

## **Síntesis y Actividad Antimalárica de Derivados 3-Cloro- 2N-Aminosustituido-1,4-Naftoquinona**

Synthesis and Antimalarial Activity of 3-Chloro-2N-  
Aminostituted-1, 4-Naphthoquinone Derivatives

**<sup>1</sup>Caritza León**

caritzal@yahoo.com.mx

**<sup>2</sup>José N. Domínguez**

jdomingu@cantv.net

**<sup>1</sup>Danelis Rojas**

**<sup>3</sup>Juan Rodríguez**

**<sup>3</sup>Neira Gamboa de Domínguez**

gamboan@camelot.rect.ucv.ve

**<sup>4</sup>Jiri Gut y <sup>4</sup>Philip Rosenthal**

rosnthl@itsa.ucsf.edu

**<sup>1</sup>Luis Vásquez**

luisjavierv@hotmail.com

<sup>1</sup>Universidad Pedagógica Experimental Libertador.

Instituto Pedagógico de Caracas, ,

<sup>2</sup>Universidad Central de Venezuela,

<sup>3</sup>Universidad Central de Venezuela. Unidad de Bioquímica. Facultad de Farmacia,

<sup>4</sup>Department of Medicine, San Francisco General Hospital,

University of California, San Francisco,

### **RESUMEN**

*Se describe la síntesis de derivados de las 3-cloro-2N-[1'-alquil-1'-(4"-clorofenilcarbamoil)metil]amino-1,4-naftoquinonas. Los nuevos compuestos sintetizados fueron caracterizados a través de técnicas espectroscópicas como IR, <sup>1</sup>H RMN, <sup>13</sup>C RMN y Espectrometría de Masas. La evaluación biológica de los compuestos obtenidos, fue hecha usando la inhibición de la formación de la beta hematina in vitro y la inhibición del*

desarrollo de cultivos de *P.falciparum*. El compuesto 3-cloro-2N-[1'-metil-1'-(4"-clorofenilcarbamoil)metil]amino-1,4-nafto quinona 15 resultó ser el más activo en inhibir el desarrollo de los cultivos de *P. falciparum* con un  $CI_{50}$  1.92  $\mu$ M, mientras que el compuesto 3-cloro-2N-[1'-(fenilmetil)-1'-(4"-clorofenilcarbamoil)metil]amino-1,4-naftoquinona 17 fue el mejor inhibidor en la formación de la beta-hematina,  $CI_{50}$  de 6.07 mM. Estos estudios abren una nueva posibilidad para el desarrollo de 3-cloro-2N-aminosustituido-1,4-naftoquinonas como potenciales antimaláricos que puedan ejercer su blanco en la inhibición de la formación de la beta-hematina y en la inhibición del desarrollo parasitario en cultivos de *P. falciparum*, los cuales pudiesen ayudar a retrasar el rápido crecimiento de la resistencia. Estos compuestos representan una nueva familia de futuros compuestos antimaláricos.

**Palabras Claves:** Antimaláricos; naftoquinonas; aminoácidos; hemozoina

#### ABSTRACT

We described the synthesis of 3-chloro-2N-[1'-alkyl-1'-(4"-chlorophenylcarbamoil) methyl]amine-1,4-naphthoquinones derivatives. The new compounds were characterized through IR,  $^1H$  NMR,  $^{13}C$  NMR and Mass Spectrometry. The biological evaluation of these derivatives was carry out by inhibition of beta-hematin formation in vitro and the inhibition of cultured *P. falciparum* parasites. The most active compound resulted the 3-chloro-2N-[1'-methyl-1'-(4"-chlorophenylcarbamoil) methyl] amine-1,4-naphthoquinone 15,  $IC_{50}$  1.92  $\mu$ M, as an inhibitor in cultured *P. falciparum* parasites, while compound 3-chloro-2N-[1'-(phenylmethyl)-1'-(4"-chlorophenylcarbamoil) methyl]amine-1,4-naphthoquinone 17 was the best as inhibitor of beta-hematin formation with an  $IC_{50}$  of 6.07 mM. These studies open up the novel possibility of development of 3-chloro-2N-aminosubstituted-1,4-naftoquinonas derivatives as potentials antimalarials that target beta-hematin formation and the inhibition of the development of cultured *P. falciparum* parasites, which should help delay the rapid onset of resistance to drugs acting at only a single site. These compounds represent a new family of promising antimalarials.

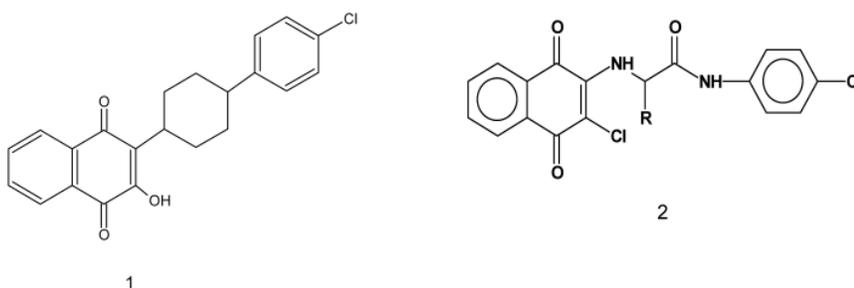
**Key words:** Antimalarial; naphthoquinones; amino acids; hemozoin.

## INTRODUCCIÓN

La malaria es una de las enfermedades parasitarias más seria y ampliamente distribuida en el mundo. Recientes estimaciones señalan que alrededor de 300 a 500 millones de personas se encuentran infectadas con parásitos del género *Plasmodium* (*falciparum*, *vivax*, *malariae* y *ovale*), con 2.3 millones de muertes por año. Después de la tuberculosis y el HIV la malaria representa la mayor amenaza de salud entre las enfermedades infecciosas (Trigg, y Kondrachine, 1998; World Health Organization, 1995; World Health Organization, 1999). La dificultad para erradicar al mosquito vector, así como el desarrollo de resistencia de los parásitos a las drogas antimaláricas comúnmente utilizadas, crean la urgente necesidad de desarrollar nuevas drogas que actúen con nuevos mecanismos de acción y que resulten más efectivas que las conocidas hasta ahora. Recientemente se ha reportado, entre otros, la síntesis y actividad biológica de algunos compuestos antimaláricos (Domínguez y otros, 2005a, 2005b). Sin embargo, se necesita un mayor número de drogas para sustituir los compuestos disponibles cuya eficacia está limitada por la resistencia.

