):^{165,166}

Se propone que la primera etapa de reacción es una esterificación del ácido carboxílico con cloruro de tionilo obteniendo un éster clorosulfónico, liberándose HCl. En esta primera etapa ocurre una activación del carbono acílico. Seguidamente se puede proponer la protonación del oxígeno del carbono acílico. Posteriormente, un cloruro que haya sido eliminado

previamente a partir de cloruro de tionilo, se adiciona al éster clorosulfonico. El intermediario resultante finalmente elimina un anión cloruro, dióxido de azufre y un protón, produciendo el cloruro de acilo correspondiente.

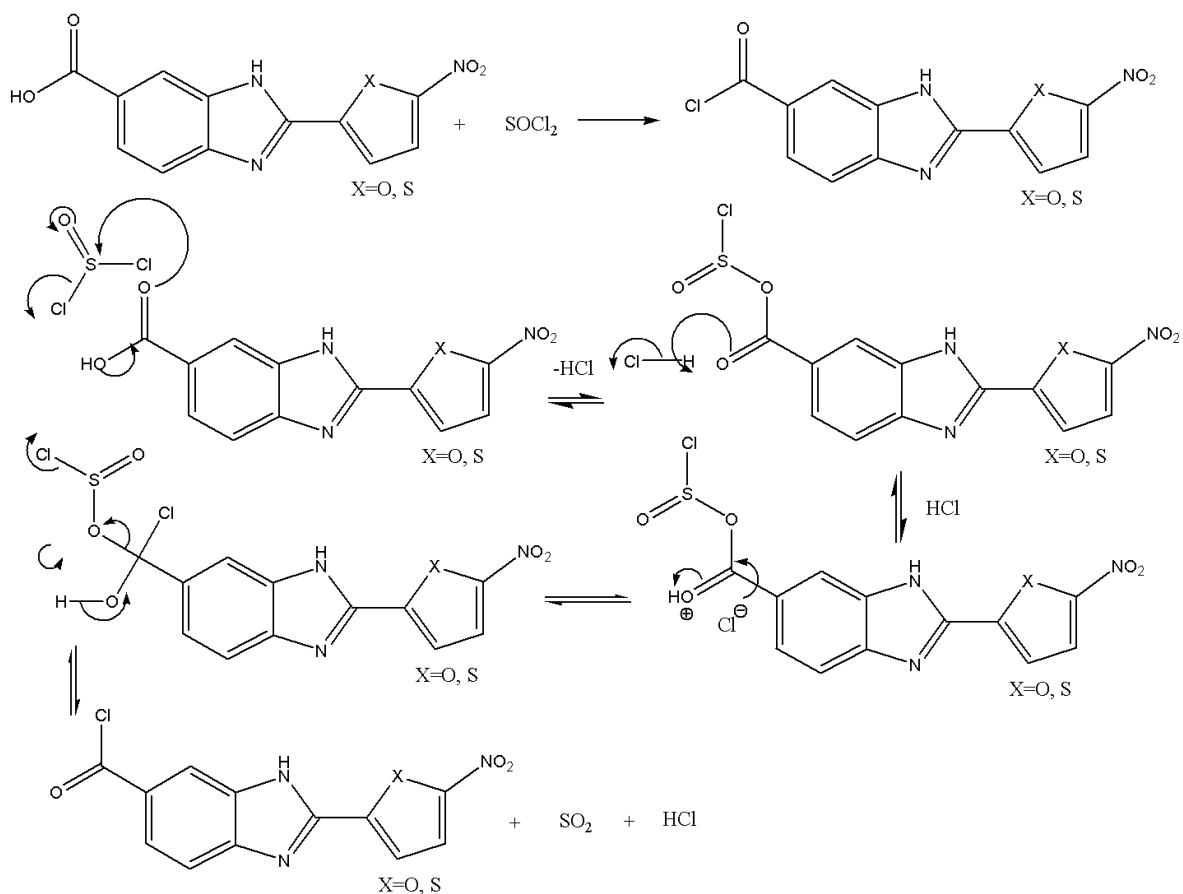


Figura 72. Mecanismo propuesto para la formación de cloruro ácido empleando cloruro de tionilo (SOCl₂).

Los productos de acoplamiento entre las anilinas correspondientes y el cloruro de ácido, no se lograron purificar, obteniéndose compuestos con características oleosas muy difíciles de manipular. Por tal razón, se ensayó el acoplamiento de Steglich, utilizando como agente activante el reactivo EDCI. Obteniendo los siguientes resultados:

Tabla VIII. Porcentajes de rendimiento y características físicas y químicas de la serie 2-(5-nitrofurán-2-il)-*N*-fenil-3*H*-benzo[*d*]imidazol-6-carboxamidas (Serie 117a-p)

Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Punto de fusión °C	Rendimiento %	Color	^a Log P
117a	H	OMe	OMe	OMe	H	>300	55	Marrón	2.375
117b	OMe	H	OMe	H	H	>300	53	Negro	2.628
117c	H	OMe	H	H	H	>300	45	Verde	2.880
117d	Me	H	Me	H	H	>300	40	Verde	4.067
117e	Me	H	H	Me	H	>300	45	Marrón	4.067
117f	H	Me	Me	H	H	>300	45	Marrón	4.067
117g	H	Me	H	Me	H	>300	39	Marrón	4.067
117h	H	Me	H	H	H	>300	37	Marrón	3.600
117i	Me	H	H	H	H	>300	39	Verde	3.600
117j	NO ₂	H	OMe	H	H	>300	31	Verde	2.834
117k	H	Cl	OMe	H	H	>300	33	Verde	3.398
117l	OMe	H	H	Cl	H	>300	35	Marrón	3.398
117m	Cl	H	H	H	H	>300	32	Marrón	3.651
117n	H	H	Cl	H	H	>300	36	Negro	3.651
117o	H	H	Br	H	H	>300	38	Negro	3.925
117p	H	H	CF ₃	H	H	>300	36	Marrón	4.016

^a Calculado a partir del módulo Project Leader del Programa CaChe 3.0

Tabla IX. Porcentajes de rendimiento y características físicas y químicas de la serie 2-(5-nitrotiofen-2-il)-N-fenil-3H-benzo[d]imidazol-6-carboxamidas (Serie 118a-p)

Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Punto de fusión °C	Rendimiento %	Color	^a Log P
118a	H	OMe	OMe	OMe	H	>300	52	Marrón	2.718
118b	OMe	H	OMe	H	H	>300	52	Marrón	2.971
118c	H	OMe	H	H	H	>300	51	Marrón	3.224
118d	Me	H	Me	H	H	>300	48	Marrón	4.411
118e	Me	H	H	Me	H	>300	49	Marrón	4.411
118f	H	Me	Me	H	H	>300	45	Marrón	4.411
118g	H	Me	H	Me	H	>300	51	Marrón	4.411
118h	H	Me	H	H	H	>300	46	Marrón	3.944
118i	Me	H	H	H	H	>300	45	Marrón	3.944
118k	H	Cl	OMe	H	H	>300	46	Marrón	3.177
118m	Cl	H	H	H	H	>300	37	Negro	3.742
118n	H	H	Cl	H	H	>300	39	Negro	3.742
118o	H	H	Br	H	H	>300	35	Marrón	3.994
118p	H	H	CF ₃	H	H	>300	46	Marrón	3.994

^a Calculado a partir del modulo Project Leader del Programa CaChe 3.0

Las estructuras de los derivados **117a-p** y **118a-p** fueron establecidas de manera inequívoca mediante el análisis de los espectros IR, RMN¹H en una y dos dimensiones, RMN¹³C, experimentos HETCOR, así como algunos espectros de masas y análisis elementales.

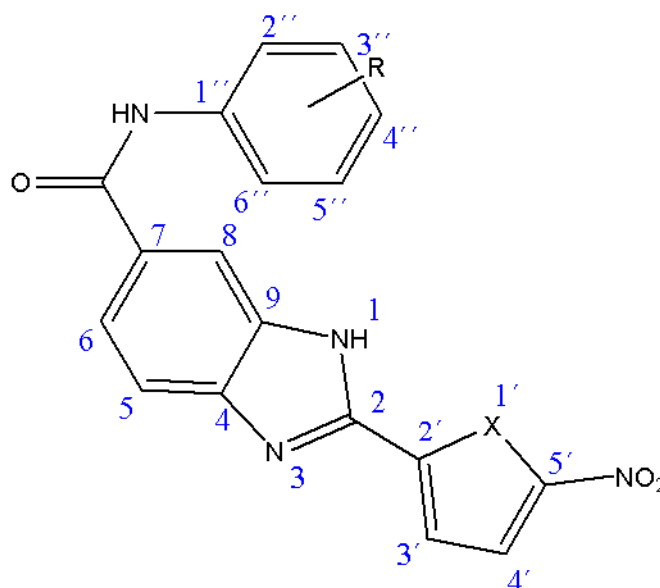


Figura 73. Estructura general y numeración de los derivados **117a-p** (**X=O**) y **118a-p**(**X=S**).

En el análisis de los espectros IR de la series mencionadas, en general, se observan las bandas características del estiramiento C=O de las amidas resultantes en intervalos de 1705-1640cm⁻¹. A 3690-3200cm⁻¹, se observan bandas características del alargamiento N-H atribuidas a la amida y amina. Destacan además las dos bandas características del grupo nitro presentes entre 1535-1510 y 1350-1340 cm⁻¹. Se pueden identificar otras bandas que carecen de importancia práctica.

En los espectros de RMN¹H, se pueden identificar de forma general a campo alto las siguientes señales: Los protones del grupo metoxi que están presentes en algunos derivados, en forma de singlete con desplazamientos

entre 3.78-3.74 ppm, así como las señales de los protones de los grupos metil que están presente en algunos derivados con desplazamientos alrededor de 2.30 ppm.

En la región aromática se evidencian la mayoría de las señales, comenzando con los protones del sistema de la benzamida que presentan desplazamientos entre 7.70-6.40 ppm dependiendo del patrón de sustitución y de los sustituyentes, los derivados **117k-p** y **118l-p** presentan desplazamientos a campo más bajo que las descritas por el efecto apantallante de los sustituyentes como halógenos, grupos nitro, y trifluorometil. La señal del grupo amino secundario se sitúa alrededor de los 8.28 ppm en forma de singlete ancho, quedando inmersa en algunos derivados en forma de multiplete con la señal del protón H-8. La señal del protón de la amidas se desplazan a campo bajo en alrededor de 10.25 ppm, señal característica para todos los derivados en forma de singlete bien definido.

En los espectros de RMN¹³C de las series **117a-p** y **118a-p**, la señal más característica es el desplazamiento a campo alto de la señal del carbono acílico de la amida formada, pasa de un desplazamiento típico de 168 ppm en los ácidos de partida **115a-b** a 165 ppm aproximadamente para todos los derivados sintetizados.

En cuanto a los espectros de masas se identificaron los picos más resaltantes entre ellos el pico correspondiente al fragmento M-1 característicos de las amidas. La perdida de M-45 atribuida a la fragmentación del anillo de cinco miembros, con la pérdida del grupo -NO₂.

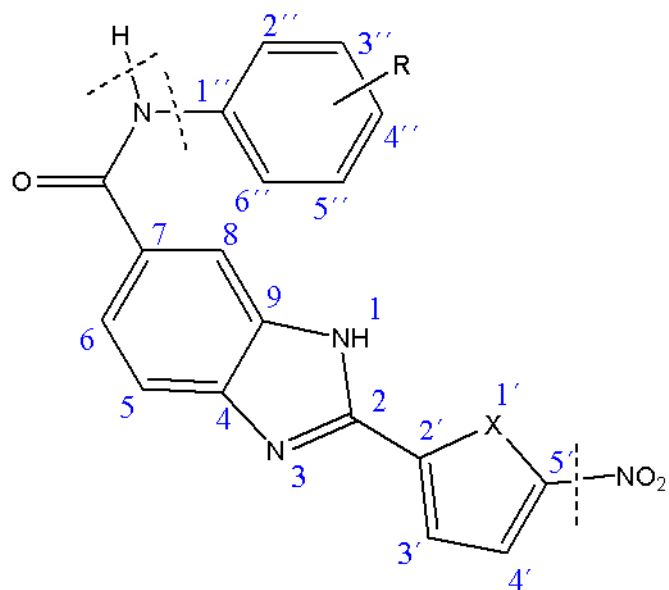
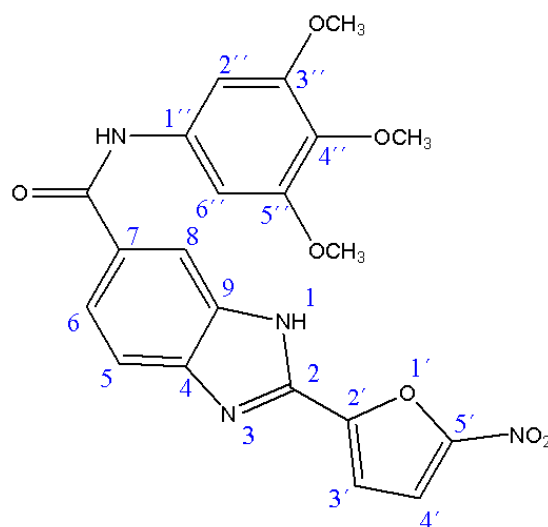


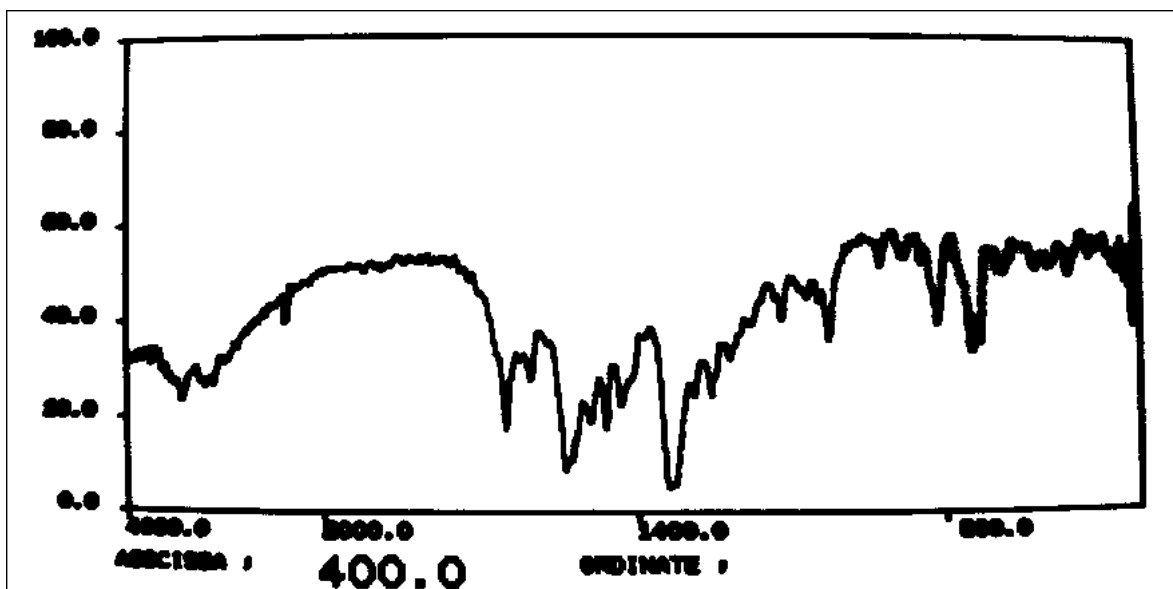
Figura 74. Escisiones principales encontradas en los espectros de masas de los derivados **112**.

Para la discusión espectroscópica de las series se seleccionó el compuesto

N-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-(5-nitrofuran-2-il)-3*H*-benzo[*d*]imidazol-5-carboxamida (**117a**)



En el espectro IR, (espectro 10), tomado con un espectrofotómetro Shimadzu modelo 470, usando pastillas de KBr, destaca la banda aguda atribuida a la vibración C=O del carbono acílico de la amida resultante en 1678 cm^{-1} . A 3500 cm^{-1} banda asignada al estiramiento NH de la amida y amina correspondiente. Destacan además las dos bandas características del grupo nitro presentes entre 1525 y 1350 cm^{-1} .



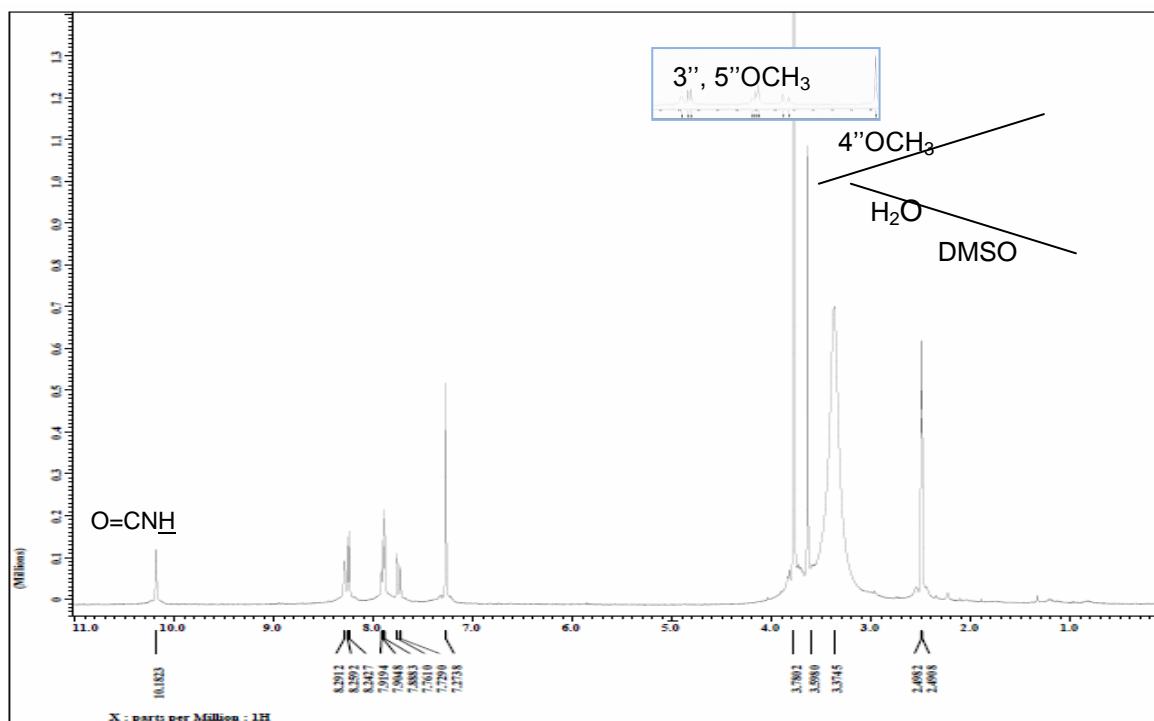
Espectro 10. Espectro IR del compuesto 117a.

En el espectro de RMN^1H , (DMSO- d_6 , 270 MHz) (espectro 11) se identificaron las siguientes señales, comenzando a campo más alto: se observa un singlete en 3.64 ppm que integra para 3 protones y es atribuido al grupo metoxi en posición 4". En 3.78 ppm se observa un singlete que integra para 6 protones que corresponde a los protones de los grupos metoxi en posición 3" y 5".

En 7.27 ppm se observa una señal en forma de singlete que integra para dos protones y es asignado a los protones equivalente H-2" y H-6" de la benzamida correspondiente. A 7.74 ppm se observa una señal en forma de doblete que integra para un protón asignada a H-5 del sistema bencimidazol, con J de acoplamiento de 8.6 Hz, acoplado con el protón H-6 asignado al

multiplete en 7.90 ppm, señal atribuida además al protón H3'. En 8.25 ppm se identifico un doblete asignado al protón H-4' con constante de acoplamiento $J = 4.4\text{Hz}$ desdoblado con el protón H-3'.

En 8.26 ppm se observa un singlete ancho asignado al protón H-8. A campo más bajo en 10.18 ppm se observo un singlete que integra para un protón y es asignado al protón del grupo amido. Los acoplamientos se corroboraron con el experimento COSY. (Espectro 12).