En este sentido, las naftoquinonas se han convertido en los últimos años en un blanco importante de investigación dada su amplia variedad de actividades biológicas. Muchos de estos compuestos han resultado excelentes anticancerígenos (Bittner, Gorohovsky, Lozinsky y Shames, 2000) y algunos han sido útiles para el tratamiento de diversos parásitos en animales (Lazo y otros, 2001). Una serie de hidroxinaftoquinonas mostraron interesante actividad contra especies de *Plasmodium* (Hudson y otros, 1985), resultando de este trabajo el primer reporte de la Atovaquona **1** utilizada en el tratamiento de la malaria (Hudson, 1993). Otras investigaciones muestran la actividad antimalárica significativa de las naftoquinonas frente a *P. falciparum*, tanto *in vitro* como *in vivo* (Lin, Zhu, Xu, Divo y Sartorelli, 1991), y más recientemente, algunas pirazolil naftoquinonas han sido preparadas como agentes antimaláricos (Sperandeo y Brun, 2003).

Tomando como referencia estos antecedentes, nos hemos propuesto sintetizar compuestos del tipo 3-cloro-2N-[1'-alquil-1'-(4'-clorofenilcarbamoil) metil]amino-1,4-naftoquinonas **2** (figura 1) y evaluar posteriormente su actividad biológica como antimaláricos. Con este trabajo se buscan nuevas sustancias con potencial actividad antimalárica, así como contribuir con el desarrollo y fortalecimiento de la investigación que se realiza en nuestro país, como consecuencia del repunte alarmante de los casos de malaria que se han registrado en los últimos años. Finalmente, esta investigación permite la formación de nuevos recursos humanos, la interdisciplinariedad y el aprovechamiento del conocimiento científico para la búsqueda de soluciones a problemas de salud, que afectan no solo a nuestro país sino a otros a nivel mundial.



**Figura 1.** Estructura general de los derivados de las 1,4-naftoquinonas.

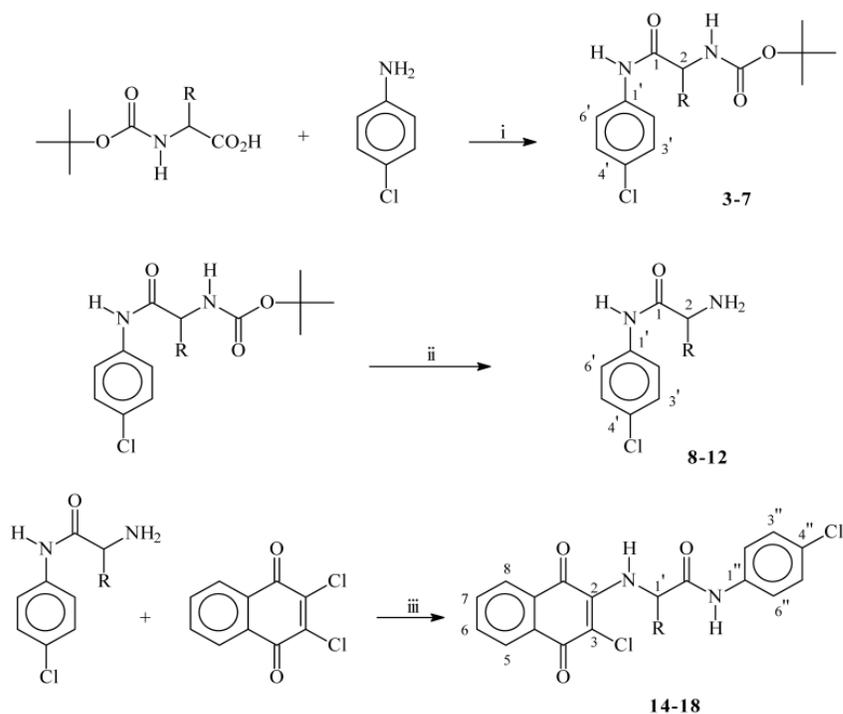


Figura 2. Esquema de síntesis de los derivados de las 1,4-naftoquinonas

## MÉTODOS

### Sección Química

Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato Thomas micro hot stage y no fueron corregidos. Los espectros IR fueron determinados como pastillas de KBr en un espectrofotómetro Shimadzu modelo 470 y están reportados en  $\text{cm}^{-1}$ . Los espectros de  $^1\text{H}$  RMN y  $^{13}\text{C}$  RMN fueron tomados en un espectrómetro JEOL GSX (270 MHz) y los desplazamientos químicos están expresados en  $\delta$  (ppm) respecto a tetrametilsilano (TMS). Los espectros de masas fueron obtenidos en

un espectrómetro modelo Varian CP3800 acoplado con un cromatógrafo de gases Saturn 2000/Gas Chromatograph ionization energy 70 eV, usando la técnica Chemical Ionization Mass Spectrometry (CIMS). Todos los solventes utilizados fueron secados y destilados bajo atmósfera de nitrógeno. La cromatografía en columna fue realizada sobre sílica gel 60 (70-230 mesh. Merck), para TLC se usaron placas de sílica gel 60, F<sub>254</sub> y visualizadas por luz UV.

*Procedimiento general para la síntesis de 2-alkil-2-terbutoxicarbonilamino-*p*-cloroacetanilidas 3-7*

Las 2-alkil-2-terbutoxicarbonilamino-*p*-cloroacetanilidas **3-7** fueron preparadas de acuerdo al procedimiento reportado en la literatura con algunas modificaciones (Bodanszky y Bodanszky, 1984). Se disuelven los aminoácidos protegidos (1mmol) en diclohexilcarbodiimida (DCC, 1mmol), diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 10 mL), se agita por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se agrega *p*-cloroanilina (1 mmol) y la mezcla de reacción se deja bajo agitación por 3-6 horas. El curso de la reacción se sigue por cromatografía de capa fina (TLC). Al finalizar la reacción la capa orgánica se deja secando con MgSO<sub>4</sub>. El filtrado obtenido se concentra a presión reducida. Los productos obtenidos bajo la forma de aceites fueron purificados por cromatografía en columna. Rendimientos entre 90-98%.

**2-isobutil-2-terbutoxicarbonilamino-*p*-cloroacetanilida (3)**

<sup>1</sup>HRMN (CDCl<sub>3</sub>) δ: 0.94 (d, 6H, CH<sub>3</sub>), 1.42 (s, 9H, tBOC), 1.55-1.67 (m, 2H, H<sub>3</sub>), 1.97-2.15 (m, 1H, H<sub>4</sub>), 6.67 (d, 1H, NHtBOC, *J* = 7.16 Hz), 7.21 (d, 2H, H<sub>3'-5'</sub>, *J* = 8.64 Hz), 7.42 (d, 2H, H<sub>2'-6'</sub>, *J* = 8.64 Hz), 8.55 (s, CONH); <sup>13</sup>CRMN (CDCl<sub>3</sub>) δ: 22.15 (C<sub>4</sub>), 23.27 (CH<sub>3</sub>), 29.71 (CH<sub>3</sub>,<sub>3</sub>), 35.81 (C<sub>3</sub>), 55.43 (C<sub>2</sub>), 81.28 (tBOC), 123.15 (C<sub>2'-6'</sub>), 130.76 (C<sub>3'-5'</sub>), 132.14 (C<sub>4</sub>), 137.44 (C<sub>1</sub>), 159.11 (COtBOC), 172.55 (CONH).

**2-metil-2-terbutoxicarbonilamino-p-cloroacetanilida (4)**

$^1\text{HRMN}$  ( $\text{DMSO}_{d6}$ )  $\delta$ : 1.24 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ ,  $J = 7.18$  Hz), 1.37 (s, 9H,  $t\text{BOC}$ ), 4.05-4.10 (m, 1H), 7.35 (d, 2H,  $\text{H}_{3-5}$ ,  $J = 8.88$  Hz), 5.56 (d, 1H,  $\text{NH}t\text{BOC}$ ,  $J = 7.91$  Hz), 7.62 (d, 2H,  $\text{H}_{2-6}$ ,  $J = 8.91$  Hz), 10.05 (s, CONH);  $^{13}\text{CRMN}$  ( $\text{DMSO}_{d6}$ )  $\delta$ : 21.33 ( $\text{CH}_3$ ), 29.12 ( $\text{CH}_3$ )<sub>3</sub>, 61.73 ( $\text{C}_2$ ), 79.91 ( $t\text{BOC}$ ), 121.89 ( $\text{C}_{2-6}$ ), 129.33 ( $\text{C}_{3-5}$ ), 132.76 ( $\text{C}_4$ ), 137.57 ( $\text{C}_1$ ), 159.02 ( $\text{CO}t\text{BOC}$ ), 172.86 (CONH).

**2-(1-hidroxietil)-2-terbutoxicarbonilamino-p-cloroacetanilida (5)**

$^1\text{HRMN}$  ( $\text{DMSO}_{d6}$ )  $\delta$ : 1.14 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ ,  $J = 7.63$  Hz), 1.42 (s, 9H,  $t\text{BOC}$ ), 3.94-4.10 (m, 1H,  $\text{H}_3$ ), 4.91-5.26 (m, 1H,  $\text{H}_2$ ), 5.54 (d, 1H,  $\text{NH}t\text{BOC}$ ,  $J = 7.42$  Hz), 6.38 (s, 1H, OH), 7.10 (d, 2H,  $\text{H}_{3-5}$ ,  $J = 7.91$  Hz), 7.62 (d, 2H,  $\text{H}_{2-6}$ ,  $J = 7.91$  Hz), 10.05 (s, CONH);  $^{13}\text{CRMN}$  ( $\text{DMSO}_{d6}$ )  $\delta$ : 21.89 ( $\text{CH}_3$ ), 29.27 ( $\text{CH}_3$ )<sub>3</sub>, 60.12 ( $\text{C}_2$ ), 66.33 ( $\text{C}_3$ ), 80.06 ( $t\text{BOC}$ ), 121.29 ( $\text{C}_{2-6}$ ), 127.54 ( $\text{C}_{3-5}$ ), 131.01 ( $\text{C}_4$ ), 136.73 ( $\text{C}_1$ ), 153.56 ( $\text{CO}t\text{BOC}$ ), 172.99 (CONH).