H_{2''}, H_{6''}

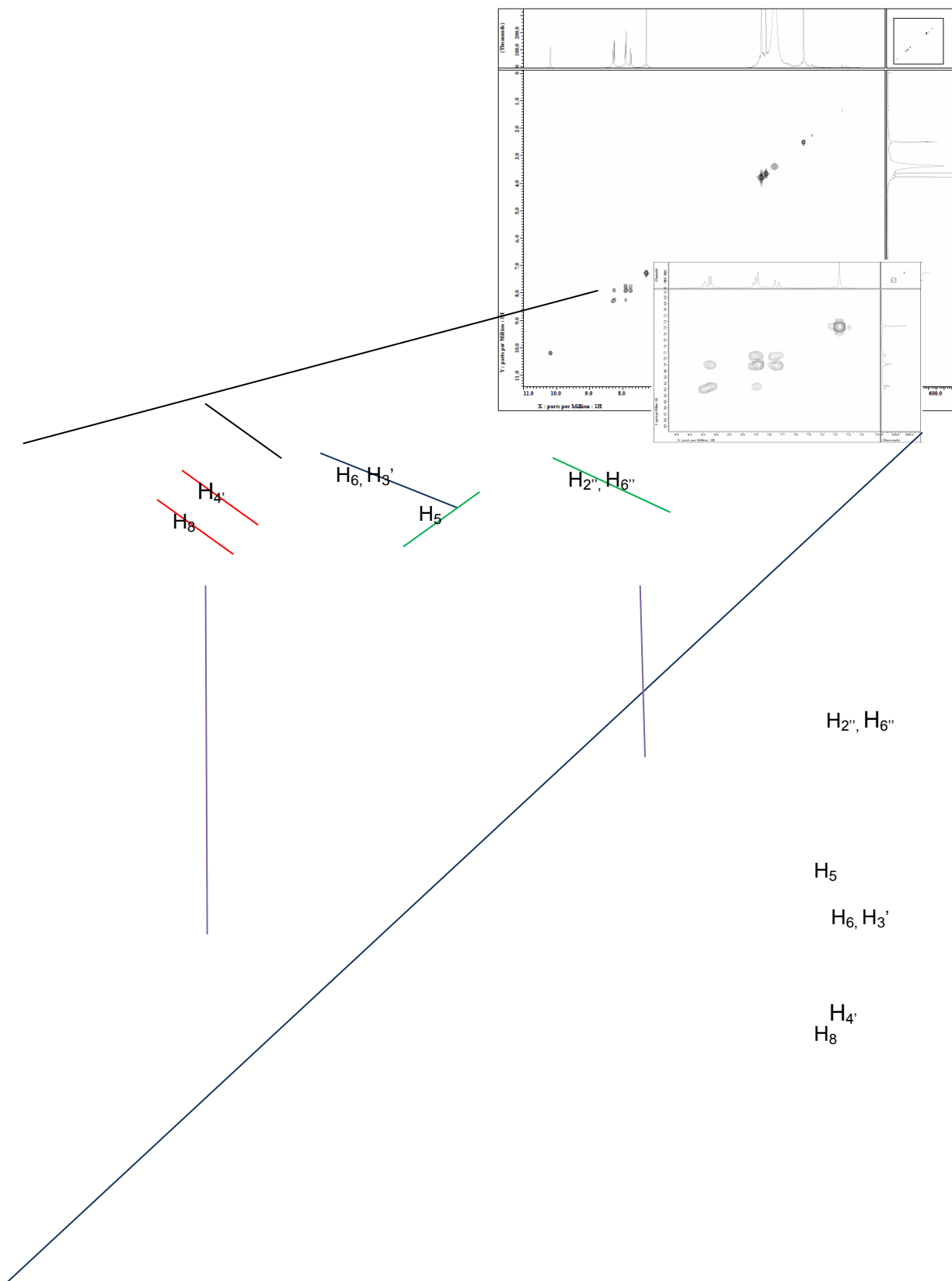
H₆, H_{3'}

H_{4'}

H₈

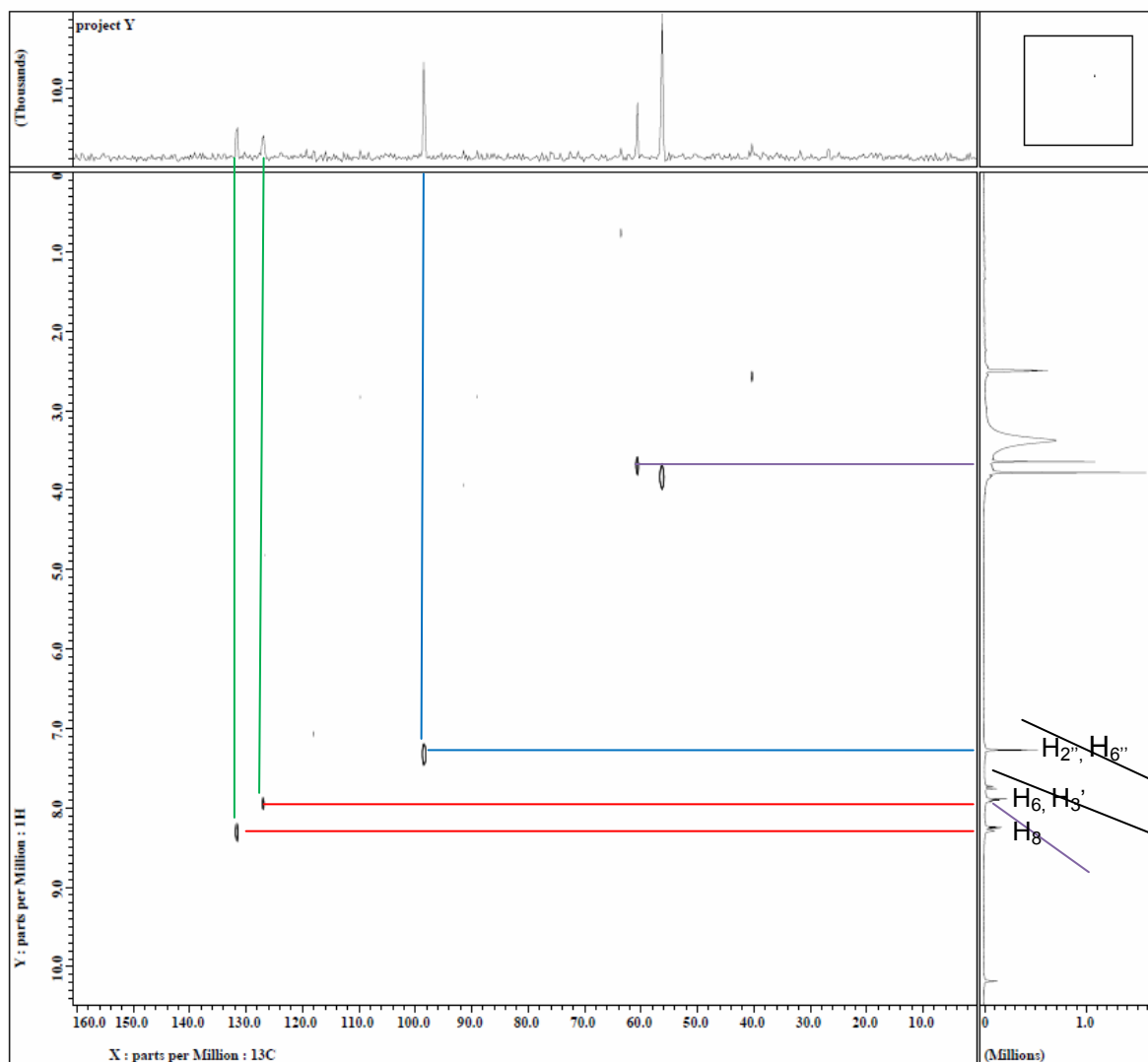
H₅

Espectro 11. Espectro RMN¹H de 117a y su ampliación

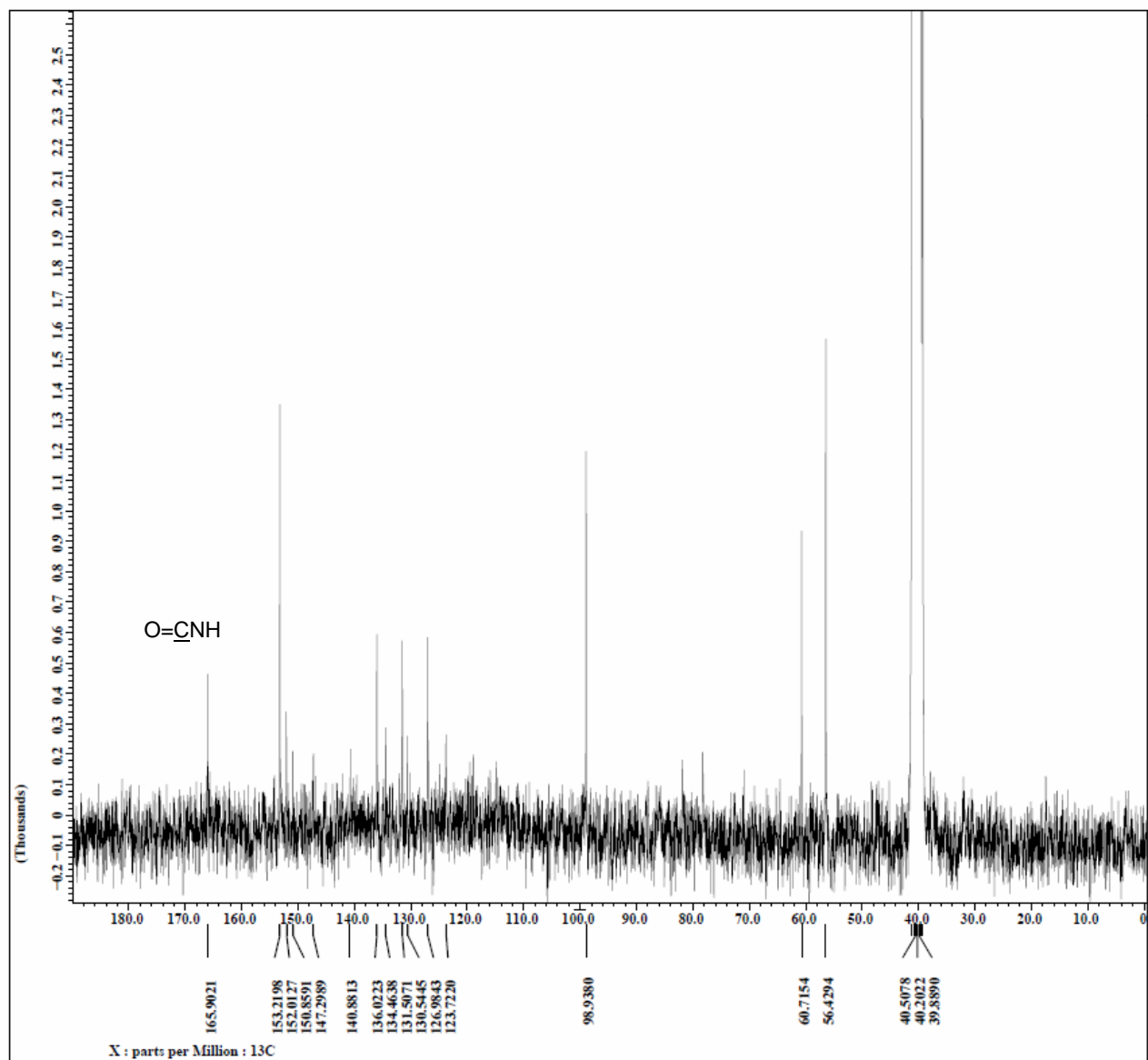


Espectro 12. Espectro COSY de **117a** y su ampliación

Con ayuda del experimento HECTOR (espectro 13), correlación ^{13}C y ^1H se identificaron inequívocamente los siguientes carbonos. La señal en 56 ppm es atribuida a los carbonos de los grupos metoxi en posiciones 3'' y 5''. La señal en 61 ppm atribuida al carbono del grupo metoxi en posición 4''. La señal en 99 ppm se asignó a los carbonos equivalentes C-2'' y C-6''. En 130 ppm se puede observar una señal que se correlaciona con el protón H-6 y es asignado al carbono C6. En 136 ppm se encuentra una señal que se correlaciona con el protón H-8 del anillo de becimidazol (C8). En 166 ppm se observa una señal característica del carbono acílico del grupo amida.



Espectro 13. Espectro HETCOR de 117a



Espectro 13. Espectro RMN¹³C de 117a

V.1.5. Aproximación a la síntesis de análogos del benzotiazol

V.1.5.1 Síntesis de 4-amino-3-mercaptobenzonitrilo (121)

Inicialmente la propuesta sintética involucraba como material de partida el p-aminobenzonitrilo sin embargo, al iniciar el trabajo no se contaba con el mismo, por tal razón se empleo el ácido p-aminobenzoico (PABA) y su éster etílico (benzocaína) para la síntesis. No obstante los rendimientos de estas reacciones fueron bajos comparados con el p-aminobenzonitrilo.

Esquema 4. Aproximación a la síntesis de series 124 y 125.

(i)1.- Etanol, H₂SO₄ (5%); **(ii)**1.- Br₂, Ácido acético glacial, 0°C(30 min), t.a 2.-H₂O, etanol; **(iii)** 1.-KOH (30%), reflujo 2.-Hielo/HCl;**(iii)** 1.- 1,4-benzoquinona, etanol,2.-H₂O, etanol; **(iv)** 1.-EDCI, | ^{123a, 123b} DMAP, anilina correspondiente 2.-Hielo/H₂O 3.-Etanol

Los intermediarios **123a** y **123b**, se obtuvieron con rendimientos del 80 y 82 % respectivamente, coincidiendo con los datos espectroscópicos y físicos reportados por nuestro grupo de investigación.¹³⁸ El paso final en la síntesis propuesta para las series **124** y **125**, que incluían la formación de las amidas como objetivo en esta investigación, no se logró satisfactoriamente, puesto no se obtuvo una separación con un nivel de pureza que permitiera caracterizar de manera inequívoca a cada uno de los derivados propuestos y ensayar biológicamente a los mismos.

V.2. Pruebas biológicas

V.2.1. Evaluación antimalárica

Para determinar el potencial como antimaláricos de los compuestos sintetizados se utilizaron:

Prueba in vitro: Inhibición de la Formación de Hemozoina (IFHz)

Prueba in vivo: Prueba de Peters, para estimar el efecto de los compuestos ensayados sobre la reducción de la parasitemia post-tratamiento y la sobrevivencia de los animales tratados en relación a los controles no tratados.

Nota. Se establece como criterio, que los compuestos con %IFH ≥ 70 %, se incluirán en la evaluación in vivo, mediante la Prueba de Peters.

V.2.1.1. Evaluación de inhibición de la formación de hemozoina serie 112a-n

Los protozoos del género *Plasmodium*, en su fase eritrocítica hidrolizan la fracción proteica de la hemoglobina a través de un conjunto de enzimas proteolíticas (cisteínicas, aspárticas y metaloproteasas), de esta forma consigue los aminoácidos necesarios para la síntesis de sus propias proteínas y a su vez se generan grupos hemo, altamente tóxicos, principalmente sobre los componentes de sus membranas, y otros blancos moleculares. La toxicidad del grupo hemo, es controlada por el parásito mediante el desarrollo de mecanismos que lo transforman en productos de degradación no tóxicos o mediante su biomineralización o cristalización en las condiciones acídicas de su vacuola digestiva bajo una forma inocua e insoluble, denominada hemozoina.¹⁶⁷

La hemozoina presenta características espectrales, en el infrarrojo idénticas a la de la β -hematina y se ha demostrado que es un cristal de unidades de hemo enlazadas a través de puentes Fe-carboxilato entre ión

férrico central de un hemo y el grupo carboxilo del propionato del próximo hemo, formando dímeros que se enlazan unos a otros mediante puentes de hidrógeno dando origen al cristal de la β -hematina.¹⁶⁸ Existen evidencias de que este proceso puede darse espontáneamente bajo las condiciones de acidez imperante en la vacuola digestiva del parásito. Sobre la base de este hecho, se evaluó la actividad de los compuestos sintetizados durante esta investigación, para interferir con este proceso, considerando que aquellos que inhiban la cristalización del hemo, tal como la CQ, podrían ser antimaláricos potenciales.

Como ya se ha mencionado la inhibición de la formación de hemozoína ha sido uno de los blancos claves en el desarrollo de fármacos con actividad antimalárica; por tal razón se evaluó como ensayo preliminar la capacidad de los análogos sintetizados para inhibir la cristalización de la hemozoína. En la tabla X se muestran los resultados obtenidos al evaluar la serie **112a-n**.

Tabla X. Porcentajes de inhibición de la polimerización de hemina *in vitro*

COMPUESTOS	% IFH \pm D.S.
75	72,40 \pm 0,03
112a	85,06 \pm 0,01
112b	2,48 \pm 0,11
112c	39,62 \pm 0,16
112d	47,71 \pm 0,08
112e	23,02 \pm 0,16
112f	38,58 \pm 0,13
112g	49,17 \pm 0,12
112h	92,7 \pm 0,1
112i	12,65 \pm 0,13
112j	85,58 \pm 0,14
112k	94,6 \pm 0,17
112l	87,13 \pm 0,21
112m	12,24 \pm 0,12
112n	33,6 \pm 0,2
Control CQ	98,52 \pm 0,01

Los valores representan la media \pm DS . Cada muestra se ensayó por triplicado.

Como puede apreciarse cinco compuestos **112a**, **112h**, **112j**, **112k** y **112l** lograron aumentar la inhibición de la formación de la hemozoína entre un 17 y 30% en relación al compuesto hit **75**. De estos resultados se puede proponer un estudio relación estructura química propiedad preliminar, en la cual sustituyentes metoxilados sobre las posiciones 2 y 3 del anillo aromático potencia la actividad, mientras que sustituciones en las posiciones 3 disminuyen la misma.

V.2.1.2. Test supresivo de Peters serie 112a-n

Esta prueba se fundamenta en la determinación del potencial como antimalárico de un compuesto en base a su capacidad para reducir la parasitemia al cuarto día post-infección de los ratones en paralelo con la extensión de su sobrevivencia en relación al grupo control infectado y no tratado. Los compuestos de la serie que presentaron capacidad de inhibir la formación de β -hematina/hemozoína con valores superiores al 70% en pruebas *in vitro*, como son **112a**, **112h**, **112j**, **112k** y **112l**, se les realizó el Test supresivo de Peters usando un modelo murino de *Plasmodium berghei*.

En la Tabla XI y en el gráfico 7, se muestran las modificaciones del porcentaje de parasitemia al cuarto día post-infección y de supervivencia de ratones de los diferentes tratamientos, respecto al grupo control, al cual, para efectos de cálculo se le asigna, el valor 100%.

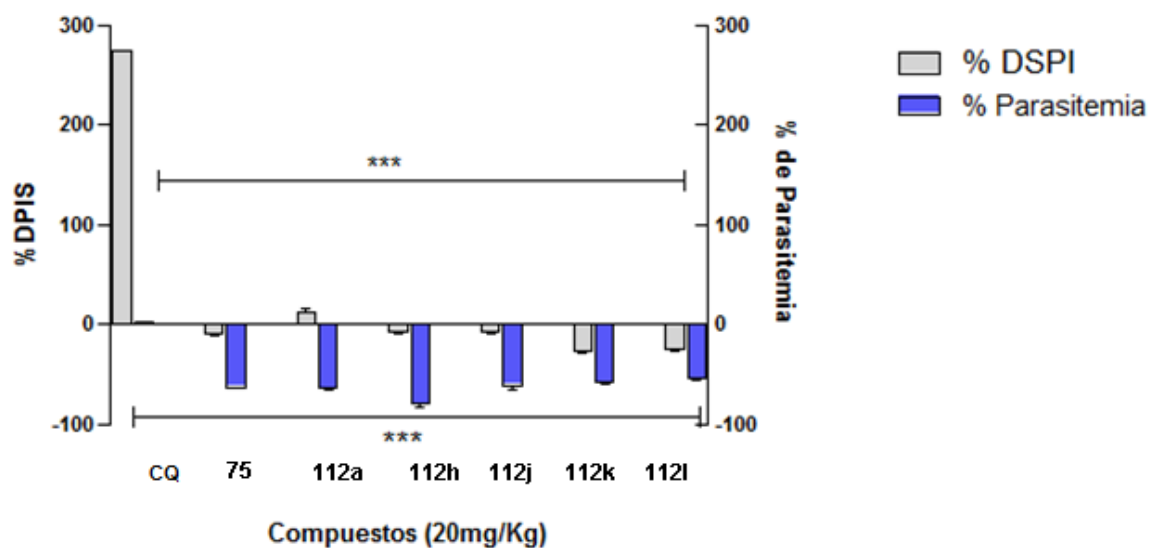
En la Tabla XI, se muestran los resultados obtenidos después del tratamiento de los ratones con 1 dosis de 20 mg/kg de los compuestos seleccionados, en relación con los días de sobrevivencia de los animales y los valores de parasitemia observados el día 4 post-infección, así como los obtenidos para los controles sin tratamiento y con tratamiento con CQ. Con estos datos y tomando los valores observados en los controles sin tratamiento como 100% para ambos parámetros (DSPI y %P), se graficó el porcentaje de aumento de los días de sobrevivencia post-infección y el porcentaje de disminución de la parasitemia (Gráfico 7).

Tabla XI. Modificaciones del porcentaje de parasitemia y días de supervivencia post infección de ratones infectados con *Plasmodium berghei*, tratados con la serie 112, a una dosis de 20mg/Kg.

<i>Tratamientos (20mg/Kg)</i>	<i>Días de supervivencia ± S.D</i>	<i>% Parasitemia± S.D</i>
Control infectado	8,0 ± 1,58	58,80 ± 1,92
CQ	29,89 ± 0,20	1,0 ± 0,70
75	7,20 ± 1,30	21,80± 1,48
112a	9,0 ± 3,80	21,0 ± 1,58
112h	7,40 ± 1,67	15,0 ± 4,74
112j	7,42 ± 1,14	23,0 ± 5,43
112k	5,83 ± 2,48	25,0 ± 2,82
112l	6,0 ± 1,41	27,40 ± 2,70

Los resultados obtenidos en el ensayo de Peters se muestran en la tabla XI. Se observa que los compuestos son capaces de reducir la parasitemia al cuarto día post infección, pero no tan eficientemente como lo hizo el control positivo CQ. El compuesto **112h**, redujo, de una manera estadísticamente significativa la parasitemia ($p < 0,001$).