**2-(fenilmetil)-2-terbutoxicarbonilamino-p-cloroacetanilida (6)**

$^1\text{HRMN}$  ( $\text{DMSO}_{d6}$ )  $\delta$ : 1.29 (s, 9H,  $t\text{BOC}$ ), 2.3 (m, 2H,  $\text{H}_3$ ), 4.32-4.29 (m, 1H,  $\text{H}_2$ ), 5.59 (d, 1H,  $\text{NH}t\text{BOC}$ ,  $J = 7.64$  Hz), 7.06 (d, 2H,  $\text{H}_{3-5}$ ,  $J = 7.91$  Hz), 7.17 (t, 1H,  $\text{H}_{4'}$ ,  $J = 7.42$  Hz), 7.28 (d, 2H,  $\text{H}_{2-6'}$ ,  $J = 7.67$  Hz), 7.49 (d, 2H,  $\text{H}_{2-6}$ ,  $J = 7.91$  Hz), 7.60 (d, 2H,  $\text{H}_{3-5'}$ ,  $J = 7.70$  Hz), 10.19 (s, CONH);  $^{13}\text{CRMN}$  ( $\text{DMSO}_{d6}$ )  $\delta$ : 29.52 ( $\text{CH}_3$ )<sub>3</sub>, 38.41 ( $\text{C}_3$ ), 56.83 ( $\text{C}_2$ ), 80.17 ( $t\text{BOC}$ ), 121.23 ( $\text{C}_{2-6}$ ), 127.89 ( $\text{C}_{3-5}$ ), 128.11 ( $\text{C}_{2-6'}$ ), 128.32 ( $\text{C}_4'$ ), 129.98 ( $\text{C}_4$ ), 131.18 ( $\text{C}_{3-5'}$ ), 132.96 ( $\text{C}_1'$ ), 135.51 ( $\text{C}_1$ ), 153.77 ( $\text{CO}t\text{BOC}$ ), 172.02 (CONH).

**2-isopropil-2-terbutoxicarbonilamino-p-cloroacetanilida (7)**

$^1\text{HRMN}$  ( $\text{DMSO}_{d6}$ )  $\delta$ : 0.85-0.95 (m, 6H,  $\text{CH}_3$ ), 1.42 (s, 9H,  $t\text{BOC}$ ), 3.61-4.29 (m, 1H,  $\text{H}_2$ ), 5.43 (d,  $\text{NH}t\text{BOC}$ ,  $J = 7.54$  Hz), 7.03 (d, 2H,  $\text{H}_{3-5}$ ,  $J = 7.82$  Hz), 7.51 (d, 2H,  $\text{H}_{2-6}$ ,  $J = 7.81$  Hz), 10.11 (s, CONH);  $^{13}\text{CRMN}$  ( $\text{DMSO}_{d6}$ )  $\delta$ : 20.52 ( $\text{CH}_3$ ), 29.34 ( $\text{CH}_3$ )<sub>3</sub>, 29.86 ( $\text{C}_3$ ), 60.57 ( $\text{C}_2$ ), 79.68 ( $t\text{BOC}$ ), 121.59 ( $\text{C}_{2-6}$ ), 127.06 ( $\text{C}_{3-5}$ ), 128.74 ( $\text{C}_4$ ), 134.71 ( $\text{C}_1$ ), 152.93 ( $\text{CO}t\text{BOC}$ ), 171.99 (CONH).

**Procedimiento general para la síntesis de 2-amino-2-alkil-p-cloroacetanilidas 8-12**

Agregar a las 2-alkil-2-terbutoxicarbonilamino-p-cloroacetanilidas 3-7, 10 mL de ácido trifluoroacético al 55% en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, y dejar en agitación por 1 hora. Al finalizar la reacción se elimina el disolvente a presión reducida y el crudo se disuelve en 5 mL de acetato de etilo, y se lava luego con solución saturada de bicarbonato de sodio. Seguidamente se lava con solución saturada de NaCl, se seca con MgSO<sub>4</sub>, se filtra y se evapora a presión reducida.

**2-amino-2-isobutil-p-cloroacetanilida (8)**

<sup>1</sup>HRMN (DMSO<sub>d6</sub>) δ: 0.88 (d, 6H, CH<sub>3</sub>, J = 7.94 Hz); 1.41-1.51 (m, 2H, H<sub>3</sub>); 1.70 (m, 1H, H<sub>4</sub>); 3.71 (m, 1H, H<sub>2</sub>), 7.36 (d, 2H, H<sub>3'-5'</sub>, J = 8.83 Hz), 7.66 (d, 2H, H<sub>2'-6'</sub>, J = 8.84 Hz), <sup>13</sup>CRMN (DMSO<sub>d6</sub>) δ: 22.13 (CH<sub>3</sub>), 23.5 (C<sub>4</sub>), 44.20 (C<sub>3</sub>), 52.76 (C<sub>2</sub>), 120.45 (C<sub>2'-6'</sub>), 125.67 (C<sub>3'-5'</sub>), 129.39 (C<sub>4</sub>), 135.42 (C<sub>1</sub>), 172.99 (CONH).

**2-amino-2-metil-p-cloroacetanilida (9)**

<sup>1</sup>HRMN (DMSO<sub>d6</sub>) δ: 1.18 (d, 3H, CH<sub>3</sub>, J = 5.67 Hz); 3.86 (m, 1H, H<sub>2</sub>), 7.67 (d, 2H, H<sub>3'-5'</sub>, J = 8.67 Hz), 7.34 (d, 2H, H<sub>2'-6'</sub>, J = 8.67 Hz), <sup>13</sup>CRMN (DMSO<sub>d6</sub>) δ: 21.67 (CH<sub>3</sub>), 55.81 (C<sub>2</sub>), 121.22 (C<sub>2'-6'</sub>), 127.88 (C<sub>3'-5'</sub>), 129.55 (C<sub>4</sub>), 139.05 (C<sub>1</sub>), 173.03 (CONH).

**2-amino-2-(1-hidroxietil)-p-cloroacetanilida (10)**

<sup>1</sup>HRMN (DMSO<sub>d6</sub>) δ: 1.21 (d, 3H, CH<sub>3</sub>, J = 5.67 Hz); 4.21 (d, 1H, H<sub>2</sub>), 4.86 (m, 1H, H<sub>3</sub>), 7.17 (d, 2H, H<sub>3'-5'</sub>, J = 8.92 Hz), 7.29 (d, 2H, H<sub>2'-6'</sub>, J = 8.92 Hz), <sup>13</sup>CRMN (DMSO<sub>d6</sub>) δ: 21.22 (CH<sub>3</sub>), 60.35 (C<sub>2</sub>), 66.71 (C<sub>3</sub>), 121.83 (C<sub>2'-6'</sub>), 125.87 (C<sub>3'-5'</sub>), 129.10 (C<sub>4</sub>), 138.56 (C<sub>1</sub>), 172.52 (CONH).