Ninguno de los compuestos ensayados fue capaz de aumentar la sobrevivencia de los ratones infectados y tratados en relación a los controles no tratados, lo que da cabida a la interpretación de que la dosis ensayada podría ser tóxica. Sin embargo, tomando en consideración que estos compuestos resultaron ser efectivos en el ensayo de inhibición de hemozoína y redujeron la parasitemia en forma estadísticamente significativa en relación a los controles infectados no tratados, se ensayo una concentración más baja de los compuestos.



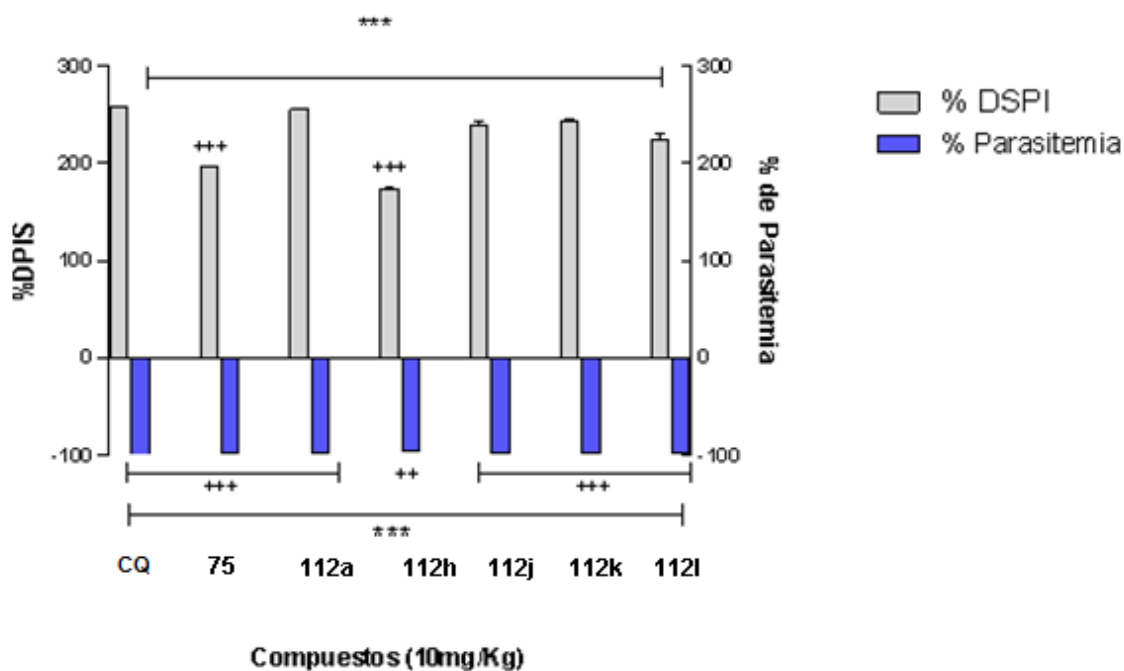
El valor cero (0,0), representa el control. Las barras representan la media \pm S.D. *** $p < 0,001$, comparado con el control infectado; *** $p < 0,001$ con respecto al control positivo CQ y ** $p < 0,05$ comparado con CQ.

Grafico 6. Modificaciones de la parasitemia (%) al cuarto día post-infección y de los días de supervivencia post-infección (DSPI) de ratones tratados con los diferentes compuestos a 20mg/kg

Tomando en consideración esta hipótesis, se procedió a realizar una segunda Prueba de *Peters*, pero, disminuyendo la concentración de los compuestos a 10mg/kg de peso, obteniendo los resultados que se presentan en la (Tabla XII) y el gráfico 8.

Tabla XII. Modificaciones del porcentaje de parasitemia y días de supervivencia post infección de ratones infectados con *Plasmodium berghei*, tratados con la serie 112, a una dosis de 10mg/Kg.

<i>Tratamientos (10mg/kg)</i>	<i>Días de supervivencia ± S.D</i>	<i>% Parasitemia± S.D</i>
Control infectado	8,40 ± 0,15	65,80 ± 4,38
CQ	29,98 ± 0,30	0,80 ± 0,08
75	24,80 ± 1,43	1,40 ± 0,14
112a	29,83 ± 0,40	1,00 ± 0,12
112h	23,00 ± 2,12	2,60 ± 0,67
112j	28,50 ± 3,20	1,40 ± 0,14
112k	28,83 ± 2,40	1,20 ± 0,83
112l	27,16 ± 6,46	1,50 ± 0,15



El valor cero (0,0), representa el control. Las barras representan la media ± S.D. *** p<0,001, comparado con el control infectado; *** p<0,001 con respecto al control positivo CQ y **p<0,05 comparado con CQ.

Grafico 7. Modificaciones de la parasitemia (%) al cuarto día post-infección y de los días de supervivencia post-infección (DSPI) de ratones tratado con los diferentes compuestos a 10mg/kg.

Los valores de la reducción de la parasitemia, como consecuencia del tratamiento de los ratones infectados con los compuestos ensayados, son estadísticamente significativos y comparables a la CQ. El máximo valor se alcanzó cuando los ratones infectados fueron tratados con el compuesto **112a**, donde el porcentaje de parasitemia y días de sobrevida son similares a los de la CQ.

Comparando la serie de compuestos **112**, con el compuesto “*hit*” **75**, a partir del cual se realizó la farmacomodulación, se puede observar que todos los compuestos aumentaron los días de supervivencia de los ratones post infección entre un 67 y 79%. Además, lograron reducir la parasitemia en relación al control infectado entre un 96 y 99 % con valores comparables a la cloroquina (CQ).

De manera general, se puede afirmar que todos los compuestos, especialmente el **112c** (% parasitemia $1,00 \pm 0,12$), redujeron la parasitemia y aumentaron la sobrevida de los ratones infectados con *Plasmodium berghei*. Estos efectos se correlacionan con la capacidad de estos derivados, para inhibir la polimerización de la hemina *in vitro*, sugiriendo que su efecto antimalárico *in vivo*, podría estar relacionado con este mecanismo.

V.2.1.3. Evaluación de inhibición de la formación de hemozoína series 117 y 118.

Tabla XIII. Porcentajes de inhibición en la formación de hemozoína serie 117 y 118

COMPUESTOS	% IFH	±S.D.	COMPUESTOS	% IFH	±S.D.
*115a	76,45	0,03	*115b	75,41	0,003
117a	10,38	0,161	118a	12,03	0,037
*117b	84,24	0,027	118b	20,43	0,127
117c	57,4	0,128	118c	60,6	0,079
*117d	86,49	0,044	*118d	74,8	0,04
117e	36,45	0,088	*118e	74,63	0,04
*117f	85,62	0,066	118f	65,54	0,044
117g	35,15	0,04	*118g	82,51	0,001
117h	39,22	0,027	118h	39,04	0,015
*117i	84,15	0,053	*118i	74,19	0,116
117j	17,4	0,591	118k	20,43	0,062
117k	67,27	0,105	118m	62,62	0,058
*117l	87,53	0,001	*118n	95,58	0,081
117m	1,99	0,009	118o	21,07	0,178
*117n	88,74	0,008	118r	12,82	0,286
*117o	76,96	0,005			
117p	5,19	0,08	Control CQ	98,52	0,01

*Compuestos candidatos a ensayos *in vivo*, de acuerdo a los criterios empleados en esta investigación %IFH ≥ 70.

En base al criterio antes descrito, diecisiete (17) de los compuestos sintetizados resultaron candidatos a evaluar en el test de Peters (modelo *in vivo*), incluyendo los ácidos **115a-b**. Sin embargo, debido a la poca

disponibilidad de ratones cepa INH, solo se evaluaron 6 compuestos en modelo murino.

Los 10 compuestos más activos y seleccionados para el Test de Peters se listan a continuación.

Tabla XIV. Compuestos candidatos a ensayos *in vivo*-test de Peters

Compuestos/Patrón sustitución	R₂''	R₃''	R₄''	R₅''	R₆''	%IFH	±S.D
118n	H	H	Cl	H	H	95,58	0,08
117n	H	H	Cl	H	H	88,74	0,01
117l	OMe	H	H	Cl	H	87,53	0,01
117d	Me	H	Me	H	H	86,49	0,04
117f	H	Me	Me	H	H	85,62	0,07
117b	OMe	H	OMe	H	H	84,24	0,03
117i	H	H	Me	H	H	84,15	0,05
118g	H	Me	H	Me	H	82,51	0,01

*Compuestos seleccionados para el ensayo *in vivo* (Test de Peters).

Como se puede observar el compuesto **118g** fue el octavo más potente, sin embargo se decidió ensayarlo a pesar de tener menor porcentaje de inhibición de la formación de hemozoína en comparación con los compuestos **117b** y **117i** para aumentar el número de compuestos de la serie nitrotienil (**118**). De manera general los análogos que contenían oxígeno fueron más potentes que los isómeros de azufre. Excepto el compuesto **118n** el cual resulto ser el compuesto más activo de toda la serie.

V.2.1.4. Test Supresivo de Peters series 117 y 118.

Los resultados del test de Peters de los compuestos seleccionados se presentan en la tabla XV.

Tabla XV. Modificaciones del porcentaje de parasitemia y días de supervivencia post infección de ratones infectados con *Plasmodium berghei*, tratados con la serie 117 y 118, a una dosis de 10mg/Kg.

Tratamientos (10mg/kg)	Días de supervivencia ± S.D	% Parasitemia ± S.D
Control Infectado (CI)	8,20 ± 0,20	61,33 ± 1,40
Cloroquina (CQ)	29,20 ± 0,80	0,80 ± 0,037
117d	20,20 ± 1,95	3,05 ± 0,09
117f	8,80 ± 1,53	49,66 ± 1,76
117l	9,40 ± 0,92	69,67 ± 1,87
117n	10,00 ± 1,14	63,00 ± 1,32
118g	8,80 ± 0,14	52,00 ± 0,36
118n	10,20 ± 1,98	44,66 ± 0,69

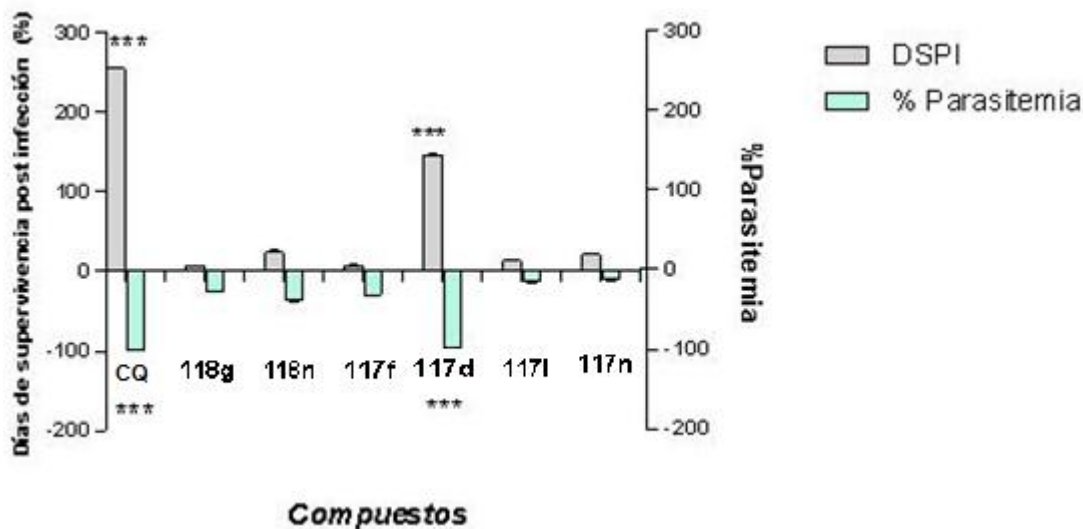


Grafico 8. Modificaciones de la parasitemia (%) al cuarto día post-infección y de los días de supervivencia post-infección (DSPi) de ratones tratados con los diferentes compuestos.

Valor (0,0) representa el control infectado, que corresponde el 100%

Las barras representan la media \pm E.E.M., *** p <0,001, comparado con el control infectado.

El compuesto que presento el mejor comportamiento tanto en el porcentaje de inhibición de parasitemia (**3,05 \pm 0,09**), como en un mayor número de días de supervivencia post-infección (**20,20 \pm 1,95**) fue el compuesto **117d**, comparado con el control positivo (CQ), los 6 compuestos restantes no lograron mejorar las variables antes mencionadas, y los resultados observados son cercanos al grupo que no recibió tratamiento (control negativo).

Es recomendable realizar un mayor número de ensayos *in vivo* incluyendo los derivados restantes que según el protocolo establecido mostraron un porcentaje de inhibición en la formación de hemozoína superior al setenta por ciento (IFH>70%), considerando que el enfoque discriminante de la actividad antimalárica en esta investigación está orientada hacia posibles mecanismos relacionados con la inhibición de la formación del pigmento antimalárico o hemozoína. Esto con el fin de obtener un mayor número de resultados, que permitan establecer una relación estructura química actividad.

Es importante señalar que el modelo empleado en el *test de Peters*, se realiza infectando ratones con cepas sensibles a la cloroquina, por lo que no se descarta la posibilidad de que los compuestos sintetizados puedan presentar actividad frente a cepas resistentes. Para estudios posteriores sería importante realizar análisis histológico a los ratones para evaluar posibles daños a tejidos, además de ensayos sobre un modelo de malaria humana como los cultivos *in vitro* sobre cepas de *Plasmodium falciparum* que a pesar de que no reproduzca los factores ADME (administración, distribución, metabolismo y eliminación), así como factores inmunológicos, es importante para dar continuidad a esta investigación a fin de encontrar un compuesto líder.

V.2.2. Evaluación citotóxica antitumoral

El ensayo del MTT Bromuro de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazolio] está basado sobre la habilidad de una enzima deshidrogenasa mitocondrial de las células viables para clivar los anillos de tetrazolio del MTT de color amarillo pálido y formar cristales de formazan azul oscuro los cuales son en su mayor parte impermeables a las membranas celulares, resultado así en su acumulación dentro de las células viables. El color puede ser entonces cuantificado al disolver los cristales de formazan con DMSO, usando un lector de microplacas.¹⁴⁷

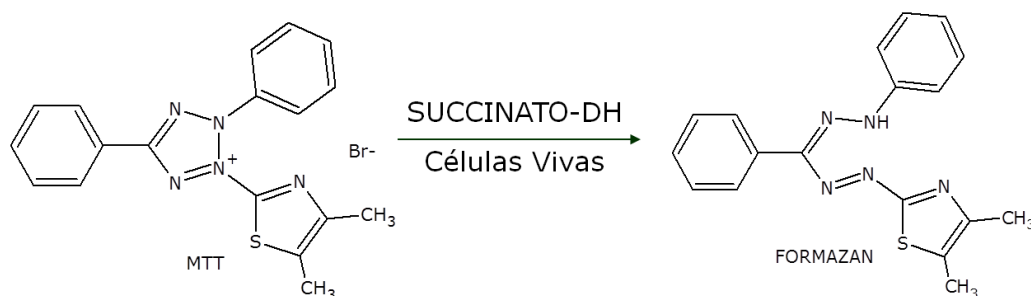


Figura 75. Formación del formazan, ensayo del MTT.

Los cultivos celulares han resultado ser la manera más apropiada y ampliamente utilizada para evaluar la capacidad antiproliferativa y/o citotóxica de los compuestos, los cuales pueden ser indicadores de actividad carcinogénica y mutagénica.¹⁴⁸ La determinación del efecto de los derivados sintetizados sobre la viabilidad y proliferación celular se realizó en dos líneas celulares neoplásicas humanas y en linfocitos humanos normales obtenidos de sangre periférica y sobre el proceso de apoptosis en las dos líneas celulares neoplásicas.

La línea celular Jurkat clon E6.1 (Leucemia linfocítica humana) fue establecida de la sangre periférica de un adolescente de 14 años de edad con leucemia aguda de células T en la primera fase de recaída en el año 1976. La

línea celular HL60 (leucemia humana promielocítica) se derivó de una mujer de 36 años con leucemia promielocítica aguda en el Instituto nacional del cáncer.

La evaluación de la viabilidad celular por el método del MTT de los derivados **112** se pudo lograr sólo con los compuestos **112a**, **112b**, **112c**, **112i** y **112m** ya que el resto de la serie precipitó en el medio de disolución. Los compuestos evaluados ejercieron una significativa actividad antiproliferativa sobre las líneas celulares Jurkat E6.1 y HL-60 la cual fue comparable a la obtenida para los compuestos antineoplásicos de referencia, doxorubicina, el As_2O_3 y la cloroquina (CQ) (tablas XVI, XVII).

Tabla XVI. Efectos de los derivados 112a-n sobre la proliferación de las células leucémica HL60

Compuesto	CI ₅₀	
	24h	48h
112a	2,08	1,61
112b	4,24	3,87
112c	6,26	5,19
112d	10,71	8,27
112f	13	11,35
112g	7,64	7,25
112h	37,18	38,25
112i	5,29	4,38
112j	19,04	15,4
112k	44,49	50,37
112l	25,54	20,19
112m	9,09	8,75
112n	30,24	28,2
Cloroquina	> 100 (40,48%)	87,08
Doxorubicina	1,6	0,072 (72,17nM)
As₂O₃	4,97	3,23

Los compuestos **112a**, **112b**, **112c**, **112d** y **112i** presentaron una actividad antiproliferativa comparables al trióxido de arsénico, el resto de la serie presento potencia moderada. El compuesto **112e** no se evaluó por inconvenientes en la solubilidad. El compuesto **112a** presento la menor concentración inhibitoria, mostrando una mayor potencia a las 48 h. Los resultados preliminares sobre células leucémicas HL60 sugieren que el efecto aditivo de los grupos metoxi es importante para aumentar la potencia, sin embargo no se descarta la posibilidad de que la función éster con el patrón de sustitución descrito, pueda estar actuando como grupo transportador, permitiendo liberar más cantidad del fenol **75**, estructura a partir de la cual se inicio la farmacomodulación.

Tabla XVII. Efectos de los derivados 112a-n sobre la proliferación de las células leucémica Jurkat E6.1.

Compuesto	CI ₅₀	
	24h	48h
112a	2,41	1,57
112b	4,57	3,19
112c	9,65	6,47
112d	15,61	13,56
112f	25,78	26,9
112g	10,17	9,68
112h	37,45	30,58
112i	8,29	6,79
112j	28,85	25,59
112k	44,65	39,85
112l	33,25	29,72
112m	11,02	10,25
112n	35,74	31,5
Cloroquina	83,64	67,92
Doxorubicina	1,03	0,64 (639,6nM)
As₂O₃	7,32	6,45

En cuanto a la actividad antiproliferativa sobre la línea celular leucémica Jurkat E6.1 los compuestos ensayados mostraron una menor potencia, sin embargo presentan la misma tendencia en cuanto al comportamiento que se aprecia en el caso de las células HL60. (Tabla XVII).

La evaluación de la viabilidad celular por el método del MTT, mostró que algunos de los compuestos bencimidazol de las series **117 y 118**, ejercieron una moderada actividad antiproliferativa sobre las líneas celulares Jurkat E6.1 y HL-60 cuando se compara a la obtenida para los compuestos antineoplásicos de referencia, doxorubicina, el As_2O_3 y la cloroquina (CQ) (tablas XVIII, XIX, XX, XXI). A excepción del compuesto **117a** que resultó ser el más activo de la serie con una CI_{50} de $2,95\mu M$ a las 24h de tratamiento, siendo tan activo como la doxorubicina (CI_{50} de $2,48\mu M$), dos veces más activo que el As_2O_3 (CI_{50} de $6,04\mu M$), y 30 veces más activo que la CQ (CI_{50} de $94,63\mu M$) (tablas XVI, XVII).

Por otra parte, el resto de los derivados mostraron una actividad que podemos catalogar como débil ($CI_{50} > 10 \mu M$ y $< 100 \mu M$) (XVIII, XIX), mientras que los derivados **115a-b; 117b; 117d-e; 117i-j; 117n; 118b; 118d-e; 118i-j y 118n** resultaron inactivos después de 24 y 48h de tratamiento ($CI_{50} > 100 \mu M$) (tablas XVI, XVII).

En lo que respecta a las células Jurkat E6.1, sólo el compuesto **117a** exhibió una actividad inhibitoria de la proliferación celular con una CI_{50} de $7,05$ y $7,31\mu M$ comparable al As_2O_3 , después de 24 y 48h de tratamiento, respectivamente (tablas XXVIII, XIX). El derivado **117a** con una CI_{50} de $7,05\mu M$ a las 24h de tratamiento, fue tan activo como el As_2O_3 (CI_{50} de $8,86\mu M$). El resto de los derivados se pueden considerar como débiles.

Adicional al efecto sobre la viabilidad celular evaluado en las líneas celulares de leucemia humana HL60 y Jurkat E6.1, fue determinada la viabilidad celular en cultivo primario de linfocitos humanos totales para determinar el efecto de los derivados más activos de bencimidazol sobre células normales. Como puede ser observado en la tabla XXII, los compuestos **117a; 117c; 117k;**

117p; 118a; 118c; 118k; 118n-p, fueron más activos inhibiendo la viabilidad celular de las células de cáncer humano que las células normales (tabla XXII). Los cocientes de selectividad obtenidos al dividir la concentración inhibitoria media (CI_{50}) en los linfocitos humanos entre las células de leucemia linfocítica humana, HL60 mostraron una mayor selectividad para los derivados evaluados, que para los compuestos de referencia, doxorubicina; cloroquina y As_2O_3 (tabla XXII), con valores de índice de selectividad (IS) >3. Destacan en este grupo los análogos **117a, 117p, 118a y 118p** con IS de 18,7; 13,5; 9,7 y 18,4 respectivamente, valores que le confieren un gran interés como candidatos para continuar con estudios posteriores más específicos.