**2-amino-2-(fenilmetil)-p-cloroacetanilida (11)**

$^1\text{HRMN}$  ( $\text{DMSO}_{d6}$ )  $\delta$ : 2.38-2.47 (m, 2H,  $\text{C}_3$ ), 4.15-5.64 (m, 1H,  $\text{H}_2$ ), 7.22 (d, 2H,  $\text{H}_{2'-6''}$ ,  $J = 7.43$  Hz); 7.31 (d, 2H,  $\text{H}_{3'-5'}$ ,  $J = 8.88$  Hz), 7.35 (t, 1H,  $\text{H}_4''$ ,  $J = 7.41$  Hz), 7.56 (d, 2H,  $\text{H}_{2'-6'}$ ,  $J = 8.88$  Hz); 7.63 (d, 2H,  $\text{H}_{3'-5''}$ ,  $J = 7.43$  Hz);  $^{13}\text{CRMN}$  ( $\text{DMSO}_{d6}$ )  $\delta$ : 32.23 ( $\text{C}_3$ ), 56.07 ( $\text{C}_2$ ), 121.34 ( $\text{C}_{2'-6'}$ ), 127.65 ( $\text{C}_{3'-5'}$ ), 128.99 ( $\text{C}_4'$ ), 129.05 ( $\text{C}_4''$ ), 130.79 ( $\text{C}_{2'-6''}$ ), 131.35 ( $\text{C}_{3'-5''}$ ), 135.62 ( $\text{C}_1''$ ), 138.22 ( $\text{C}_1'$ ), 173.19 (CONH).

**2-amino-2-isopropil-p-cloroacetanilida (12)**

$^1\text{HRMN}$  ( $\text{DMSO}_{d6}$ )  $\delta$ : 1.14 (d, 6H,  $\text{CH}_3$ ), 1.95 (m, 1H,  $\text{H}_3$ ), 3.98 (d, 1H,  $\text{H}_2$ ), 5.56 (d,  $\text{NH}_2$ ); 7.20 (d, 2H,  $\text{H}_{3'-5'}$ ,  $J = 7.82$  Hz), 7.41 (d, 2H,  $\text{H}_{2'-6'}$ ,  $J = 7.82$  Hz);  $^{13}\text{CRMN}$  ( $\text{DMSO}_{d6}$ )  $\delta$ : 19.23 ( $\text{CH}_3$ ), 30.95 ( $\text{C}_3$ ), 55.77 ( $\text{C}_2$ ), 120.96 ( $\text{C}_{2'-6'}$ ), 126.88 ( $\text{C}_{3'-5'}$ ), 128.57 ( $\text{C}_4'$ ), 137.11 ( $\text{C}_1'$ ), 172.37 (CONH).

**Procedimiento general para la síntesis de 3-cloro-2N-[1'-alquil-1'-(4"-clorofenilcarbamoil)metil]amino-1,4-naftoquinona 14-18**

A una solución de 2,3-dicloro-1,4-naftoquinona (1 mmol) disueltos en 10 mL de THF se agregó el derivado 2-amino-2-alquil-p-cloroacetanilida **8-12** (1 mmol) en presencia de trietilamina ( $\text{Et}_3\text{N}$ , 1 mmol). La mezcla de reacción se reflujo con agitación por 14-18 horas, la reacción fue seguida por TLC. Se evaporó el solvente a presión reducida, el aceite obtenido se extrajo con acetato de etilo (5 mL), se lavó con solución saturada de NaCl y la capa orgánica se dejó con  $\text{MgSO}_4$ . Se filtró y se evaporó a presión reducida para dar un producto semisólido, purificado por cromatografía en columna ( $\text{SiO}_2$ ), empleando mezcla acetato de etilo: hexano (1: 9 v/v), para dar los derivados **14**, **15** y **17**, y en el caso de los derivados **16** y **18** se utilizó la misma mezcla de solventes en proporción (2: 8 v/v).

**3-cloro-2N-[1'-isobutil-1'-(4"-clorofenilcarbamoil)metil]amino-1,4-naftoquinona (14)**

%R: 73; p.f. (°C): 162-164; IR (cm<sup>-1</sup>): 3312 (NH), 1670 (CO), 1597 (C=C Ar).

<sup>1</sup>HRMN (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.01 (d, 6H, CH<sub>3</sub>, *J* = 7.82 Hz), 1.51 (m, 1H, H<sub>3</sub>), 1.55-1.57 (m, 2H, H<sub>2</sub>; H<sub>2a</sub>), 4.98-5.01 (m, 1H, H<sub>1</sub>); 6.06 (d, NH, *J* = 8.18 Hz), 7.27 (d, 2H, H<sub>3''-5''</sub>, *J* = 8.10 Hz), 7.49 (d, 2H, H<sub>2''-6''</sub>, *J* = 8.11 Hz), 7.69 (t, 1H, H<sub>6</sub>, *J* = 7.91 Hz), 7.75 (t, 1H, H<sub>7</sub>, *J* = 7.91 Hz), 7.93 (s, CONH), 8.11 (dd, 1H, H<sub>5</sub>, *J*<sub>H5-H6</sub> = 7.88 Hz, *J*<sub>H5-H7</sub> = 1.21 Hz); 8.18 (dd, 1H, H<sub>8</sub>, *J*<sub>H8-H7</sub> = 7.88 Hz, *J*<sub>H8-H6</sub> = 1.20 Hz); <sup>13</sup>CRMN δ: 22.88 (CH<sub>3</sub>), 25.41 (C<sub>3</sub>), 44.01 (C<sub>2</sub>), 54.12 (C<sub>1</sub>), 112.33 (C<sub>3</sub>), 119.45 (C<sub>2''-6''</sub>), 123.48 (C<sub>3''-5''</sub>), 124.95 (C<sub>5</sub>), 128.03 (C<sub>6</sub>), 128.11 (C<sub>4''</sub>), 132.42 (C<sub>6</sub>), 134.55 (C<sub>7</sub>), 139.69 (C<sub>1''</sub>), 142.23 (C<sub>2</sub>), 170.19 (CONH), 174.05 (CO), 180.10 (CO); [M+1]: 432.