Los resultados obtenidos sobre la viabilidad celular de los derivados 2-(5-nitrotiofen-2-il)-*N*-fenil-3*H*-benzo[*d*]imidazol-6-carboxamidas **117 y 118**, en las líneas celulares Jurkat E6.1 y HL-60, mostraron que los compuestos de la serie **117**, especialmente **117a, 117c y 117h** (CI_{50} de 2,95; 7,35 y 8,59 μ M), exhibieron una mayor actividad inhibitoria del crecimiento de las células HL60, que los compuestos **118**, indicando que el isómero ($X=O$), proporciona mayor actividad biológica que el patrón ($X=S$). Adicionalmente, en la serie más activa, la presencia de grupos metoxi aumentó significativamente la actividad antiproliferativa, como puede ser observado de la actividad de los derivados metoxilados **117a-c; 117j-k** vs los derivados con sustituyente metil **117d-h y 117k**.

Tabla XVIII. Efectos de los derivados 117a-p sobre la proliferación de las células leucémica HL60

Compuesto	CI ₅₀ (μM)	
	24h	48h
115a	> 100	> 100
117a	2,95	6,15
117b	20,82	41,29
117c	7,35	20,13
117d	> 100	> 100
117e	26,74	50,37
117f	75,11	> 100
117g	> 100	> 100
117h	8,59	17,17
117i	> 100	> 100
117j	16,87	64,38
117k	11,15	14,43
117m	> 100	> 100
117n	> 100	> 100
117o	> 100	> 100
117p	4,29	29,88
Cloroquina	> 100 (40,48%)	87,08
Doxorubicina	1,60	0,072 (72,17nM)
As₂O₃	4,97	3,23

Tabla XIX. Efectos de los derivados 118a-p sobre la proliferación de las células leucémica HL60

Compuesto	CI ₅₀ (µM)	
	24h	48h
115b	> 100	> 100
118a	6,64	6,76
118b	> 100	> 100
118c	18,05	28,53
118d	> 100	> 100
118e	> 100	> 100
118f	38,99	> 100
118g	28,39	> 100
118h	33,16	66,53
118i	> 100	> 100
118k	9,38	14,25
118m	> 100	> 100
118n	7,5	17,75
118o	18,5	32,29
118p	3,68	8,05
Cloroquina	> 100 (40,48%)	87,08
Doxorubicina	1,60	0,072 (72,17nM)
As₂O₃	4,97	3,23

Tabla XX. Efectos de los derivados 117a-p sobre la proliferación de las células leucémica Jurkat E6.1.

Compuesto	CI ₅₀ (μM)	
	24h	48h
115a	> 100	> 100
117a	7,05	7,31
117b	46,26	30,01
117c	12,11	23,58
117d	> 100	> 100
117e	41,53	51,51
117f	> 100	> 100
117g	> 100	> 100
117h	20,78	24,01
117i	> 100	> 100
117j	50,93	25,34
117k	26,39	12,07
117m	> 100	> 100
117n	> 100	> 100
117o	> 100	> 100
117p	10,79	16,11
Cloroquina	83,64	67,92
Doxorubicina	1,03	0,64 (639,6nM)
As₂O₃	7,32	6,45

Tabla XXI. Efectos de los derivados 118a-s sobre la proliferación de las células leucémicas Jurkat E6.1.

Compuesto	CI ₅₀ (μM)	
	24h	48h
115b	> 100	> 100
118a	11,88	12,61
118b	> 100	> 100
118c	44	46,67
118d	> 100	> 100
118e	> 100	> 100
118f	81,32	85,56
118g	53,97	> 100
118h	67,49	79,85
118i	> 100	> 100
118k	21,86	29,1
118m	> 100	> 100
118n	12,08	21,02
118o	23,6	33,86
118p	12,12	18,84
Cloroquina	83,64	67,92
Doxorubicina	1,03	0,64 (639,6nM)
As ₂ O ₃	7,32	6,45

Tabla XXII. Concentraciones inhibitorias medias e índices de selectividad de los derivados de 2-(5-nitrotiofen/furan-2-il)-*N*-fenil-3*H*-benzo[*d*]imidazol-6-carboxamidas más activos en los linfocitos humanos normales obtenidos de sangre periférica y las células de leucemia linfocítica humana Jurkat E6.1, después de 24h de tratamiento

Compuesto	CI ₅₀ (μM)			IS	IS
	HL60	Jurkat E6.1	Linfocitos Humanos Normales	CI ₅₀ Linfocitos normales/ CI ₅₀ HL60 (24h)	CI ₅₀ Linfocitos normales/ CI ₅₀ Jurkat E6.1 (24h)
117a	2,95	7,05	55,29	18,7	7,8
117c	7,35	12,11	83,55	11,4	6,9
117k	11,15	26,39	79,34	7,1	3,0
117p	4,29	10,79	57,99	13,5	5,4
118a	6,64	11,88	64,18	9,7	5,4
118c	18,05	44,00	>100	5,5	>2,3
118k	9,38	21,86	>100	>10,7	>4,6
118n	7,50	12,08	75,01	10,0	6,2
118o	18,5	23,60	87,16	4,7	3,7
118p	3,68	12,12	67,78	18,4	5,6
Cloroquina	>100	83,64	>100	>1,0	> 1,2
Doxorubicina	1,6	1,03	4,36	2,7	4,2
As₂O₃	4,97	7,32	15,27	3,1	2,1

En cuanto al ensayo de doble tinción con Anexina V-FITC/IP, para los derivados seleccionados de las series **117** y **118**, se muestran los gráficos de densidad de puntos obtenidos en las líneas celulares HL60 y Jurkat E6.1 (gráficos 9, 10, 11 y 12).

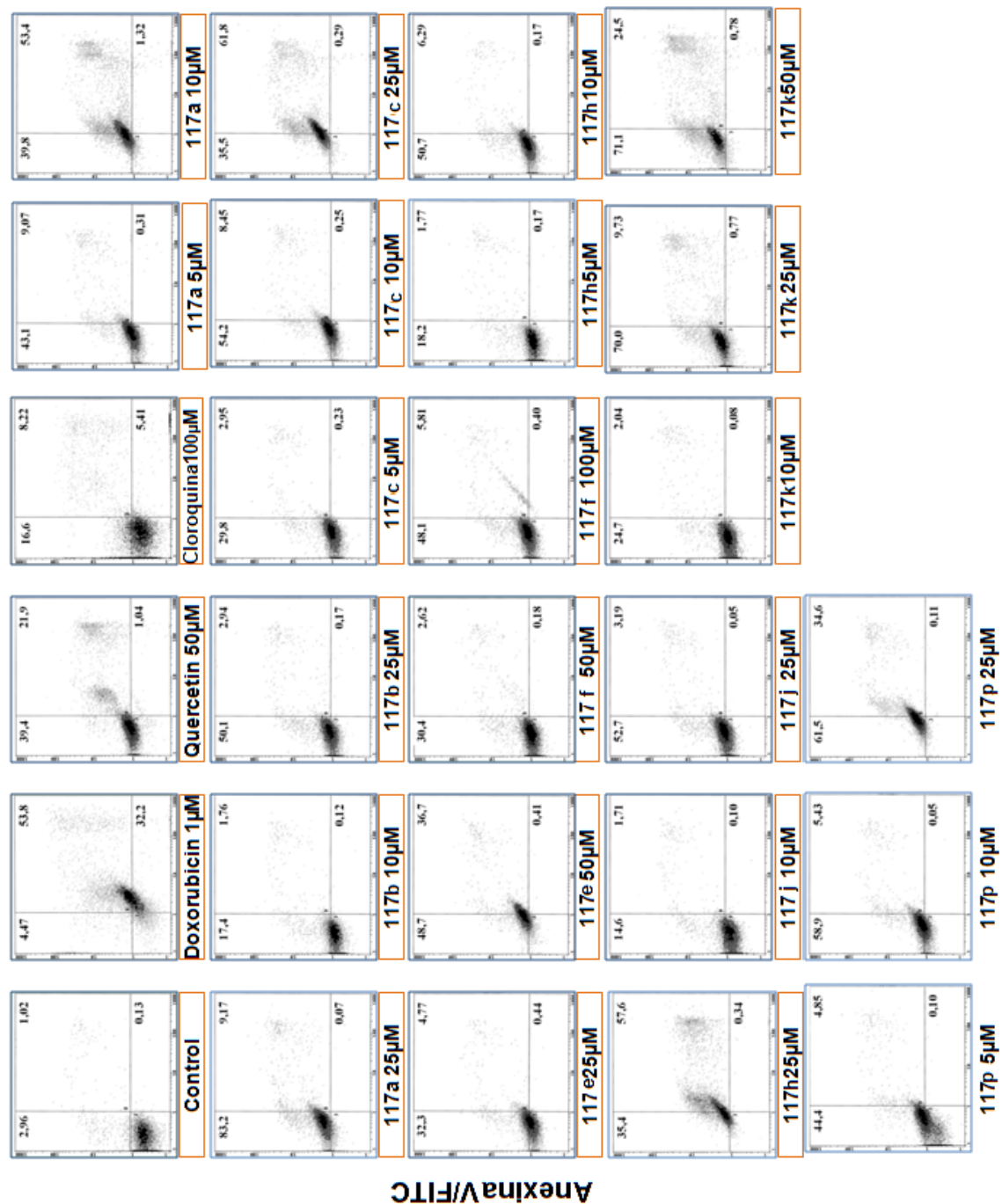


Grafico 9. Gráficos de densidad de punto de las células apoptóticas después del tratamiento por 24 h de las células leucémicas HL60 con los derivados seleccionados de la serie 117. Marcadas con Anexina V-FITC e IP y analizadas por citometría de flujo. (Los datos son expresados como el porcentaje de las células positivas para la anexina V-FITC).

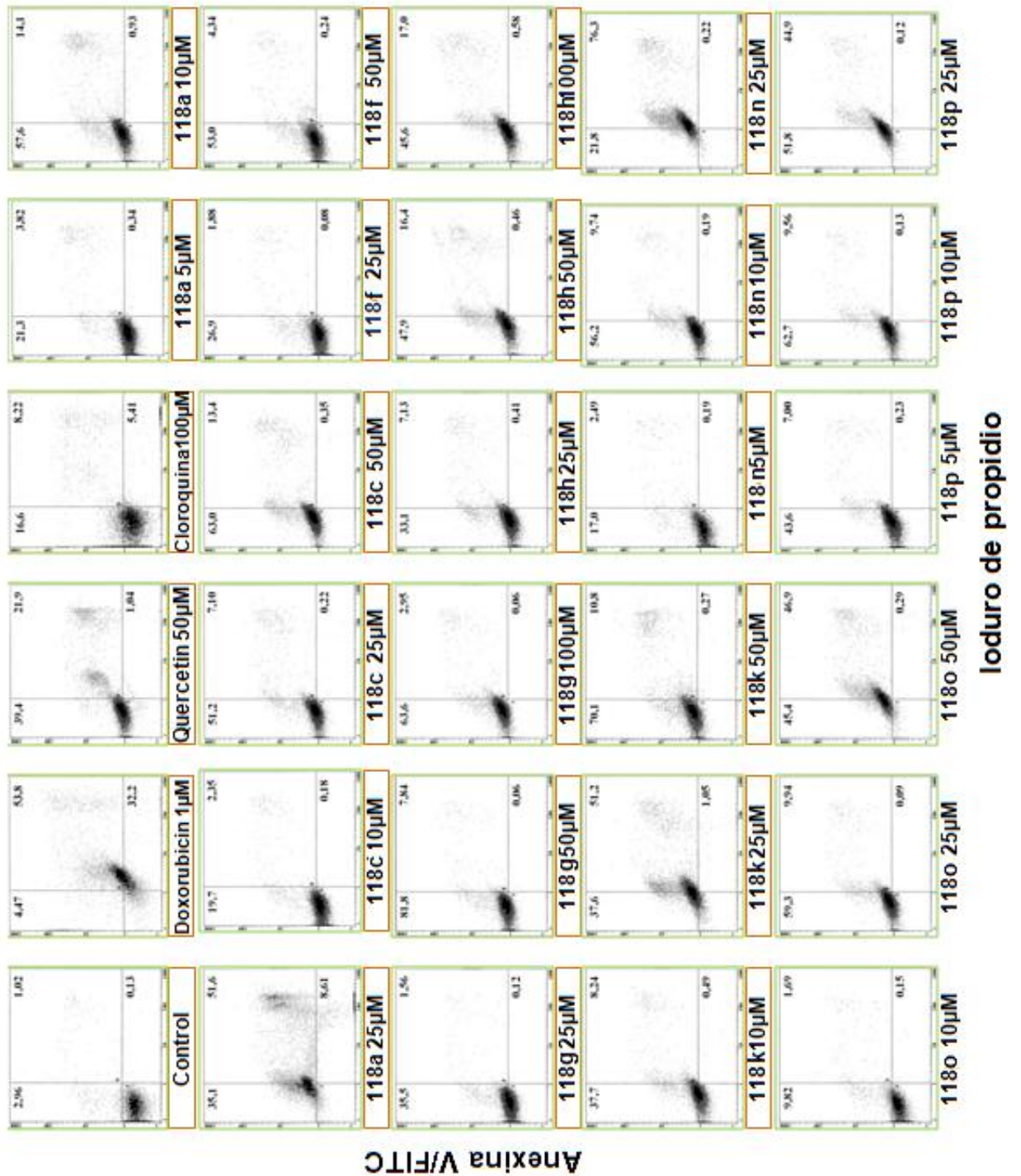
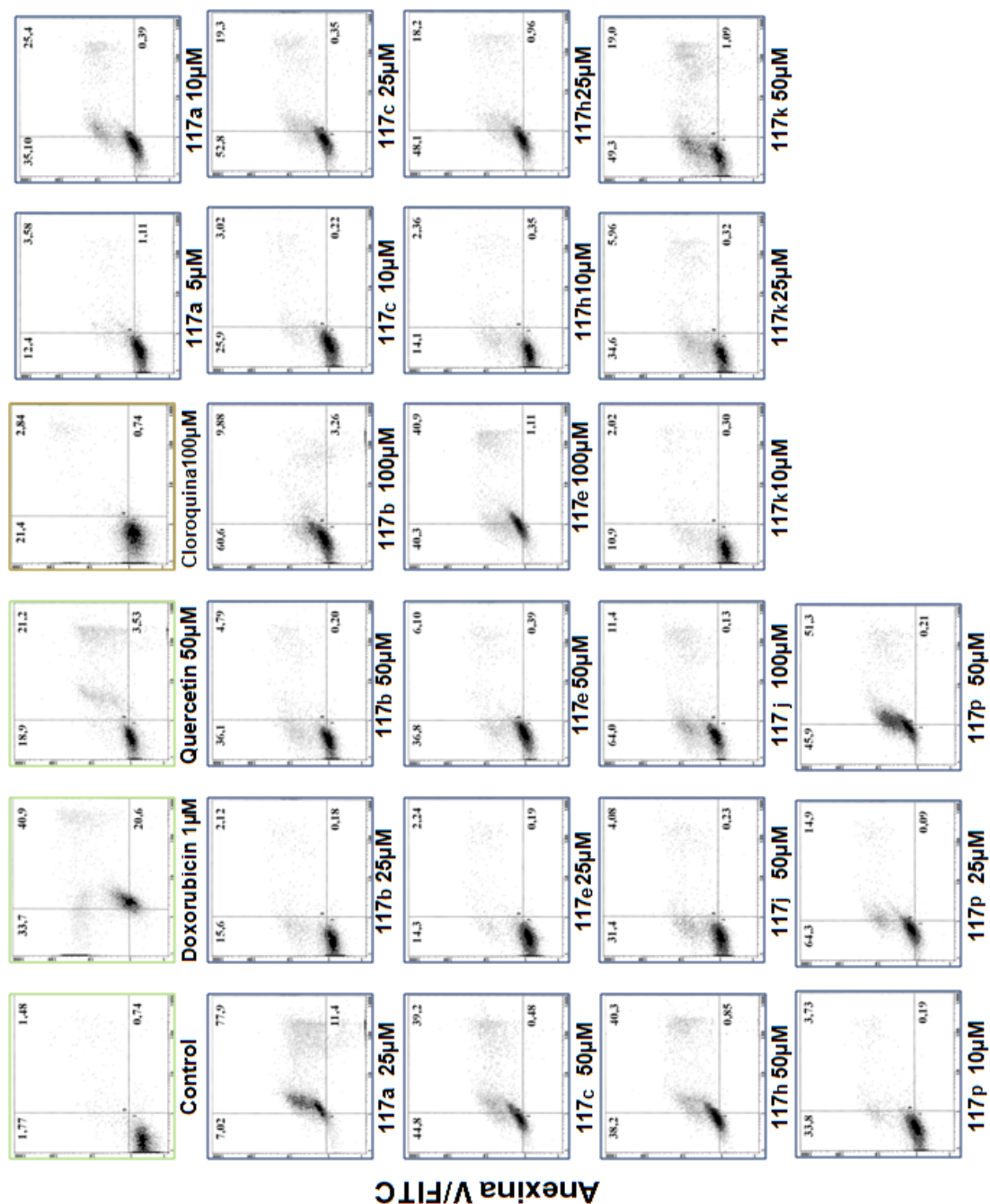


Grafico 10. Gráficos de densidad de punto de las células apoptóticas después del tratamiento por 24 h de las células leucémicas HL60 con los derivados seleccionados de la serie **118**. Marcadas con Anexina V-FITC e IP y analizadas por citometría de flujo. (Los datos son expresados como el porcentaje de las células positivas para la anexina V-FITC).



Ioduro de propidio

Grafico 11. Gráficos de densidad de punto de las células apoptóticas después del tratamiento por 24 h de las células leucémicas Jurkat E6.1 con los derivados seleccionados de la serie **117**. Marcadas con Anexina V-FITC e IP y analizadas por citometría de flujo. (Los datos son expresados como el porcentaje de las células positivas para la anexina V-FITC).

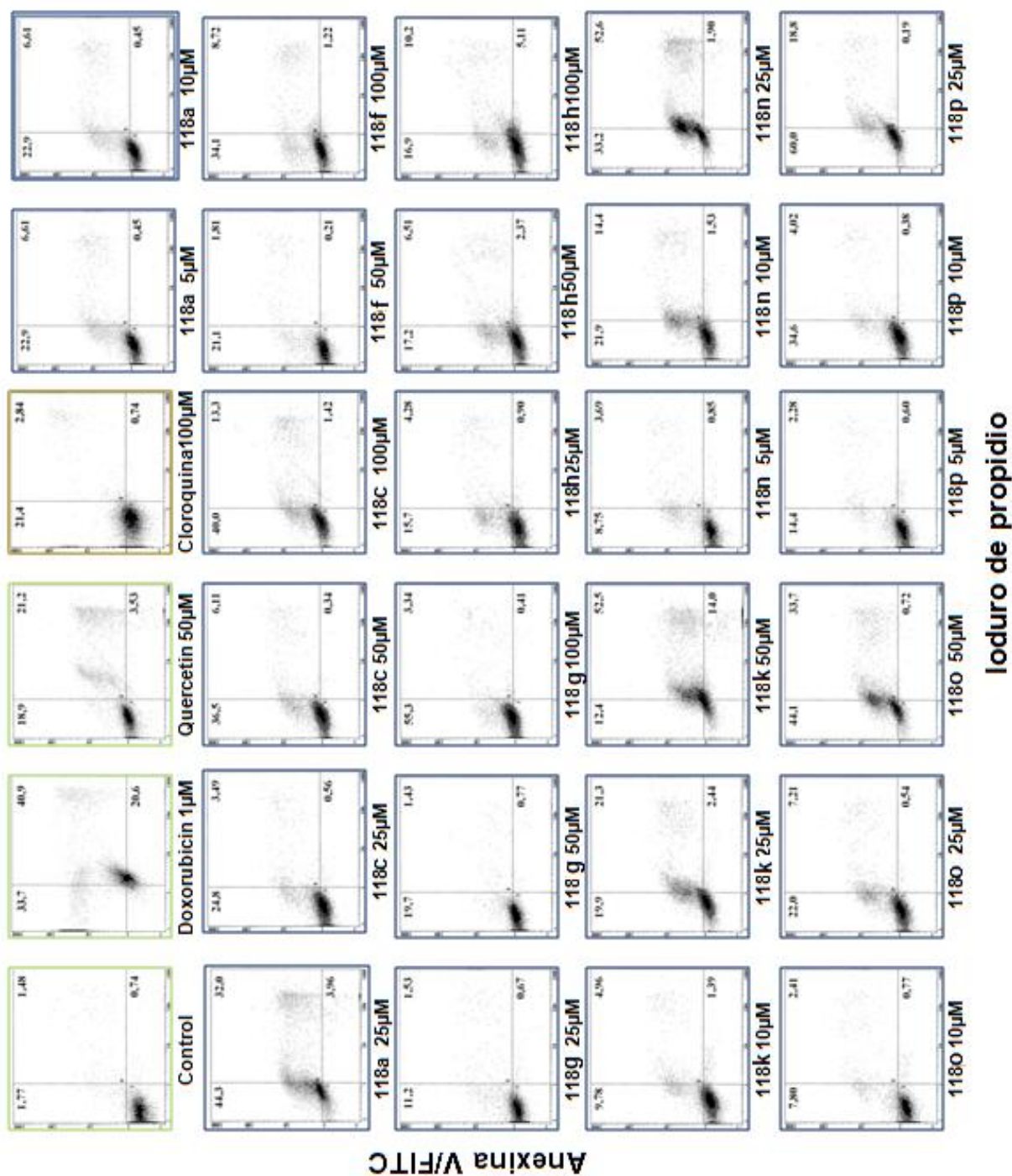


Gráfico 12. Gráficos de densidad de punto de las células apoptóticas después del tratamiento por 24 h de las células leucémicas Jurkat E6.1 con los derivados seleccionados de la serie **118**. Marcadas con Anexina V-FITC e IP y analizadas por citometría de flujo. (Los datos son expresados como el porcentaje de las células positivas para la anexina V-FITC).