**3-cloro-2N-[1'-metil-1'-(4"-clorofenilcarbamoil)metil]amino-1,4-naftoquinona (15)**

%R: 61; p.f (°C): 206; IR (cm<sup>-1</sup>): 3328 (NH), 1674 (CO), 1597 (C=C Ar)

<sup>1</sup>HRMN (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 1.53 (d, 3H, CH<sub>3</sub>, *J* = 7.82 Hz), 5.14-4.5.19 (m, 1H, H<sub>1</sub>), 7.09 (s, NH), 7.38 (d, 2H, H<sub>3''-5''</sub>, *J* = 8.64 Hz), 7.62 (d, 2H, H<sub>2''-6''</sub>, *J* = 8.64 Hz); 7.71 (t, 1H, H<sub>6</sub>, *J* = 7.42 Hz), 7.78 (t, 1H, H<sub>7</sub>, *J* = 7.42 Hz), 7.98 (dd, 1H, H<sub>5</sub>, *J*<sub>H5-H6</sub> = 7.42 Hz, *J*<sub>H5-H7</sub> = 1.11 Hz); 8.14 (dd, 1H, H<sub>8</sub>, *J*<sub>H8-H7</sub> = 7.42 Hz, *J*<sub>H8-H6</sub> = 1.14 Hz), 10.09 (s, CONH); <sup>13</sup>CRMN δ: 21.63 (CH<sub>3</sub>), 53.20 (C<sub>1</sub>), 111.20 (C<sub>3</sub>), 121.68 (C<sub>2''-6''</sub>), 126.50 (C<sub>3''-5''</sub>), 127.20 (C<sub>8</sub>), 129.29 (C<sub>4''</sub>), 133.56 (C<sub>6</sub>), 135.60 (C<sub>7</sub>), 138.19 (C<sub>1''</sub>), 144.32 (C<sub>2</sub>), 166.88 (CONH), 171.29 (CO), 176.39 (CO); [M+1]: 390.

**3-cloro-2N-[1'-(1-hidroxietyl)-1'-(4"-clorofenilcarbamoil)metil]amino-1,4-naftoquinona (16)**

%R: 30; p.f (°C): 210; IR (cm<sup>-1</sup>): 3248 (NH), 1674 (CO), 1593 (C=C Ar).

<sup>1</sup>HRMN (Acetona-d<sub>6</sub>) δ: 1.28 (d, 3H, CH<sub>3</sub>), 4-09-4.11 (m, 1H, H<sub>2</sub>), 4.61 (d, 1H, H<sub>1</sub>), 7.23 (d, H<sub>3''-5''</sub>, *J* = 8,67 Hz), 7.37 (d, H<sub>2''-6''</sub>, *J* = 8,67 Hz), 7.70 (t, 1H, H<sub>6</sub>, *J* = 7.64 Hz), 7.80 (t, 1H, H<sub>7</sub>, *J* = 7.64 Hz), 7.92 (dd, 1H, H<sub>5</sub>, *J*<sub>H5-H6</sub>

= 7.61 Hz,  $J_{H5-H7} = 1.11$  Hz); 7.92 (s, 1H, OH), 8.10 (dd, 1H, H<sub>8</sub>,  $J_{H8-H7} = 7.61$  Hz,  $J_{H8-H6} = 1.14$  Hz), 8.60 (s, CONH); <sup>13</sup>CRMN δ: 19.99 (CH<sub>3</sub>), 55.61 (C<sub>1</sub>), 65.74 (C<sub>2</sub>), 109.32 (C<sub>3</sub>), 121.28 (C<sub>2''-6''</sub>), 126.67 (C<sub>3''-5''</sub>), 127.10 (C<sub>5</sub>), 128.37 (C<sub>8</sub>), 129.02 (C<sub>4</sub>), 133.85 (C<sub>6</sub>), 135.33 (C<sub>7</sub>), 138.64 (C<sub>1''</sub>), 142.25 (C<sub>2</sub>), 167.82 (CONH), 177.41 (CO), 180.68 (CO); [M+1]: 420.

**3-cloro-2N-[1'-(fenilmetil)-1'-(4''-clorofenilcarbamoil)metil]amino-1,4-naftoquinona (17)**

%R: 52; p.f (°C): 148-150; IR (cm<sup>-1</sup>): 3360 (NH), 1670 (CO), 1593 (C=C Ar).

<sup>1</sup>HRMN (Acetona<sub>d6</sub>) δ: 3.34 (d, 2H, H<sub>2</sub>,  $J = 7,18$  Hz), 4-96-5.13 (m, 1H, H<sub>1</sub>), 5.60 (d, NH,  $J = 7,54$  Hz), 7.14 (d, 2H, H<sub>3''-5''</sub>,  $J = 7,91$  Hz), 7.20 (t, 1H, H<sub>4''</sub>,  $J = 7,43$  Hz), 7.27 (d, 2H, H<sub>2''-6''</sub>,  $J = 7,91$  Hz), 7.32 (d, 2H, H<sub>3''-5''</sub>,  $J = 7,43$  Hz), 7.38 (d, 2H, H<sub>2''-6''</sub>,  $J = 7,43$  Hz), 7.68 (t, 1H, H<sub>6</sub>,  $J = 8,02$  Hz), 7.79 (t, 1H, H<sub>7</sub>,  $J = 8,02$  Hz), 7.94 (dd, 1H, H<sub>5</sub>,  $J_{H5-H6} = 8,02$  Hz,  $J_{H5-H7} = 1,11$  Hz); 8.10 (dd, 1H, H<sub>8</sub>,  $J_{H8-H7} = 8,02$  Hz,  $J_{H8-H6} = 1,10$  Hz), 9.60 (s, CONH); <sup>13</sup>CRMN δ: 40.71 (CH<sub>2</sub>), 58.44 (C<sub>1</sub>), 112.31 (C<sub>3</sub>), 121.36 (C<sub>2''-6''</sub>), 126.18 (C<sub>3''-5''</sub>), 126.67 (C<sub>5</sub>), 127.06 (C<sub>4''</sub>), 127.06 (C<sub>8</sub>), 128.47 (C<sub>4</sub>), 129.75 (C<sub>3''-5''</sub>), 132.91 (C<sub>6</sub>), 134.91 (C<sub>2''-6''</sub>), 135.01 (C<sub>7</sub>), 138.37 (C<sub>1''</sub>), 142.45 (C<sub>2</sub>), 165.17 (CONH), 172.33 (CO), 180.09 (CO); [M+1]: 466.