En el análisis de los gráficos dot plot, para las dos líneas celulares ensayadas, se evidencia que el tratamiento con los derivados **117** y **118**, al igual que la doxorubicina (1 μ M), la quercetina (50 μ M) y la CQ (100 μ M), generó un aumento dependiente de la dosis en el porcentaje de células positivas para la Anexina V-FITC (apoptosis temprana y tardía). Mientras el tratamiento con la doxorubicina indujo un 32,2 % (HL60) y 20,6% (Jurkat E6.1) de células marcadas exclusivamente con el IP (células necróticas), la gran mayoría de los derivados presentó porcentajes de necrosis <1% comparables al porcentaje de necrosis del control (tablas XXI, XXII, XXIII, XXIV).

El compuesto más potente de las series **117** y **118** (10 μ M) fue el compuesto **117a** para la línea celular HL60, el cual produjo apoptosis temprana y tardía de manera significativa respecto al control, este compuesto presenta en su estructura un sistema trimetoxilado con patrón de sustitución 2, 3 y 4.

Por otra parte, es importante resaltar que los porcentajes de apoptosis temprana para las dos líneas celulares estudiadas en algunos compuestos, fueron superiores a los resultados en los controles positivos. Además, la selectividad mostrada por estos compuestos hacia la inhibición de las células cancerosas ($IS > 3$) y la evidencia demostrada en los gráficos dot plot, de la no inducción de la necrosis, sugieren que estos compuestos actúan vía proceso programado como lo es la apoptosis. Evidencias que permitirán desarrollar a futuro nuevos experimentos para dilucidar posibles mecanismos de acción, estos experimentos pueden incluir: Externalización de la fosfatidilserina, evaluación de diferenciación celular, activación de caspasas, fragmentación del ADN, perturbación del potencial mitocondrial y/o influencia sobre el ciclo celular. A su vez mediante herramientas químio-informáticas se podrá establecer algunas características moleculares y químico-cuánticas que permitan realizar modificaciones estructurales de estos derivados para continuar en la búsqueda de estructuras promisorias a fármacos.

Tabla XXIII. Resultados obtenidos después de 24 h, de las células leucémicas HL60 con los derivados seleccionados de las series 117.

Compuesto	Concentración (μ M)	Apoptosis temprana (%)	Apoptosis Tardía (%)	Apoptosis total (%)	Necrosis (%)
117a	5	43,10	9,07	52,17	0,31
	10	39,80	53,40	93,20	1,32
	25	83,20	9,17	92,37	0,07
117b	10	17,40	1,76	19,16	0,12
	25	50,01	2,94	52,95	0,17
117c	5	29,80	2,95	32,75	0,23
	10	54,20	8,45	62,65	0,25
	25	35,50	61,80	97,30	0,29
117e	25	32,30	4,77	37,07	0,44
	50	48,70	36,70	85,40	0,41
117f	50	30,40	2,62	33,02	0,18
	100	48,10	5,81	53,91	0,40
117h	5	18,20	1,77	19,97	0,17
	10	50,70	6,29	56,99	0,17
	25	35,40	57,60	93,00	0,34
117j	10	14,60	1,71	16,31	0,10
	25	52,70	3,19	55,89	0,05
117k	10	24,70	2,04	26,74	0,08
	25	70,00	9,73	79,73	0,77
	50	71,10	24,50	95,60	0,78
117p	5	44,40	4,85	49,25	0,10
	10	58,90	5,43	64,33	0,05
	25	61,50	34,60	96,10	0,11
Control		2,96	1,02	3,98	0,13
Cloroquina	100	16,60	8,22	24,82	5,41
Doxorubicina	1	4,47	53,80	58,27	32,20
Quercetin	50	39,40	21,90	61,30	1,04

% Apoptosis total= Apotosis temprana + apoptosis tardía

Tabla XXIV. Resultados obtenidos después de 24 h, de las células leucémicas HL60 con los derivados seleccionados de las series **118**.

Compuesto	Concentración (μM)	Apoptosis temprana (%)	Apoptosis Tardía (%)	Apoptosis total (%)	Necrosis (%)
118a	5	21,30	3,82	25,12	0,34
	10	57,60	14,10	71,70	0,93
	25	35,10	51,60	86,70	8,61
118c	10	19,70	2,35	22,05	0,18
	25	51,20	7,10	58,30	0,22
	50	63,00	13,40	76,40	0,35
118f	25	26,90	1,88	28,78	0,88
	50	53,00	4,34	57,34	0,24
118g	25	35,50	1,56	37,06	0,12
	50	81,80	7,84	89,64	0,06
	100	63,60	2,95	66,55	0,06
118h	25	33,10	7,13	40,23	0,41
	50	47,90	16,40	64,30	0,46
	100	45,60	17,00	62,60	0,58
118k	10	37,70	8,24	45,94	0,89
	25	37,60	51,20	88,80	1,05
	50	70,10	10,80	80,90	0,27
118n	5	17,00	2,49	19,49	0,19
	10	56,20	9,74	65,94	0,19
	25	21,80	76,30	98,10	0,22
118o	10	9,82	1,69	11,51	0,15
	25	59,30	9,91	69,21	0,09
	50	45,40	46,90	92,30	0,29
118p	5	44,60	7,00	51,60	0,23
	10	62,70	9,56	72,26	0,13
	25	51,80	44,90	96,70	0,12
Control		2,96	1,02	3,98	0,13
Cloroquina	100	16,60	8,22	24,82	5,41
Doxorubicina	1	4,47	53,80	58,27	32,20
Quercetin	50	39,40	21,90	61,30	1,04

% Apoptosis total= Apotosis temprana + apoptosis tardía

Tabla XXV. Resultados obtenidos después de 24 h, de las células leucémicas Jurkat E6.1 con los derivados seleccionados de las series 117.

Compuesto	Concentración (μM)	Apoptosis temprana (%)	Apoptosis Tardía (%)	Apoptosis total (%)	Necrosis (%)
117a	5	12,40	3,58	15,98	1,11
	10	35,10	25,40	60,50	0,39
	25	7,02	77,90	84,92	11,40
117b	25	15,60	2,12	17,72	0,18
	50	36,10	4,79	40,89	0,20
	100	60,60	9,88	70,48	3,26
117c	10	25,90	3,02	28,92	0,22
	25	52,80	19,30	72,10	0,35
	50	44,80	39,20	84,00	0,48
117e	25	14,30	2,24	16,54	0,19
	50	36,80	6,10	42,90	0,39
	100	40,30	40,90	81,20	1,11
117h	10	14,10	2,36	16,46	0,35
	25	48,10	18,20	66,30	0,96
	50	38,20	40,30	78,50	0,85
117j	50	31,40	4,08	35,48	0,23
	100	64,00	11,40	75,40	0,13
117k	10	10,09	2,02	12,11	0,30
	25	34,60	5,96	40,56	0,32
	50	49,30	19,00	68,30	1,09
117p	10	33,80	3,73	37,53	0,19
	25	64,30	14,90	79,20	0,09
	50	45,90	51,30	97,20	0,21
Control		1,77	1,48	3,25	0,74
Cloroquina	100	21,40	2,84	24,24	0,74
Doxorubicina	1	33,70	40,90	74,60	20,60
Quercetin	50	18,90	21,20	40,10	3,53

% Apoptosis total= Apotosis temprana + apoptosis tardía

Tabla XXVI. Resultados obtenidos después de 24 h, de las células leucémicas Jurkat E6.1 con los derivados seleccionados de las series **118**.

Compuesto	Concentración (μM)	Apoptosis temprana (%)	Apoptosis Tardía (%)	Apoptosis total (%)	Necrosis (%)
118a	5	22,90	6,61	29,51	0,45
	10	22,90	6,61	29,51	0,45
	25	44,30	32,00	76,30	3,96
118c	25	24,80	3,49	28,29	0,50
	50	36,50	6,11	42,61	0,34
	100	40,00	13,30	53,30	1,42
118f	50	21,10	1,81	22,91	0,21
	100	34,10	8,72	42,82	1,22
118g	25	11,20	1,53	12,73	0,67
	50	19,70	1,43	21,13	0,77
	100	55,30	3,34	58,64	0,41
118h	25	15,70	4,28	19,98	0,90
	50	17,20	6,51	23,71	2,37
	100	16,90	10,20	27,10	5,11
118k	10	9,78	4,96	14,74	1,39
	25	19,90	21,30	41,20	2,44
	50	12,40	52,50	64,90	14,00
118n	5	8,75	3,69	12,44	0,85
	10	21,90	14,40	36,30	1,53
	25	33,20	52,60	85,80	1,90
118o	10	7,80	2,41	10,21	0,77
	25	22,00	7,21	29,21	0,54
	50	48,10	33,70	81,80	0,72
118p	5	14,10	2,28	16,38	0,60
	10	34,60	4,02	38,62	0,38
	25	60,00	18,80	78,80	0,19
Control		1,77	1,48	3,25	0,74
Cloroquina	100	21,40	2,84	24,24	0,74
Doxorubicina	1	33,70	40,90	74,60	20,60
Quercetin	50	18,90	21,20	40,10	3,53

% Apoptosis total= Apotosis temprana + apoptosis tardía

V.2.3 Evaluación antimicrobiana

En base a los reportes de amplia actividad antimicrobiana de los núcleos acrilatos y bencimidazol.¹³²⁻¹³³ las series sintetizadas fueron ensayadas a fin de estudiar la potencial actividad sobre los microorganismos Gram-Positivos (G+); *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus*, los microorganismos Gram negativos (G-); *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, y la levadura *Candida tropicalis*.

Las bacterias son organismos microbianos con tendencia a mutaciones genéticas que las hacen resistentes a los fármacos que se desarrollan año tras año, ocasionando enfermedades graves en hospitales, clínicas y ambulatorios, siendo un grave problema en intervenciones quirúrgicas, tratamientos especiales inmunosupresores y pacientes con VIH, para los cuales es prioritario el carácter aséptico y estéril de instalaciones e implementos.¹⁶⁷⁻¹⁷⁰ A pesar de los grandes esfuerzos en la búsqueda de compuestos con actividad antimicrobiana, la incidencia de estas infecciones siguen siendo difíciles de erradicar y se han visto incrementadas en las últimas dos décadas.¹⁷⁰

Como control positivo se emplearon antibióticos comercialmente disponibles, como lo son **AN**: amikacina (30mcg), **SAM**: ampicilina/sulbactam (20mcg), **O**: ofloxacina (5mcg), **TIL**: tilmicosin (15mcg), **PB**: polimixina B: (300 UI) y como control negativo **S** = mezcla de solventes o vehículo.

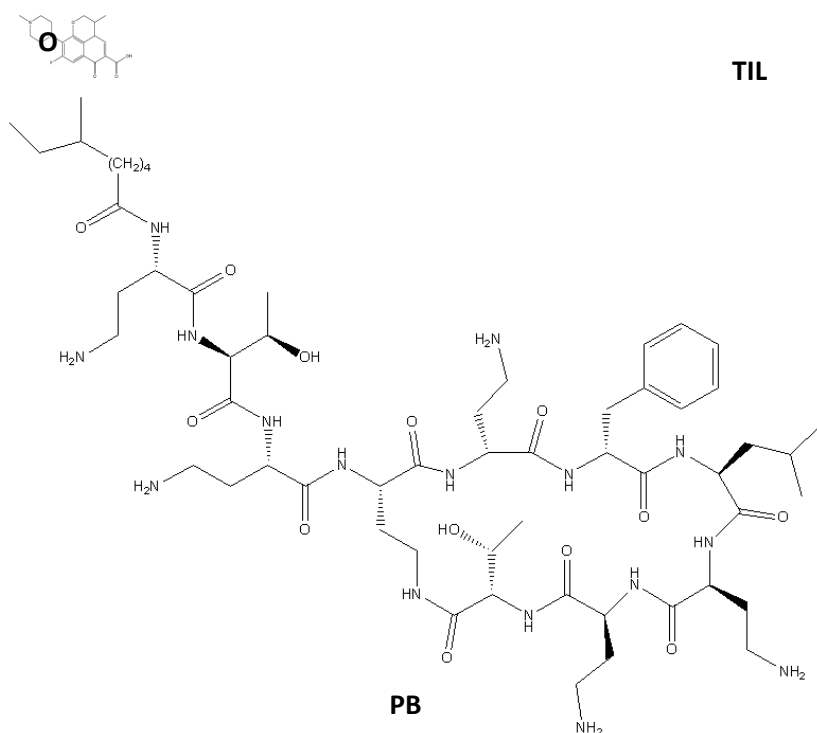
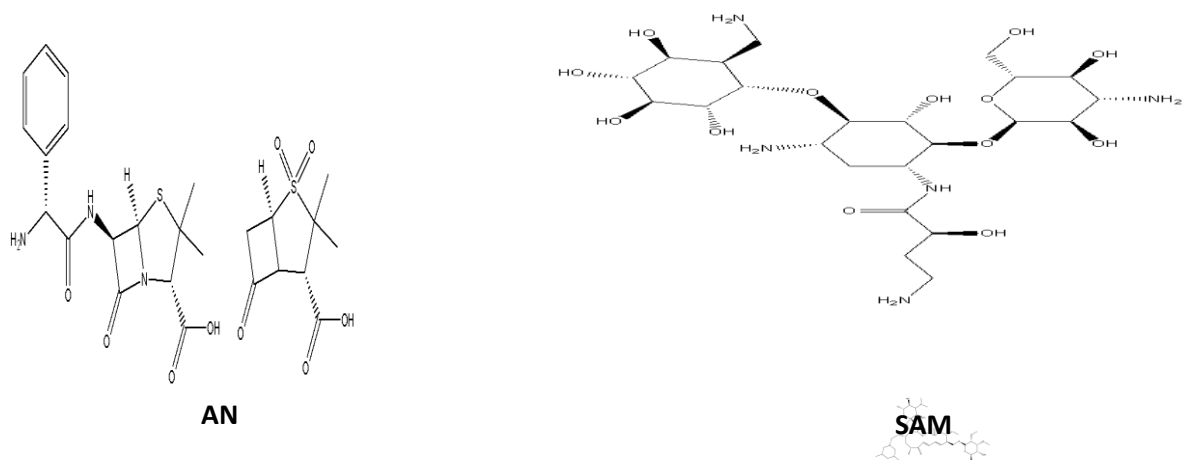


Figura 76. Estructura Química de **AN:** ampicilina **SAM:** ampicilina/sulbactam, **O:** ofloxacina, **TIL:** tilmicosin, **PB:** polimixina B.

Los resultados obtenidos se resumen en las Tablas XXVII, XXVIII, XIX y XXX se expresan como diámetros del halo de inhibición reportados en mm.

Tabla. XXVII. Evaluación de la actividad antimicrobiana en función del halo de inhibición (mm) de la serie 112a-n

<i>Muestras/ Microorganismos</i>	Bacterias		Bacterias		Levadura
	Gram-positivas		Gram-negativas		
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. tropicalis</i>
75	8	8	-	-	-
112a	8	8	8	-	-
112b	-	-	-	-	-
112c	-	-	-	-	-
112d	-	-	-	-	-
112e	-	-	-	-	-
112f	8	10	-	-	
112g	-	-	-	-	-
112h	-	-	-	-	-
112i	-	-	-	-	-
112j	-	-	-	-	-
112k	8	10	-	-	10
112l	-	8	12	-	-
112m	8	8	-	-	-
112n	-	-	-	-	-

Tabla. XXVIII. Evaluación de la actividad antimicrobiana en función del halo de inhibición (mm) de la serie 117a-p.

<i>Muestras/ Microorganismos</i>	Bacterias Gram-positivas		Bacterias Gram-negativas		Levadura
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. tropicalis</i>
115a	10	8	10	12	12
117a	12	10	14	12	14
117b	15	15	12	15	12
117c	14	12	14	15	14
117d	15	8	15	15	12
117e	14	14	12	15	14
117f	12	8	14	20	14
117g	12	8	12	14	12
117h	10	8	10	-	-
117i	10	8	14	15	16
117j	15	15	12	15	12
117k	15	16	12	16	15
117l	15	12	12	12	12
117m	10	10	-	14	15
117n	8	10	-	12	10
117o	8	10	12	-	-
117p	15	14	15	14	15

Tabla. XXIX. Evaluación de la actividad antimicrobiana en función del halo de inhibición (mm) de la serie 118a-p.

<i>Muestras/ Microorganismos</i>	Bacterias Gram-positivas		Bacterias Gram-negativas		Levadura
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. tropicalis</i>
115b	12	16	15	14	15
118a	14	12	14	14	12
118c	14	-	12	14	10
118d	14	-	10	8	10
118e	-	-	12	12	12
118f	10	10	14	10	10
118g	10	10	12	12	10
118h	14	12	12	15	13
118i	18	14	14	15	12
118k	12	-	10	10	12
118l	12	12	12	2	8
118m	10	10	8	10	10
118n	8	8	-	8	10
118o	12	12	14	10	10
118p	14	12	15	12	12

Tabla. XXX. Evaluación de la actividad antimicrobiana en función del halo de inhibición (mm) del grupo control.

<i>Muestras/ Microorganismos</i>	Bacterias Gram-positivas		Bacterias Gram-negativas		Levadura
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. tropicalis</i>
AN	17	18	20	16	17
SAM	18	-	15	12	-
O	24	25	25	25	23
TIL	20	28	20	20	25
PB	-	-	-	-	-
S	-	-	-	-	-

Diámetros de inhibición reportados en mm

Concentración = 1-5 mg/mL

- = no inhibición

C = controles: **AN**: amikacina (30mcg), **SAM**: ampicilina/sulbactam (20mcg), **O**: ofloxacina (5mcg), **TIL**: tilmicosin (15mcg), **PB**: polimixina B: (300 UI)

S = mezcla de solventes.

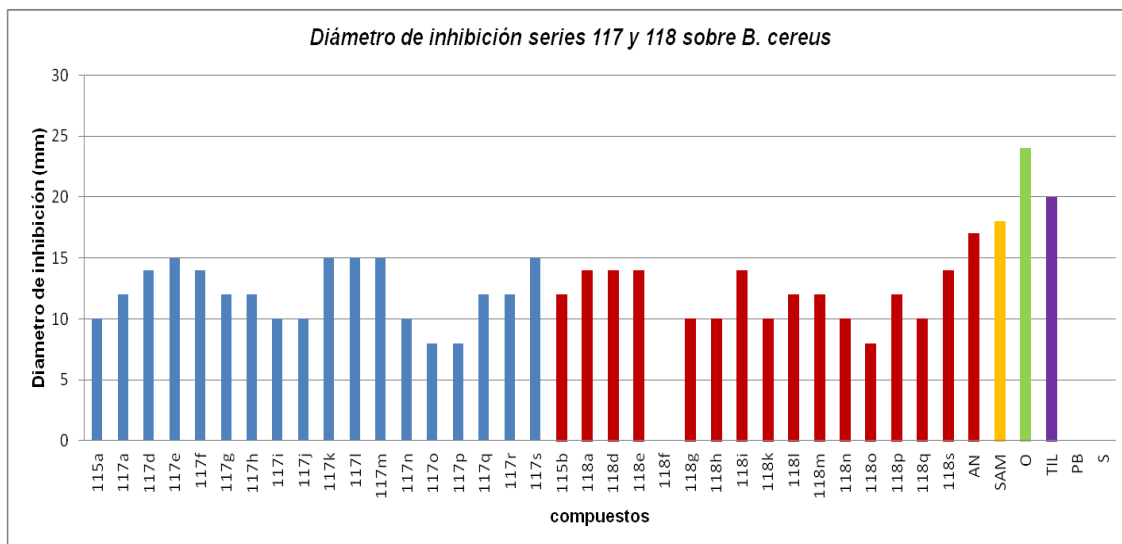


Gráfico 13. Diámetros de inhibición en mm, obtenidos de la evaluación in vitro sobre *B. cereus*. Series 117 y 118.