**3-cloro-2N-[1'-isopropil-1'-(4''-clorofenilcarbamoil)metil]amino-1,4-naftoquinona (18)**

%R: 56; p.f (°C): 92-94; IR (cm<sup>-1</sup>): 3312 (NH), 1664 (CO), 1606 (C=C Ar).

<sup>1</sup>HRMN (DMSO<sub>d6</sub>) δ: 0.97 (d, 6H, CH<sub>3</sub>,  $J = 7,19$  Hz), 1.03 (m, 1H, H<sub>2</sub>), 3.95 (d, 1H, H<sub>1</sub>), 7.40 (d, H<sub>3''-5''</sub>,  $J = 7,67$  Hz), 7.64 (d, H<sub>2''-6''</sub>,  $J = 7,67$  Hz), 7.70 (t, 1H, H<sub>6</sub>,  $J = 7,98$  Hz), 7.82 (t, 1H, H<sub>7</sub>,  $J = 7,98$  Hz), 7.96 (dd, 1H, H<sub>5</sub>,  $J_{H5-H6} = 7,98$  Hz,  $J_{H5-H7} = 1,11$  Hz); 8.02 (dd, 1H, H<sub>8</sub>,  $J_{H8-H7} = 7,98$  Hz,  $J_{H8-H6} = 1,10$  Hz), 10.40 (s, CONH); <sup>13</sup>CRMN δ: 18.45 (CH<sub>3</sub>), 33.23 (C<sub>2</sub>), 56.12 (C<sub>1</sub>), 111.31 (C<sub>3</sub>), 121.81 (C<sub>2''-6''</sub>), 125.53 (C<sub>3''-5''</sub>), 126.59 (C<sub>5</sub>), 127.27 (C<sub>8</sub>), 129.32 (C<sub>4''</sub>), 133.61 (C<sub>6</sub>), 135.77 (C<sub>7</sub>), 138.86 (C<sub>1''</sub>), 141.11 (C<sub>2</sub>), 169.55 (CONH), 173.88(CO), 178.11 (CO); [M+1]: 418.

## Sección Biológica

### ***Ensayo de Inhibición de la Formación de la Hemozoina.***

El ensayo de Inhibición de la Formación de la Hemozoina por los derivados en estudio fue determinado según el protocolo descrito por Deharo, Gautret, Muñoz y Sauvain (2000). Para ello, se preparó una solución de hemina (50  $\mu$ L, 4mM) en dimetilsulfóxido (DMSO, 5.2 mg/mL) y se distribuyó en una micro placa de cultivo de 96 pozos. Diferentes concentraciones de los compuestos (100-1 mM) disueltos en DMSO, fueron añadidas por triplicado en los pozos (50  $\mu$ L) con una concentración final de 2.5 mM – 1.25 mM. La formación de  $\beta$ -Hematina se inició por la adición de buffer de acetato (100  $\mu$ L, 0.2 M, pH 4.4). Los controles utilizados fueron cloroquina (2.5 mM – 1.25 mM, 50  $\mu$ L) y DMSO (50  $\mu$ L). La micro placa se incubó a 37 °C por 48 horas y se centrifugó a 4000 RPM x 15 minutos en una centrífuga de placas (IEC-CENTRA, MP4R). Después de descartar el sobrenadante, la micro placa se lavó dos veces con DMSO (200  $\mu$ L). El precipitado, se disolvió con NaOH (200  $\mu$ L, 0.2 N) y se diluyó en proporción 1:2 con NaOH (0.1 N) y se determinó la absorbancia a 405 nm (Microplate Reader, BIORAD-550). Los resultados fueron expresados como porcentaje de inhibición de la cristalización de la protoporfirina (FP). Los valores de concentración inhibitoria cincuenta ( $CI_{50}$ ) se determinaron gráficamente a partir de los porcentajes obtenidos vs. concentración de compuestos, utilizando GraphPad Prism 3.02. Los resultados se analizaron estadísticamente por medio de una prueba de T-student no pareada entre los grupos de ensayo, asumiendo un 95% de intervalo de confianza, de acuerdo a GraphPad Prism 3.02.

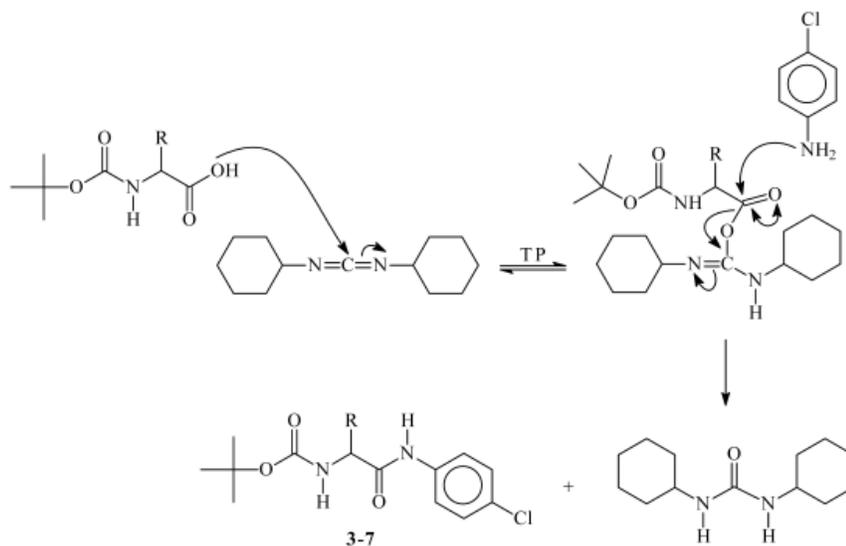
### ***Inhibición del desarrollo Parasitario por Citometría de Flujo.***