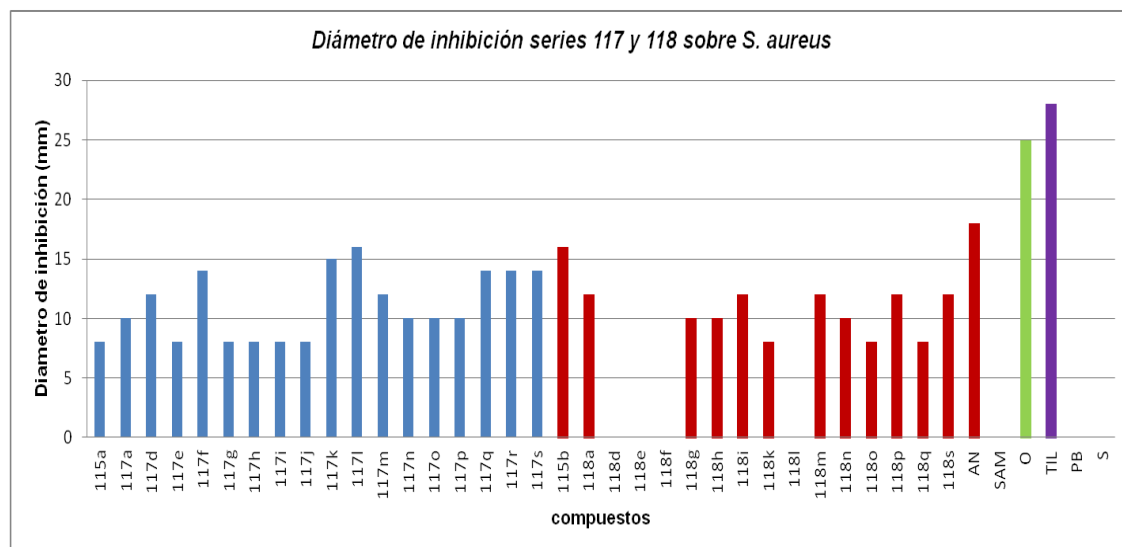


Gráfico 14. Diámetros de inhibición en mm, obtenidos de la evaluación in vitro sobre *S. aureus*. Series 117 y 118.

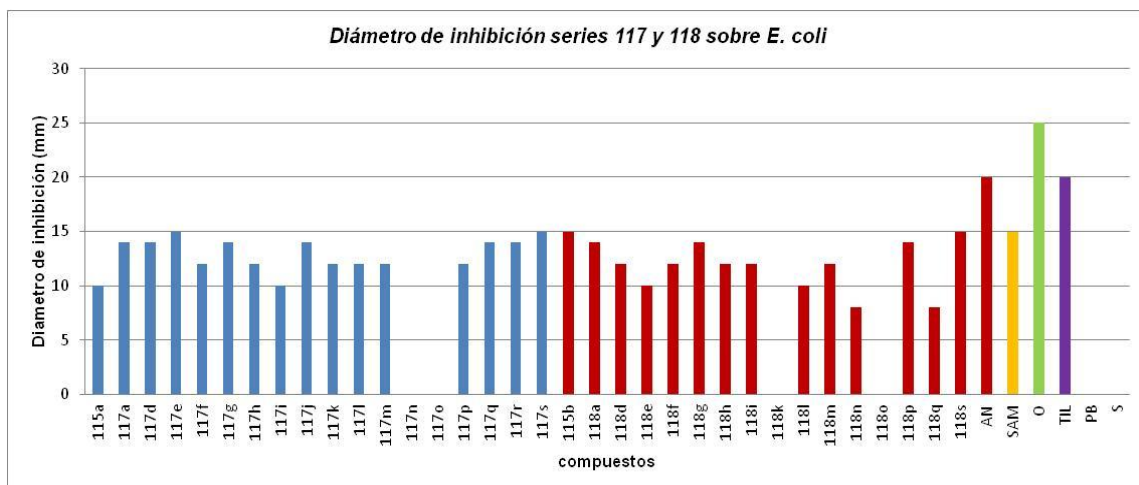


Gráfico 15. Diámetros de inhibición en mm, obtenidos de la evaluación in vitro sobre *E. coli*. Series 117 y 118.

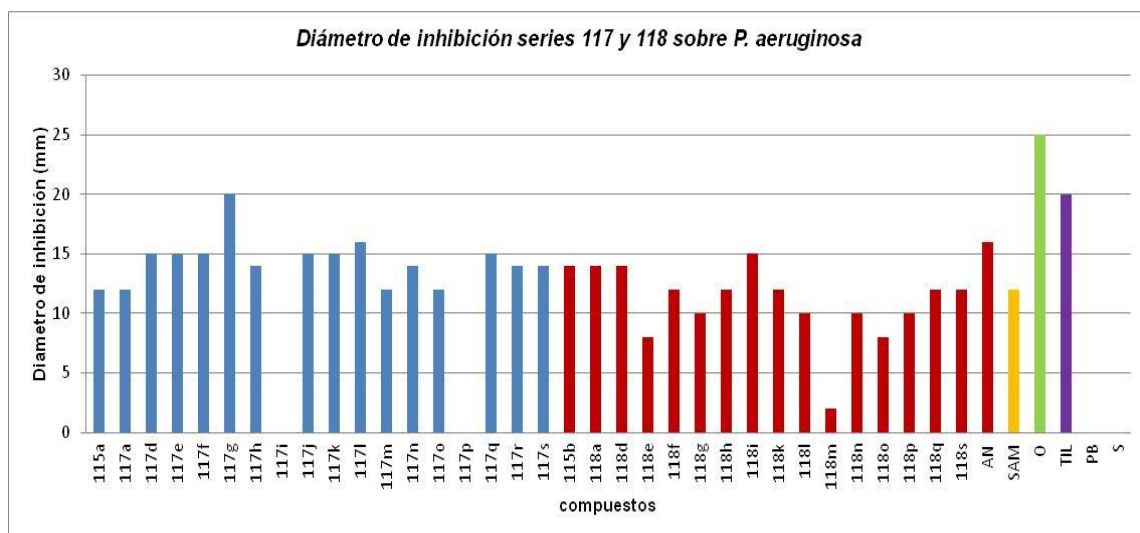


Gráfico 16. Diámetros de inhibición en mm, obtenidos de la evaluación in vitro sobre *P. aeruginosa*. Series 117 y 118.

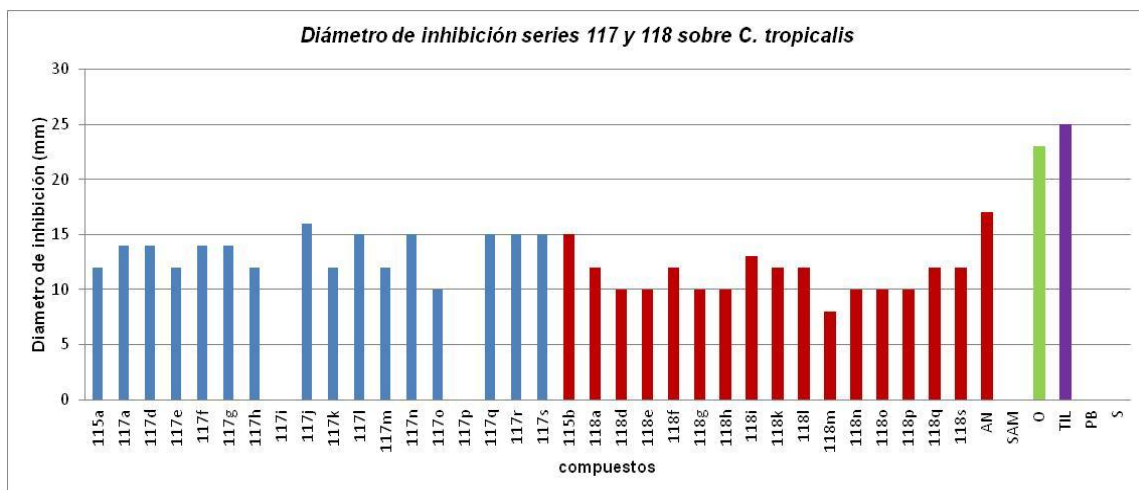


Gráfico 17. Diámetros de inhibición en mm, obtenidos de la evaluación in vitro sobre *C. tropicalis*. Series 117 y 118.

Los compuestos muestran actividades biológicas muy variadas, siendo la mayoría de amplio espectro. Series **117** y **118**.

Especial atención es de prestar a aquellos compuestos que son activos contra *P. aeruginosa* por ser esta una bacteria oportunista de gran resistencia, y aquellos activos contra la levadura *C. tropicalis*, ya que se está en presencia de un antimicótico activo contra un patógeno muy resistente también.

En todos los casos se observa actividad moderada, destacándose los compuestos **115a-b**, **117a**, **117c-g**, **117i-l**, **117p**, **118a**, **118d**, **118f-k** y **118o**, que mostraron actividad de amplio espectro, ya que fueron activos contra las bacterias G+ y G- evaluadas, además de ser activos contra la levadura *C. tropicalis*.

Los compuestos **75**, **112a** y **112l** presentan una débil actividad contra las bacterias *S. aureus* (G+) y *E. coli* (G-). El compuesto **112k** fue activo contra bacterias (G+) además contra *C. tropicalis*.

Los compuestos **112f**, **112k**, **117i**, **117n**, **117o** y **117p** mostraron poseer actividad predominante contra las bacterias G+ evaluadas, siendo **117i** y **117p**

además activos contra *E. coli* (G-), mientras que **117m** y **117n** fueron activos además contra *P. aeruginosa* y *C. tropicalis*.

Los antibióticos utilizados como control mostraron tener actividad biológica específica contra los microorganismos empleados, inclusive contra *C. tropicalis*.

Finalmente, no se observó actividad inhibitoria por parte de la mezcla de solventes que se utilizó.

En base a los resultados presentados, podemos inferir dos aspectos importantes:

i) La estrategia de farmacomodulación realizada, logro mejorar la actividad biológica, destacando la presencia de los grupos metoxi como herramientas claves en la construcción de una estructura molecular principalmente en los estudios antimaláricos y citotóxicos antitumorales (compuestos **112a**, **117a** y **118a**). Probablemente este grupo presenta características electrónicas y lipofílicas que le confieren la capacidad de interactuar o alcanzar diferentes receptores al ser comparadas con las plantillas de partida o compuestos “hit”. Este aumento lipofílico lo podemos observar en las tablas V, VIII y IX mediante la relación con el LogP, aumento que puede ser favorable para la absorción biológica.¹⁷¹⁻¹⁷³

ii) Otro factor que se ha considerado basado en los resultados obtenidos y que fue mencionado a principios de este capítulo es la característica de profármacos, prodrogas o con una denominación más amplia para esta investigación “prohit”, bajo la cual se diseñaron los compuestos sintetizados. Herramienta ampliamente usada en química medicinal para superar algunos problemas de formulación, solubilidad, estabilidad, problemas asociados a una absorción incompleta (principalmente biodisponibilidad), o debido a un extenso metabolismo de primer paso.¹⁷² Con la estrategia de profármaco con frecuencia,

se mejoran las propiedades fisicoquímicas y/o farmacocinéticas de un fármaco.¹⁵²

Bajo esta premisa es importante considerar que muchos compuestos que han sido identificados como potentes en actividades *in vitro*, se han encontrado inactivos *in vivo* y viceversa.¹⁷⁴ Un ejemplo de ello lo representan los compuestos de las series **117** y **118** ensayados en el *Test de Peters*, los cuales fueron muy potentes inhibiendo la formación de la hemozoína %IFH>70, pero mostraron moderada actividad al comparar con los resultados obtenidos en el *Test supresivo de cuatro días* (Tablas XIII y XV). Probablemente las propiedades fisicoquímicas de estos compuestos no le permiten llegar al sitio de acción o interactuar óptimamente con los receptores específicos, desde luego en pruebas biológicas *in vivo*, un compuesto químico (xenobiótico) puede experimentar una serie de transformaciones que pueden potenciar o desactivar su efecto biológico.

Como ejemplo asociado a problemas de formulación en este trabajo, se puede incluir la dosis administrada, variable estudiada en el caso de la serie **112** en el *Test de Peters*, en la cual para una dosis de 20 mg/Kg los compuestos presentaron una disminución cercana al 50% de la parasitemia (comparada con el control negativo). Sin embargo, los días de supervivencia fueron similares al control negativo. Al disminuir la dosis en un 50% (10 mg/Kg), los días de supervivencia de los ratones infectados aumentaron a valores comparables al grupo control positivo.

Los compuestos sintetizados pudieran estar actuando como profármacos transportadores (éster y/o amida) que puede tener como función aumentar la liberación del compuesto líder, fármaco o más adecuadamente compuesto "hit" en este trabajo, ejemplo liberación del fenol **75** o los ácidos **115a-b**. Por lo general la activación metabólica de los profármacos transportadores, puede ser alcanzada a través de la mediación de enzimas hidrolíticas, procesos oxidoreductores o proceder mediante procesos químicos no enzimáticos,¹⁷⁴⁻¹⁷⁶

procesos que están presentes tanto en los cultivos celulares como en los ensayos *in vivo* realizados en este trabajo.

La activación de estos “pro hit” puede involucrar muchas enzimas incluyendo oxido-reductasas, como CYP450 y DT-diaforasa, enzimas hidrolíticas como carboxilesterasas, transferasas, hidrolasas, liasas y glucoronidasas.^{173,175-177}

En la figuras 77 y 78 se puede apreciar algunos ejemplos de las activaciones de prodrugs encontradas donde actúan algunas de las enzimas y que pudieran dar ejemplo de alguna hidrólisis de los ésteres y/o amidas presentes en los compuestos evaluados en este trabajo.

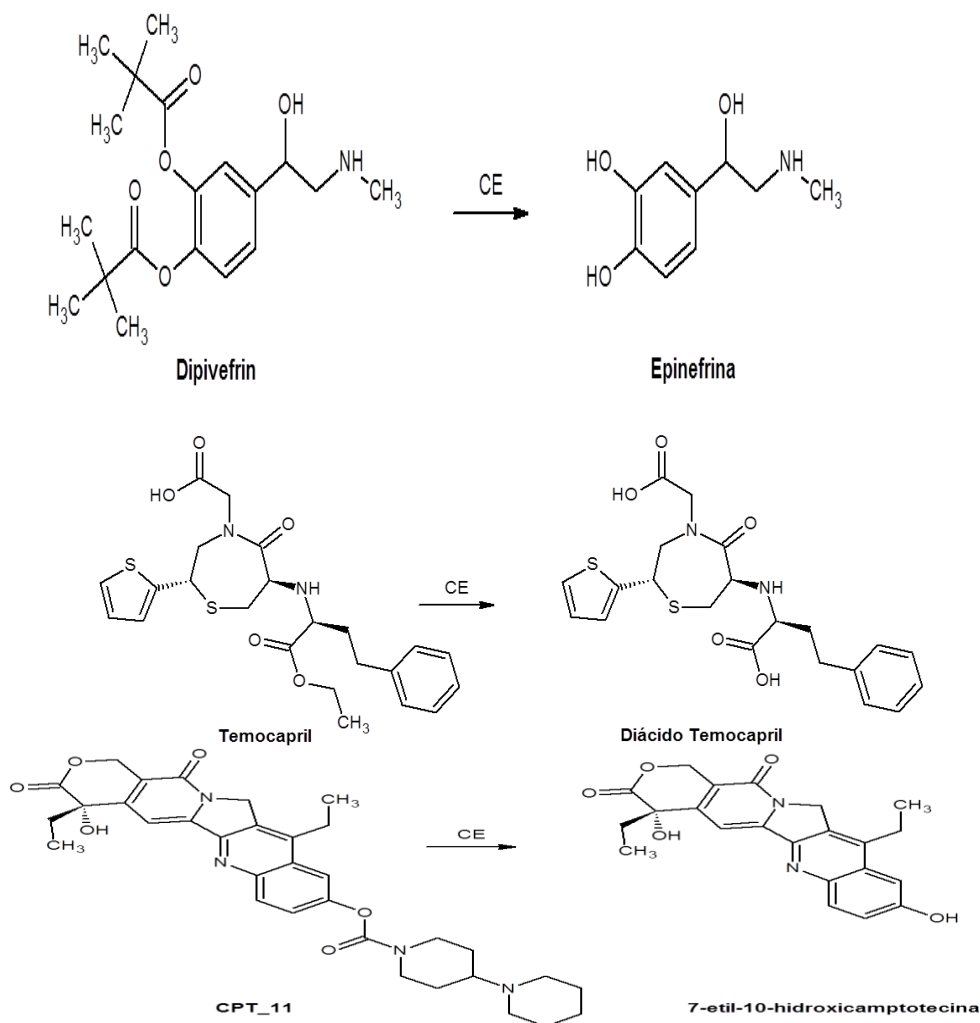


Figura 77. Activación de prodrugs tipo éster y carbamato mediante Carboxilesterasas.

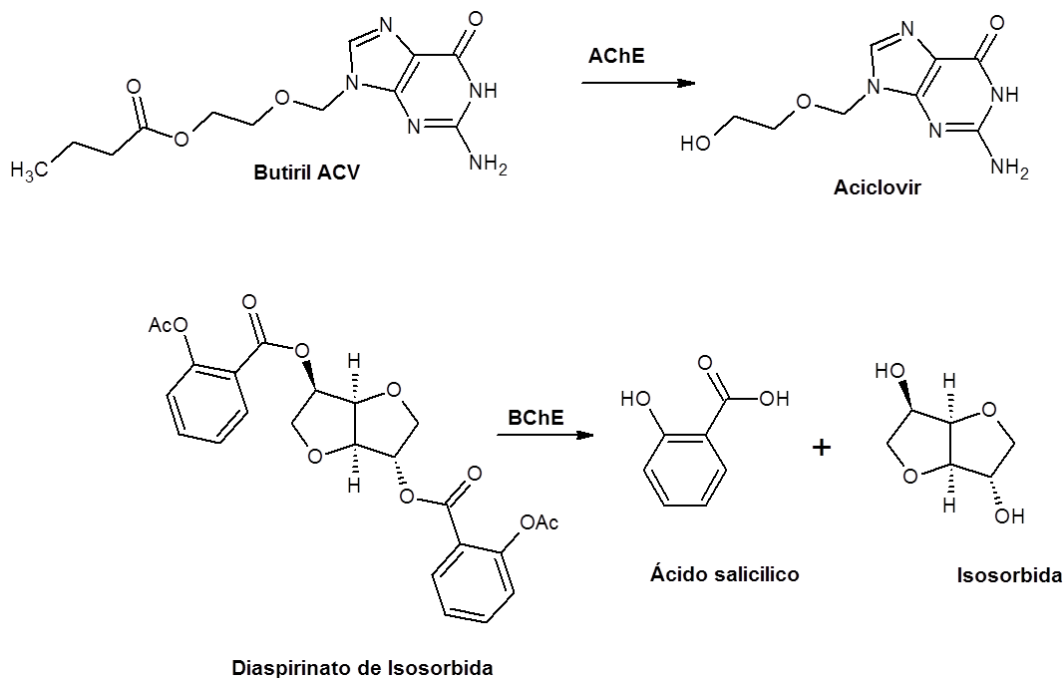


Figura 78. Activación de prodrogas mediante Acetilcolinesterasa (AChE) y Butirilcolinesterasa (BChE).

Un punto importante a considerar en el desarrollo de promisorias estructuras a fármacos está relacionado con la predicción de las propiedades de la absorción oral a partir de las propiedades fisicoquímicas, un método empírico sencillo y ampliamente utilizado lo representa las reglas de Lipinski,¹⁷⁸ en el cual se ha establecido por medio de ciertas similitudes que presentan la mayoría de los fármacos activos por vía oral, que determinados parámetros estructurales y fisicoquímicos pueden condicionar este tipo de absorción. Estas reglas de Lipinski también son conocidas como la regla de los 5, por la relación de múltiplos de 5 que han de cumplir las propiedades consideradas.

Dentro de los descriptores se tiene:

LogP \leq 5 (Calculado según Hansch)

Peso molecular \leq 500

Grupos dadores de enlace de hidrogeno \leq 5

Grupos aceptores de enlace de hidrogeno \leq 10

Se estima que mientras una molécula se aleje más de los parámetros indicados por las reglas de Lipinski, menor es la probabilidad de poder superar con éxito las etapas más avanzadas en el desarrollo de un medicamento.

En la actualidad la quimioinformática ha desarrollado muchas aproximaciones para predecir modelos de absorción oral, sin embargo la sencillez de regla de Lipinski puede ser usada de manera rápida para dicha estimación.

Estas reglas relacionan la capacidad que tiene una sustancia para atravesar las membranas lipídicas con el balance entre el peso molecular y la solubilidad en lípidos y en agua. A pesar, de que en esta investigación los resultados biológicos no indican una dependencia directa con el coeficiente de partición LogP, sigue siendo una variable importante en los estudios químico medicinales, de los compuestos sintetizados sólo cuatro compuestos violan más de 1 de las reglas de Lipinski, compuestos **112e**, **112k**, **112l** y **112m**. De los cuales los compuestos **112l** y **112k** presentaron excelentes resultados en el Test supresivo de los cuatro días. El resto de los compuestos satisface las reglas de Lipinski (tablas XXXI, XXXII).

La estimación de estos descriptores se realizó empleando el módulo ProjectLeader del programa CaChe 3.0.

Tabla. XXXI. Descriptores evaluados para la serie 112a-n, regla de Lipinski

Compuestos	Peso molecular	Log P	Grupos aceptores de enlaces de Hidrógeno		Grupos dadores de enlaces de Hidrógeno			Violaciones regla de Lipinski
			Átomos de Nitrógeno	Átomos de Oxígeno	Grupos amino	Grupos amino secundarios	Grupos Hidroxilos	
75	371.838	3.664	1	3	0	0	1	0
112a	566.024	4.602	1	7	0	0	0	1
112b	566.024	4.602	1	7	0	0	0	1
112c	566.024	4.602	1	7	0	0	0	1
112d	566.024	4.602	1	7	0	0	0	1
112e	794.317	9.932	1	7	0	0	0	2
112f	535.998	4.855	1	6	0	0	0	1
112g	535.998	4.855	1	6	0	0	0	1
112h	535.998	4.855	1	6	0	0	0	1
112i	535.998	4.855	1	6	0	0	0	1
112j	535.998	4.855	1	6	0	0	0	1
112k	505.972	5.107	1	5	0	0	0	2
112l	505.972	5.107	1	5	0	0	0	2
112m	505.972	5.107	1	5	0	0	0	2
112n	475.946	5.360	1	4	0	0	0	1

Tabla. XXXII. Descriptores evaluados para las series 117a-p y 118a-p, regla de Lipinski.

Compuestos	Peso molecular	Log P	Grupos aceptores de enlaces de Hidrógeno		Grupos dadores de enlaces de Hidrógeno		Grupos Hidroxilos	Violaciones regla de Lipinski
			Átomos de Nitrógeno	Átomos de Oxígeno	Grupos amino	Grupos amino secundarios	Grupos Hidroxilos	
117a	438.396	2.375	4	7	0	2	0	1
117b	408.370	2.628	4	6	0	2	0	1
117c	378.343	2.880	4	5	0	2	0	0
117d	376.371	4.067	4	4	0	2	0	0
117e	376.371	4.067	4	4	0	2	0	0
117f	376.371	4.067	4	4	0	2	0	0
117g	376.371	4.067	4	4	0	2	0	0
117h	362.344	3.600	4	4	0	2	0	0
117i	362.344	3.600	4	4	0	2	0	0
117j	423.341	2.834	5	7	0	2	0	0
117k	412.789	3.398	4	5	0	2	0	0
117l	412.789	3.398	4	5	0	2	0	0
117m	382.762	3.651	4	4	0	2	0	0
117n	382.762	3.651	4	4	0	2	0	0
117o	427.213	3.925	4	4	0	2	0	0
117p	416.316	4.016	4	4	0	2	0	0
118a	454.456	2.718	4	6	0	2	0	1
118b	424.430	2.971	4	5	0	2	0	0
118c	394.404	3.224	4	4	0	2	0	0
118d	392.431	4.411	4	3	0	2	0	0
118e	392.431	4.411	4	3	0	2	0	0
118f	392.431	4.411	4	3	0	2	0	0
118g	392.431	4.411	4	3	0	2	0	0
118h	378.405	3.944	4	3	0	2	0	0
118i	378.405	3.944	4	3	0	2	0	0
118j	439.402	3.177	5	6	0	2	0	1
118k	428.849	3.742	4	4	0	2	0	0
118l	428.849	3.742	4	4	0	2	0	0
118m	398.823	3.994	4	3	0	2	0	0
118n	398.823	3.994	4	3	0	2	0	0
118o	443.274	4.268	4	3	0	2	0	0
118p	432.376	4.359	4	3	0	2	0	0

En vista de la amplia actividad biológica encontrada en las series sintetizadas y la distribución de los valores (datos biológicos), se recomienda estudiar mediante métodos *in silico* a un estudio QSAR (relación estructura química actividad), donde se establezca a diferentes niveles de cálculo la contribución de los conjuntos de descriptores tanto moleculares como químico-cuánticos, a fin de predecir modelos matemáticos que nos permitan proponer con una mayor aproximación los factores moleculares que favorecen dichas actividades.

Con esta información y los estudios bilógicos posteriores se espera contar con nuevos datos tanto en los mecanismos de acción bilógica como de información química que nos permita continuar afinando el diseño molecular, lo que nos permitirá continuar con la síntesis de nuevos análogos.

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- El empleo de una mezcla 1:1 acetona:agua permitió mejorar el aislamiento y purificación del compuesto 2-(7-cloroquinolinil-4-iltio)-3-(4-hidroxifenil) acrilato de metilo (104) en un 100% proporcionando un método sencillo y económico, en relación al procedimiento reportado.

- El hidrocloruro de 1-Etil-3-(3-imetilaminopropil)carbodiimida (EDCI o EDAC) demostró ser el agente activante más conveniente para la esterificación de los sustratos estudiados.

- Se sintetizaron satisfactoriamente 14 compuestos benzoatos de 4-[(E)-2-(metoxicarbonil)-2-(7-cloroquinolinil-4-iltio)vinil] fenilo (106 a-n), con rendimientos entre el 30 -60 % de rendimiento, mediante la reacción de esterificación modificada de Steglich.

- Los compuestos **112a**, **112h**, **112j**, **112k** y **112l** potenciaron la actividad antimalárica logrando mejorar la inhibición de la formación de la hemozoína entre un 17 y 30% en relación al compuesto **75** (72,4%).

- Aquellos compuestos que poseen sustituyentes metoxilados en las posiciones 2 y 3 del anillo benzoato parece ser importantes para mantener la actividad en la serie **112**.

- Los compuestos **112a**, **112h**, **112j**, **112k** y **112l** presentaron resultados similares al control infectado en relación a los días de supervivencia post infección a una dosis de 20mg/Kg, logrando disminuir el porcentaje de parasitemia en más del 50%. Lo que podría significar que la dosis ensayada es tóxica a esta concentración.

- Los compuestos **112a**, **112h**, **112j**, **112k** y **112l** a una dosis de 10 mg/Kg aumentaron los días de supervivencia de los ratones post infección entre un 67 y 79%. Además, lograron reducir la parasitemia en relación al control infectado. Esta reducción de parasitemia es más significativa con el tratamiento de **112a**, cuyo porcentaje de parasitemia se reduce en valores similares a la de la CQ.

- Se sintetizaron 28 compuestos del tipo 2-(5-nitrofuran/tiofen-2-il)-*N*-fenil-3*H*-benzo[*d*]imidazol-6-carboxamidas (series **117** y **118**) con rendimientos entre 31-55 por ciento.

- En las células leucémicas humanas HL60 y Jurkat E6.1, los compuestos de la serie **117** resultaron más activos que los compuestos de la serie **118** (tablas XVI a la XIX).

- Los derivados de bencimidazol fueron más activos inhibiendo la proliferación de las células de leucemia linfocítica aguda, Jurkat E6.1 que la células de leucemia mieloide aguda HL60.

- Los derivados más activos de la serie **117** y **118**, resultaron más tóxicos para las células de cáncer, indicando un nivel razonable de selectividad.

- Los compuestos que fueron más activos inhibiendo la proliferación celular de la HL60 y Jurkat E6.1, a su vez fueron los más potentes induciendo el proceso de apoptosis en estas líneas celulares.

- Los resultados de Anexina V, indican que la actividad antiproliferativa se correlaciona con un mecanismo vía apoptosis.

- Los compuestos de las series **117** y **118** muestran actividades antimicrobianas muy variadas, siendo la mayoría de amplio espectro.

- Los compuestos **115a-b, 117a, 117c-g, 117i-l, 117p, 118a, 118d, 118f-k y 118o**, que mostraron actividad de amplio espectro, ya que fueron activos contra las bacterias G+ y G- evaluadas, además de ser activos contra la levadura *C. tropicalis*.

- Los compuestos **75, 112l y 112m** fueron activos contra las bacterias *S. aureus* (G+) y *E. coli* (G-), el compuesto **112k** fue activo contra bacterias (G+) además contra *C. tropicalis*.

- Los compuestos **118a, 118b, 118d y 118n** mostraron poseer actividad predominante contra las bacterias G- evaluadas *E. coli* y *P. aeruginosa*, siendo además activos contra *B. cereus* (G+), y la levadura *C. tropicalis*.

- Se recomienda hacer estudios QSAR para predecir una ecuación matemática que permita continuar con el diseño de nuevos análogos a los compuestos ensayados.

- Realizar ensayos biológicos para evaluar la actividad antimalarica en cultivos de *P. falciparum*, inhibición de proteasas y aumentar el número de compuestos ensayados en el *Test de Peters*.

- Continuar con los estudios citotóxicos a fin de proponer bajo que vía apoptótica pudieran estar actuando los compuestos.

- Evaluar en otras líneas celulares de cáncer como cáncer de mamá y próstata.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.Escalona J, Carrasco R, Padrón, J. Introducción al diseño racional de fármacos. La Habana-Cuba. Editorial Universitaria. **2008**.
- 2.Braña M, Martin-Cantejo Y, Migallín A, Morám M. Parasitosis y cáncer. *An. R. Acad, Nac Farm.* **2008**, 74,29-50.
- 3.Mahmoudi N, Garcia-Domenech R, Galvez J, Farhati K, Franetich J, Sauerwein R, Hannoun L, Derouin F, Danis M, Mazier D. New Active Drugs against Liver Stages of *Plasmodium* Predicted by Molecular Topology. *Antimicrob Agents Chemother.* **2008**,52, 1215.
- 4.P Salinas. Fármacos antineoplásicos. En; Lorenzo P, Moreno A, Lizasoain I, Leza J.C, Moro M.A., Portolés A. Farmacología Básica y Clínica.18 a Edición. Editorial Médica Panamericana. 973-996.
- 5.Nacional Cancer Institute. What is cancer?.USA. [Actualizada el 07 de Diciembre de 2010; acceso en enero de 2011] disponible en; <http://www.cancer.gov>.
- 6.Organización Mundial de la Salud (OMS). Informe anual. **2007**. [Acceso en enero de 2012] www.who.int/ncdsurveillance/web/InfoBasePolicityMaker/Reports/cancer.aspx.
- 7.Ministerio del Poder Popular para la Salud. Registro Nacional de Cáncer. [Actualizada el 02 de Septiembre de 2010; acceso octubre de 2010] disponible en;<http://www.mpps.gob.ve/modules.php?name=News&file=print&sid=2418>.

8. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. **1972**, 26(4): 239-257
9. Prindull G. Apoptosis in the embryo and tumorigenesis. *Eur J Cancer*. **1995**, 31A (1): 116-123
10. Meier P, Finch A, Evan G. Apoptosis in development. *Nature*. **2000**, 407(6805): 796-801
11. Liu QA, Hengartner MO. The molecular mechanism of programmed cell death in *C. elegans*. *Ann N Y Acad Sci*. **1999**, 887: 92-104
12. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*. **1980**, 68: 251-306
13. Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*. **1980**, 284(5756): 555-556
14. Fadok VA, Henson PM. Apoptosis: getting rid of the bodies. *Curr Biol*. **1998**, 8(19): R693-695
15. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*. **1998**, 391(6662): 43-50
16. Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*. **1998**, 391(6662): 96-99
17. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*. **2000**, 407(6805): 784-788

18. Green DR, Evan GI (A matter of life and death. *Cancer Cell*. **2002**, 1(1): 19-30
19. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*. **2004**, 10(8): 789-799
20. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*. **1996**, 87(2): 171
21. Miura M, Zhu H, Rotello R, Hartwig EA, Yuan J. Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell*. **1993**, 75(4): 653-660
22. Walker NP, Talanian RV, Brady KD, Dang LC, Bump NJ, Ferenz CR, Franklin S, Ghayur T, Hackett MC, Hammill LD. Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell*. **1994**, 78(2): 343-352
23. Wilson KP, Black JA, Thomson JA, Kim EE, Griffith JP, Navia MA, Murcko MA, Chambers SP, Aldape RA, Raybuck SA. Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature*. **1994**, 370(6487): 270-279
24. Rotonda J, Nicholson DW, Fazil KM, Gallant M, Gareau Y, Labelle M, Peterson EP, Rasper DM, Ruel R, Vaillancourt JP, Thornberry NA, Becker JW. The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat Struct Biol*. **1996**, 3(7): 619-625
25. Kumar S, Lavin MF The ICE family of cysteine proteases as effectors of cell death. *Cell Death Differ*. **1996**, 3(3): 255-267
26. Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: Killer proteases. *Trends Biochem Sci*. **1997**, 22(8): 299-306.

27. Degterev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. *Oncogene*. **2003**, 22(53): 8543-8567
28. Irusta PM, Chen YB, Hardwick JM. Viral modulators of cell death provide new links to old pathways. *Curr Opin Cell Biol*. **2003**, 15(6): 700-705
29. LeBlanc AC. Natural cellular inhibitors of caspases. *Biol Psychiatry*. **2003**, 27(2): 215-229
30. Suzuki Y, Nakabayashi Y, Takahashi R. Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2001**, 98(15): 8662-8667
31. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. **2000**, 102(1): 33-42
32. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell*. **1997**, 88(3): 355-365
33. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*. **1998**, 281(5381): 1305-1308
34. Wallach D, Kovalenko AV, Varfolomeev EE, Boldin MP. Death-inducing functions of ligands of the tumor necrosis factor family: a Sanhedrin verdict. *Curr Opin Immunol*. **1998**, 10(3): 279-28
35. Hofmann K, Bucher P, Tschopp J. The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem Sci*. **1997**, 22(5): 155-156

36. Boldin MP, Varfolomeev EE, Pancer Z, Mett IL, Camonis JH, Wallach D. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem.* **1995**, 270(14): 7795-7798
37. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell.* **1995**, 81(4): 505-512
38. Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH, Peter ME. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J.* **1997**, 16(10): 2794-2804
39. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* **1995**, 14(22): 5579-5588
40. Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* **2000**, 10(9): 369-377
41. Tsujimoto Y. Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. *J Cell Physiol.* **2003**, 195(2): 158-167
42. Adams JM, Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci.* **2001**, 26(1): 61-66
43. Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science.* **2004**, 305(5684): 626-629

- 44.Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*. **1998**, 281(5381): 1309-1312
- 45.Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*. **1997**, 275 (5303): 1132-1136
- 46.Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*. **1997**, 275(5303): 1129-1132
- 47.Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*. **2000**, 102(1): 43-53
- 48.Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zuniga-Pflucker JC, Kroemer G, Penninger JM. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*. **2000**, 410(6828): 549-554
- 49.Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*. **1999**, 397(6718): 441-446
- 50.Parrish J, Li L, Klotz K, Ledwich D, Wang X, Xue D. Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*. *Nature*. **2001**, 412(6842): 90-94

51. Daugas E, Susin SA, Zamzami N, Ferri KF, Irinopoulou T, Larochette N, Prevost MC, Leber B, Andrews D, Penninger J, Kroemer G. Mitochondrial nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J.* **2000**, 14(5): 729-738
52. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature.* **1998**, 391(6662): 43-50
53. Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature.* **2001**, 412(6842): 95-99
54. Jiang X, Wang X. Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J Biol Chem.* **2000**, 275(40): 3199-3203
55. Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem.* **1999**, 274(17): 1549-1556
56. Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell.* **2002**, 9(3): 459-470
57. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* **1995**, 267(5203): 1456-1462
58. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* **2000**, 100(1): 57-70
59. Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science.* **1998**, 281(5381): 1317-1322

60. Cantley LC, Neel BG. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1999**, 96(8): 4240-4245
61. Hockenbery D, Nunez G, Millman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*. **1990**, 348(6299): 334-336
62. Reed JC. Bcl-2 family proteins. *Oncogene*. **1998**, 17(25): 3225-3236
63. Cummings J, Ward TH, Ranson M, Dive C. Apoptosis pathway targeted drugs from the bench to the clinic. *Biochim Biophys Acta*. **2004**, 1705(1): 53-66
64. Burgués J.P., Pontones J.L., Vera C.D., Jiménez J.F., Ozonas M. Mecanismos del ciclo celular y la apoptosis implicados en las resistencias a los fármacos de uso intravesical en el cáncer superficial de vejiga. *Actas Urol Esp* **2005**; 29, 9; 846-859
65. Mosquera J.M., Glados P. Farmacología Clínica para enfermería. 3era edición. Madrid-España. McGraw-Hill-Interamericana. **2005**.
66. Avendaño C. Introducción a la Química. 2da edición. Farmacéutica. Madrid-España. McGraw-Hill-Interamericana. **2001**.
67. Patiño J.F. Lecciones de Cirugía. Bogotá-Colombia. Editorial Médica Panamericana. **2000**.
68. Jju K W Kohn, J A Hartley, and W B Mattes. Mechanisms of DNA sequence selective alkylation of guanine-N7 positions by nitrogen mustards. *Nucleic Acids Res*. **1987** ,15;24; 10531–10549.

69. Inga A, Chen FX, Monti P, Aprile A, Campomenosi P, Menichini P, Ottaggio L, Viaggi S, Abbondandolo A, Gold B, Fronza G. N-(2-chloroethyl)-N-nitrosourea tethered to lexitropsin induces minor groove lesions at the p53 cDNA that are more cytotoxic than mutagenic. *Cancer Res.* **1999**, 3;689-95
70. Frankfurt OS. Inhibition of DNA repair and the enhancement of cytotoxicity of alkylating agents. *Int J Cancer.* **1991**, 48,6 ;916-23.
71. Becerril C, Ferrero M, Castaño A. Detection of mitomycin C in vitro effects by DNA fingerprinting on rainbow trout cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. Supplement.* **1997**, 379,1,125.
72. Lown W. Anthracycline and anthraquinone anticancer agents; Current status and recent developments. *Pharmacol Therapeut.* **1993**, 2; 185-214.
73. Delgado A, Minguillón C, Joglar J. Introducción a la química terapéutica. 2da edición. Ediciones Díaz De Santos. Madrid-España. **2008**.
74. Raviña E. Medicamentos. Un viaje a lo largo de la evolución histórica del descubrimiento de fármacos II. Universidade de Santiago de Compostela. España. **2008**.
75. Lobert S, Vulevic B, Correia J. Interaction of Vinca Alkaloids with Tubulin; A Comparison of Vinblastine, Vincristine, and Vinorelbine. *Biochemistry.* **1996**, 35, 6806-14.
76. Nogales E., Wolf S. G., Downing K. H. Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature.* **1998**, 391; 199-203.
77. Pommier Y. *Topoisomerase I inhibitors; camptothecins and beyond.* *Nature Reviews Cancer.* **2006**, 6; 789-802

78. Cortese F.; Bhattacharyya B., Wolff J. Podophyllotoxin as a Probe for the Colchicine Binding Site of Tubulin. **1977**, *J Biol Chem.* 252; 1134.

79. Nemeth JA, Yousif R, Herzog M, Che M, Upadhyay J. Matrix metalloproteinase activity, bone matrix turnover, and tumor cell proliferation in prostate cancer bone metastasis. *J Natl Cancer Insr.* **2002**, 94;17-25.

80. Battle R, Goggi J, Allen L, Barnett J, Morrison M. Monitoring Tumor Response to Antiangiogenic Sunitinib Therapy with ^{18}F -Fluciclatide, an ^{18}F -Labeled $\alpha_v\beta_3$ -Integrin and $\alpha_v\beta_5$ -Integrin Imaging Agent. *J Nucl Med.* **2011**, 52 ; 3; 424-30.

81. Monahan M. K., Sibley R., Natero R., Dumas J., Bankston D., Riedl B. A scaleable synthesis of BAY 43-9006; A potent Raf kinase inhibitor for the treatment of cancer. *Org Process Res Dev.* **2002**, 6; 777.

82. Woon S-T, Zwain S, Schooltink M. A., Newth A. L., Baguley B. C., Ching L-M. NF- κ B activation in vivo in both host and tumor cells by the antivascular agent, 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid (DMXAA). *Eur J Cancer.* **2003**, 39;1176-1183.

83. Chaplin D, Hill S. The development of combretastatin A4 phosphate as a vascular targeting agent. *J Rad Oncol Biol Phys.* **2002**, 54(5);1491-1496.

84. Hastie, S.B. Interactions of colchicine with tubulin. *Pharmacol Ther.* **1991**, 51, 377-401.

85. Lin C.M., Singh S. B., Chu P. S., Dempsy R. O., Schmidt J. M., Pettit G. R., Hamel, E. Interaction of tubulin with potent natural and synthetic analogues of

the antimetabolic agent combretastatin, a structure-activity study. *Mol Pharmacol*. **1988**, 34, 200-208.

86.Arora A, Scholar E.M. Role of Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer Therapy. *J Pharmacol Exp therap*. **2005**, 315; 971-79.

87.Khöler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. **1975**, 256, 495 –97.

88.Takács L, Vázquez A, Ellior E. Therapeutic monoclonal antibodies; History, Facts and Trends en; Doherty A.M. *Annual Reports in Medicinal Chemistry*. Academic Press. **2001**,36; 237-46.

89.U.S. Food and Drug Administration. Guidance for industry-FDA.gov. Actualizado.4 de noviembre 2009- Consultado en diciembre de 2010. Disponible en;www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM192750.pdf.

90.Pérez H. La malaria por Plasmodium Vivax (Grassi y Feletti, 1890) en los trópicos y los retos de la cura radical. *Scielo*. **2004**, INCI (29); 9.

91.Wellems TE. Plasmodium chloroquine resistance and the search for a replacement antimalarial drug. *Science*. **2002**, 298 (5591); 124-6.

92.World Health Organization. Guidelines for the Treatment of Malaria. 2^{ed} edition. **2010**.

93.Pérez H. La malaria por Plasmodium Vivax (Grassi y Feletti, 1890) en los trópicos y los retos de la cura radical. *Scielo*. **2004**, INCI (29); 9.

94.Antinori S, Galimberti L, Milazzo L, Corbellino M. Biology of human malaria plasmodia including *Plasmodium knowlesi*. *Mediterr J. Hematol Infet*. **2012**,4 (1):e2012013. doi: 10.4084/MJHID.2012.013

95. Guerrant R. Enfermedades infecciosas tropicales. Madrid-España. Ediciones Harcourt. **2002**.

96. Organización Mundial de la Salud (OMS). Informe mundial sobre el Paludismo 2012. [Acceso en agosto de 2013] USA. Disponible en; <http://www.who.int/malaria/publications/>.

97. Ministerio del Poder Popular para la Salud. Boletín epidemiológico. Semana epidemiológica N°47. Año de la edición LXII. **2013**, 17-21.

98. Hay SI, Guerra CA, Gething PW, Patil AP, Tatem AJ, Noor AM, Kabaria CW, Manh BH, Elyazar IR, Brooker S, Smith DL, Moyeed RA, Snow RM. A world malaria map; *Plasmodium falciparum* endemicity in 2007. *Plos Med.* **2009**, 24, 6 (3);e1000048.

99. González D. Nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de la malaria. *Enf Emerg.* **2005**, 7(1);40-43.

100. Vargas, J. Prevención y control de la Malaria y otras enfermedades transmitidas por vectores en el Perú. *Rev. Peruana de Epidemiologia.* **2003**, 11:1;110-120.

101. Alelio M, Bybjerg S, Breman I.C. Are Multilateral Malaria Research. And Control Programs the Most Successful? Lesson from the Past 100 Years in Africa. *Am J Trop. Med Hyg.* **2004**, 71, 268-278.

102. Valero M.V, Amador R, Aponte JJ, Narvaez A, Galindo C, Silva Y, Rosas J, Guzman F, Patarroyo M. Evaluation of SPf66 malaria vaccine during a 22 month follow-up field trial in the Pacific coast of Colombia. *Vacc.* **1996**, 14(15), 1466-1470.

103. Alonso PL, Sacarlal J, Aponte JJ, Leach A, Macete E, Milman J, Mandomando I, Spiessens B, Guinovart C, Espasa M, Bassat Q, Aide P, Ofori-Anyinam O, Navia MM, Corachan S, Ceuppens M, Dubois MC, Demoitie MA, Dubovsky F, Menendez C, Tornieporth N, Ballou WR, Thompson R, Cohen J. Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against Plasmodium falciparum infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet* **2004**,364:1411-20
104. Seder R, Chang L, Enama M, Zephir K, Sarwar U, Gordon I, Holman L, James E, Billinslev P. Protection Against Malaria by Intravenous Immunization with a Nonreplicating Sporozoite Vaccine. *Science*. **2013**, 34 (6152) 1359-1365
105. Hoffman S.L, Subramanian G.M., Collins F, Venter J.C. Plasmodium Human and Anopheles Genomics and malaria. *Nature*. **2002**, 415, 702-709.
106. Tiley L, Loria P, Miller S, Foley M. Inhibition of the peroxidative degradation of haem as the basis of action of chloroquine and other quinoline antimalarials. *Biochem J*. **1999**, 339; 363-30.
107. Wellems TE. Malaria. How chloroquine Works. *Nature*. **1992**, 355(6356);108-109.
108. Tracy JW, Wester LT. Chemotherapy of parasitic infections. En; Goodman and Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics. New York; McGraw-Hill, **1995**.
109. Silamut K, Molunto P, Ho M, Davis TME, White NJ. α -acid glycoprotein (orosomocoid) and plasma protein binding of quinine in *falciparum* malaria. *Br J Clin Pharmacol*. **1991**, (32); 311-315.

110.Bzik DJ, Li WB, Horii T, Inselburg J. Molecular cloning and sequence analysis of the *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. **1987**, 84(23) 8360.

111.Sibley CH, Hyde JE, Sims PF, Plowe CV, Kublin JG, Mberu EK. Pyrimethamine sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*; what next? *Trends Parasitol*. **2001**, 17(12); 582-8.

112.Efferth T. Willmar Schwabe Award 2006; Antiplasmodial and Antitumor Activity of Artemisinin-From Bench to Bedside. New York. *Planta Med*. **2007**, 73; 299-309.

113.Borstnik K, Paid IH, Shapiro TA, Posner GH. Antimalarial chemotherapeutic peroxides; artemisinin, yingzhaosu A and relative compounds. *Int J Parasitol*. **2002**, 432 (13);1661-7.

114.Kremsner P, Krishna, S. Antimalarial Combinations. *Lancet*. **2004**, 364:285-294

115.Faye B, Ndiaye D, Ndiaye J, Dieng Y, Faye O. Efficacy and Tolerability of four antimalarials combinations in the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Senegal. *J Malaria*. **2007**,6(80) 1-9

116.Ashley E., McGready R., Hutagalung R, Phaiphun L, Slight T., Proux S A randomized, controlled study of a simple, once-daily regimen of dihydroartemisine-piperaquine for the treatment of uncomplicated, multidrug resistant *falciparum* malaria. *Aclin infect diseases*. **2005**, 41. 425-432

117.Sowunmi A. A randomized comparison of chloroquine, amodiaquine and their combination with pyrimethamine-sulfadoxine in the treatment of acute,

uncomplicated, *Plasmodium falciparum* malaria in children. *Annals Trop Med Parasito.* **2002**, 96(3):227-38.

118. Talisuma A, Bloland P, D'Álessandro. History, Dynamics and public Health Importance of Malaria parasite Resistance. *Clin. Microbiol Rev.* **2004**, 17 (1): 2.

119. Camacho J, Ferrer R, Maldonado A, Navarro M. Química de coordinación como un arma para el desarrollo de potenciales drogas antimaláricas. Estudio de los posibles mecanismos de acción. *Rev Facultad de Farmacia.* **2005**, 68; 27-37.

120. Vennerstrom JL, Arbe-Barnes S, Brun R, Charman SA, Chiu FC, Chollet J. Identification of an antimalarial synthetic trioxolane drug development candidate. *Nature.* **2004**, 430(7002);900-4.

121. Wu X, Tiekink E, Kostetshi I, Kocherginsky N, Tan A, Khoo S, Wilairat P, Go M. Antiplasmodial activity of ferrocenyl chalcones: Investigations into the role of ferrocene. *Eur Jour Pharm Sci.* **2006**, 27;175-187.

122. Jasinski P, Welsh B, Galvez J, Land D, Zwolak P, Ghandi L, Terai K, Dudek AZ. A novel quinoline, MT477; suppresses cell signaling through Ras molecular pathway, inhibits PKC activity, and demonstrates in vivo anti-tumor activity against human carcinoma cell lines. *Invest New Drugs.* **2008**, 3 ;223-32.

123. Santelli –Rouvier C, Pradines B, Berthelot M, Parzy D, Barbe J. Arylsulfonyl acridinyl derivatives; activity on *Plasmodium falciparum*. *Eur J Med. Chem.* **2004**, 39, 735-744.

124. Martirosyan A, Rahim-Bata R, Freeman. A, Clarke. Ch, Howard. R. Differentiation-inducing quinolines as experimental breast cancer agent in the

MCF-7 human breast cancer cell model. *Biochem Pharmacol.* **2004**, 68 1729-1738.

125. Shi Aibin, Nguyen Thu A., Battina. Srinivas K., Rana. Sandeep, Takemoto Dolores, Chiang. Peter and Hua. Duy. Synthesis and anti-breast cancer activities of substituted quinolines. *Bioorg Med Chem Lett.* **2008**, 18, 3364-3368.

126. Mól W, Matyja M, Filip B, Wietrzyk J, Boryczka S. Synthesis and antiproliferative activity *in vitro* of novel (2-butynyl)thioquinolines; *Bioorg Med Chem.* **2008**, 1;16(17);8136-41.

127. Isaacs J, Pili R, Qian D, Dalrymple S, Garrison J, Kyprianou N, Björk A, Olsson A, Leanderson T. Identification of ABR-215050 as lead second generation quinoline-3-carboxamide anti-angiogenic agent for the treatment of prostate cancer. *Prostate.* **2006**, 66; 1768–1778.

128. Ferrer R. Síntesis y Caracterización de derivados 4-sulfanilvinilquinolinas y un análogo de azetobenzazepina. Evaluación de la actividad antimalárica y citotóxica. [Tesis Doctoral]. Caracas-Venezuela. Universidad Central de Venezuela. **2007**.

129. Rodrigues JR, Abramjuk C, Charris J, Ferrer R, Gamboa N, Ángel J, Nitzsche B, Hopfner M, Lein M, Jung K. Effect of Quinoliny Thio Acrylate Derivatives on Prostate Cancer *in vitro* and *in vivo*. *Invest New Drugs.* **2012**, 30:1426-1433.

130. Ferrer R, Lobo G, Gamboa N, Rodrigues J, Abramjuk C, Jung K, Lein M, Charris J. Synthesis of [(7-Chloroquinolin-4-yl)amino]chalcones; Potential Antimalarial and Anticancer Agents. **2009**, *Sci Pharm.* 77; 725–741.

131. Arafa R, Hegazy G, Piazza G, Abadi A. Synthesis and *in vitro* antiproliferative effect of novel quinoline-based potencial anticancer agents. *Eur. J Med Chem.* **2013**, 63;826-832.

- 132.Boiani, M.; González, M. Imidazole and Benzimidazole Derivatives as Chemotherapeutic Agents. *Mini-Rev Med Chem* .**2005**, 5, 409.
- 133.Cho Y, Loerger T.R., Sacchettini J. C. Discovery of novel nitrobenzothiazole inhibitors for Mycobacterium tuberculosis ATP phosphoribosyl transferase (HisG) through virtual screening. *J Med Chem*. **2008**, 51, 5984.
- 134.Kim P, Kang S, Boshoff HI, Jiricek J, Collins M, Singh R, Manjunatha UH, Niyomrattanakit P, Zhang L, Goodwin M, Dick T, Keller TH, Dowd CS, Barry CE. Structure-activity relationships of antitubercular nitroimidazoles. 2. Determinants of aerobic activity and quantitative structure-relationships. *J Med Chem*. **2009**, 52(5);1329-44.
- 135.Hranjec M, Starcević K, Piantanida I, Kralj M, Marjanović M, Hasani M, Westman G, Karminski-Zamola G. Synthesis, antitumor evaluation and DNA binding studies of novel amidino-benzimidazolyl substituted derivatives of furyl-phenyl- and thienyl-phenyl-acrylates, naphthofurans and naphthothiophenes. *J Med Chem*. **2010**,53(6);2418-32.
- 136.Racané L, Tralić-Kulenović V, Kraljević Pavelić S, Ratkaj I, Peixoto P, Nhili R, Depauw S, Hildebrand MP, David-Cordonnier MH, Pavelić K, Karminski-Zamola G. Novel diamidino-substituted derivatives of phenyl benzothiazolyl and dibenzothiazolyl furans and thiophenes; synthesis, antiproliferative and DNA binding properties. *J Med Chem*. **2010**,53, 2418–2432.
- 137.Gowda N.R, Nanjunda S, Kumar C.S, Kumar y.c, Yip G, Rangappa K.S.Synthesis, characterization and evaluation of benzimidazole derivative and its precursors as inhibitors of MDA-MB-231 breast cancer cell proliferation. *Bioorg Med Chem*. **2008**,18 (1);432-435.
- 138.Camacho J, Barazarte A, Gamboa N, Rodrigues J, Rojas R, Vaisberg A,Gilman R, Charris J.Synthesis and biological evaluation of benzimidazole-5-

carbohydrazide derivatives as antimalarial, cytotoxic and antitubercular agents. *Bioorg Med Chem.* **2011**,19; 2023-2029.

139.Camacho J. Síntesis de 5-nitrofuranos y tiofenos relacionados, como agentes antimalaricos.[Tesis Doctoral]. Caracas-Venezuela. Universidad Central de Venezuela. **2008**.

140.Rodrigues J, Charris J, Camacho J, Barazarte A, Gamboa N, Antunes F. Citotoxic effects of N'-formyl-2-(5-nitrothiofen-2-yl)benzothiazole-6-carbohydrazide in Human Breast Tumor Cells by Induction of Oxidative Stress. *Anticancer Research.* **2012**, 32;2721-2726.

141.Rodrigues J, Charris J, Camacho J, Barazarte A, Gamboa N, Nitzsdu B, Höpfner M, Lein M, Jung K, Abramjuk C. As a potencial antitumour agent for prostate cancer in experimental studies. *Pharmacol.* **2012**, 65;411-422.

142.Gowda T, Kavitha C.V. Chiruvella K, Joy O, Raghavan S. Synthesis and biological evaluation of novel 1-(4-methoxyphenethyl)-1H-benzimidazole-5-carboxylic acid derivatives and their precursors as antileukemic agents. *Bioorg Med Chem.* **2009**, 19;4594-4600.

143.Noolvi M, Patel H, Kamboj S, Kaur A, Mann V. 2,6-Disubstituted imidazol[2,1-b][1,3,4]thiadiazoles: search for anticancer agents. *Eur J Med Chem.* **2012**, 56;56-59.

144.Alka S, Vijay L, Kamaldeep P. Synthesis, single crystal and antitumor activities of benzimidazole-quinazoline hybrids. *Bioorg Med Chem.* **2013**, 23, 3288-3294.

145.Baelmans R, Deharo E, Muñoz V, Sauvain M, Ginsburg T. Experimental conditions for testing the inhibitory activity of chloroquine on the formation of β -hematin. *H. Expe Parasitol.* **2000**, 96; 243-248.

146.Peters W, Robinson BL. Parasitic Infection Models. In handbook of Antimalarial Models of Infection, Zak, O., Sande, M., Eds; Academic Press: London. **1999**, 757.

147.Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. **1983**, 65-55.

148.Callacondo-Riva D. Quispe-Mauricio A, Lindo –Gamarra S, Vaisberg A.J. Actividad citotóxica del extracto de *Gnaphalium spicatum* “Keto Keto” en cultivos de líneas celulares tumorales humanas. *Rev Perú Med Exp Salud Pública*. **2008**, 25;380-385.

149.Nantasenamat C, Tantimongvolwat T, Naema T, Isarankura-Na-Ayudhya C, Prachayasittikul V. Prediction of selectivity index of pentachlorophenol-imprinted polymers. *EXCLI J*. **2006**, 5;150-163.

150.Lugli E, Troiano L, Ferraresi R, Roat E, Prada N, Nasi M. Characterization of cells with different mitochondrial membrane potential during apoptosis. *Cytometry A*. **2005**, 68;28-35.

151.Lee T- J., Kim O.H, Kim Y.H, Lim J.H, Kim S, Park J.W. Quercetin arrest G2/m phase and induces caspase-dependent cell death in U937 cells. *Cancer Lett*. **2006**, 240;234-242.

152.Janssen, A.M., Scheffer, J.J.C., Baerheim Svendsen, A. Antimicrobial Activity of Essential Oils: A 1976-1986 Review. Aspects of Tests Methods. *Planta Medica*. **1987**, 53; 395-398.

153.Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Vol. 3, Appendix A, pp A.1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd. Edition, New York, **1989**.

154.Perez C, Daniel K.B, Cohen S. Evaluating Prodrug Strategies for Esterase-Triggered Release of Alcohols. *Chem Med Chem.* **2013**, 8;1662-1667.

155.Valentino S. Prodrugs:Some thoughts and current issues. *J Pharm Sci.* **2010**, 12;4755-4765.

156.Marcano D, Cortés L. Química Orgánica 2da Edición. Ediciones del Vicerrectorado académico CODEPRE-Universidad de los Andes. Mérida-Venezuela. **2004**.

157.Steglich M, Neises B. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. *Chem Int.* **1978**, 17, 522-524

158.Lorenzo M, Guzmán W, Márquez C. Potenciales antimicrobianos. 2. Síntesis de 1-bencil-3-carboetoxi-2-quinolonas. *ACV.* **2002**, 53(2); 119-123.

159.Nguyen T.B, Ermolenko L, Dean W.A, Al-Mourabit A. The use of elemental sulfur as traceless oxidizing agent enables a remarkably simple solvent-free and catalyst-free synthesis of benzazoles from alkylamines and *o*-hydroxy/amino/mercaptan anilines. *Org Lett.*, **2012**, 14; 5948-5951.

160.The reaction of *ortho*-substituted anilines with functionalized orthoesters yields benzoxazole, benzothiazole, and benzimidazole derivatives in an efficient and connective methodology. The versatility of this approach enables the development of new libraries of heterocycles containing multifunctional sites. G. Bastug, C. Eviolitte, I. E. Markó. *Org Lett.*, **2012**, 14;3502-3505.

161. Caron S, Jones B. P., Wei L. The preparation of benzimidazoles and imidazopyridines proceeds smoothly under mild conditions in isopropyl alcohol at 70°C using 2,2,2-trichloroethyl imidates as the acylating agents. Addition of sodium acetate proved to be beneficial in cases where cyclization proceeded slowly. For substrates with poor nucleophilicity, using the more inert *tert*-amyl alcohol enabled superior reactions. *Synthesis*. **2012**, *44*; 3049-3054.

162. Ryabukhin S.V, Plaskon A. S., Volochnyuk D. M., Tolmachev A. A. A set of benzimidazoles, 3*H*-imidazo[4,5-*b*]pyridines, purines, xanthenes and benzothiazoles was readily prepared from (hetero)aromatic *ortho*-diamines or *ortho*-aminothiophenol and aldehydes using chlorotrimethylsilane in DMF as a promoter and water-acceptor agent, followed by oxidation with air oxygen. *Synthesis*. **2006**, 3715-3726.

163. Bahrami K, Khodaei M, Kaviani I. A simple and efficient procedure for the synthesis of substituted benzimidazoles through a one-pot condensation of *o*-phenylenediamines with aryl aldehydes in the presence of H₂O₂ and HCl in acetonitrile at room temperature features short reaction time, easy and quick isolation of the products, and excellent yields. *Synthesis*. **2007**, 417-427.

164. Beaulieu P. L, Haché B., von Moos E. Addition of oxone to a mixture of a 1,2-phenylenediamine and an aldehyde in wet DMF results in rapid formation of benzimidazoles under very mild conditions. Products are isolated in high purity in most cases by simple aqueous precipitation. The reaction is applicable to a wide range of substrates but does not allow the conversion of aldehydes that are sensitive to oxone under acidic reaction conditions. *Synthesis*. **2003**, 1683-1692.

165. Green M, Thorp D.M. The mechanism of reaction of phosphorus pentachloride and thionyl chloride with carboxylic esters. *J Chem Soc B*. **1967**, 1067-1068.

166.Furniss B.S, Hannaford A.J, Smith P.W.G, Tatchell A.R. Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry. 5th edition. Longman Scientific & Technical. New York. **1989**.

167. World Health Organization. Informe sobre las enfermedades infecto-contagiosas. 1999. [acceso diciembre de 2013] disponible en: <http://www.who.int/infectious-disease-report/idr99-spanish/pages/ch2text.html>.

168. Chu D, Plattner J, Chu L, Plattner J, Katz L. New Directions in Antibacterial Research. *J Med Chem.* **1996**, 39;3853-3874.

169. Beovic B. The issue of antimicrobial resistance in human medicine. *Int J Food Microbiol.* **2006**, 112, 280-287.

170. Finch R, Hunter P. Antibiotic resistance—action to promote new technologies: report of an EU Intergovernmental Conference held in Birmingham, UK, 12–13 December 2005. *J Antimicrob Chemoth.* **2006**, 58, i3-i22.

171. World Health Organization. Resistencia a los antimicrobianos (RAM). Nota descriptiva N° 194. **2011**.

172. Redasani V, Bari S. Synthesis and evaluation of mutual prodrugs of ibuprofen with menthol, thymol and eugenol. *Eur J Med Chem.* **2012**, 56;134-138.

173. Yang Y, Aloysius H, Inoyama D, Chen Y, Hu L. Enzyme-mediated hydrolytic activation of prodrugs. *Acta Pharmaceutica Sinica B.* **2011**, 1(3);143-159.

174. Nudelman A, Gnizi E, Katz Y, Azulai R, Chen-Ohana M, Zhuk R, Sampson S, Langzam L, Fibach E, Prus E, Pugach V, Rephaeli A. Prodrugs of butyric acid. Novel derivatives possessing increased aqueous solubility and potential for treating cancer and blood diseases. *Eur J Med Chem.* **2001**, 36;63-74.

175. Jain A, Gund M, Desai D, Borhade N, Senthilkumar S, Dhiman M, Mangu N, Mali S, Dubash N, Halder S, Satyam A. Mutual prodrugs containing bio-cleavable and drug releasable disulfide linkers. *Bioorg Chem.* **2013**, 49;40-48.

176. Liu C, Lin J, Everlof G, Gesenberg C, Zhang H, Marathe P, Maley M, Galella M, Mckinnon M, Dodd J, Barrisj J, Schieven G, Leftheris K. Synthesis and evaluation of carbamoylmethylene linked prodrugs of BMS-582949, a clinical p38 α inhibitor. *Bioorg Med Chem.* **2013**, 23;3028-3030.

177. Vale N, Nogueira F, Rosário V, Gomes P, Moreira R. Primaquine dipeptide derivatives bearing an imidazolidin-4-one moiety at the N-terminus as potential antimalarial prodrugs. *Eur J Med Chem.* **2009**, 44;2506-2516.

178. Lipinski C, Lombardo F, Dominy B, Feeney P. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Delivery Rev.* **2001**, 46;3-26.