Los efectos de los compuestos sintetizados sobre el desarrollo parasitario se determinó como sigue: cultivos de *P. falciparum* de la cepa W2 sincronizados con sorbitol (0.1 %) se subcultivaron por 48 horas, bajo una atmósfera de O<sub>2</sub> : CO<sub>2</sub> : N<sub>2</sub> (3: 6: 91) en medio RPMI-

1640 suplementado con 10 % de suero humano y en presencia de los compuestos a evaluar, los cuales fueron añadidos a partir de soluciones madres 1000X preparadas en DMSO. Luego de 48 horas, se removió el medio de cultivo y éste fue reemplazado con formaldehído (1%) en PBS pH 7.4 por 48 horas adicionales a temperatura ambiente para fijar las células. Los parásitos fijados se transfirieron a una solución de Tritón-X-100 (0.1%) en PBS que contenía 1 nM del colorante YOYO-1 (sonda molecular). La parasitemia se determinó por medio de gráficos de fluorescencia obtenidos por citometría de flujo usando el software CellQuest (Beckton Dickinson). Los valores de  $CI_{50}$  para la inhibición del crecimiento parasitario se determinaron a partir de gráficos de porcentaje de parasitemia vs concentración de los compuestos, usando el software GraphPad Prism 3.02 (Reinders *et. al.*, 1995).

## RESULTADOS

La preparación de las 2-alkil-2-terbutoxicarbonilamino-*p*-cloroacetanilidas **3-7**, se realizó siguiendo un procedimiento similar al reportado en la literatura para la formación de péptidos (Bodanszky y Bodanszky, 1984). Disueltos en diclorometano los respectivos aminoácidos N-protegidos fueron activados para la sustitución nucleofílica haciéndolos reaccionar con diciclohexilcarbodiimida (DCC) y posteriormente acoplados con la *p*-cloroanilina (figura 3). La diciclohexilurea obtenida como producto secundario, fue separada, la solución orgánica fue evaporada y el aceite obtenido fue purificado mediante cromatografía de columna con rendimientos entre 90-98%. Los espectros de  $^1H$  RMN y  $^{13}C$  RMN mostraron todas las señales características para cada uno de los compuestos sintetizados.



**Figura 3.** Mecanismo de reacción propuesto para la activación de los aminoácidos N-protegidos con DCC.

En la segunda reacción de la secuencia sintética, las 2-amino-2-alkil-*p*-cloroacetanilidas **8-12** fueron obtenidas a partir de la remoción del grupo N-protector, terbutoxicarbonilo (*t*-BOC), empleando ácido trifluoroacético /  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  al 55%, con rendimientos generales entre 46-91%. La reacción de la 2,3-dicloro-1,4-naftoquinona con los productos intermediarios **8-12**, bajo condiciones de reflujo en THF con cantidades catalíticas de  $\text{Et}_3\text{N}$ , condujo a los productos **14-18**, los cuales fueron purificados a través de la técnica de cromatografía en columna, para finalmente ser caracterizados, a través de IR,  $^1\text{HRMN}$ ,  $^{13}\text{CRMN}$  y Espectrometría de Masas.

En todos los espectros de infrarrojo se observaron las bandas de las vibraciones de alargamiento NH entre 3248 y 3360  $\text{cm}^{-1}$ , así como las vibraciones de alargamiento CO correspondientes a los grupos carbonilos a 1664-1674  $\text{cm}^{-1}$ . Los espectros de  $^1\text{H}$  RMN mostraron las señales características de los protones aromáticos; los protones en  $\text{C}_{3''-5''}$

*Revista de Investigación* N° 64. 2008 202

aparecieron como dobletes centrados entre 7.14-7.40 ppm, mientras que los protones en C<sub>2''-6''</sub> aparecieron hacia campo más bajo como dobletes centrados entre 7.27-7.64 ppm. En los anillos de las naftoquinonas los protones se encontraron a campos más bajo que los protones aromáticos del anillo di-sustituido, y los protones en C<sub>6</sub> aparecieron como tripletes entre 7.68-7.71 ppm, mientras que los protones en C<sub>7</sub> se mostraron como tripletes hacia campo más bajo a 7.75-7.82 ppm. Los protones en C<sub>5</sub> y C<sub>8</sub> estuvieron respectivamente más desapantallados y aparecieron como dobletes de dobletes con constantes de acoplamiento *orto* y *meta* entre 7.92-8.11 ppm y 8.02-8.18 ppm.

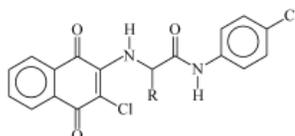
Para cada uno de los derivados de naftoquinonas, los espectros de <sup>13</sup>C RMN mostraron los desplazamientos químicos característicos de todos los carbonos, y en los espectros de masas también fueron observados los iones [M+1] correspondientes a cada compuesto. El patrón de fragmentación de las 3-cloro-2N-[1'-alquil-1'-(4''-clorofenilcarbamoil)metil]amino-1,4-naftoquinonas sintetizadas coincidió con el reportado en la literatura para este tipo de estructuras.

La evaluación de la actividad antimalárica de los derivados de 3-cloro-1,4-naftoquinonas **14-18**, se realizó mediante dos ensayos *in vitro*: (a) inhibición de la formación de la hemozoina y (b) inhibición del desarrollo parasitario por citometría de flujo. En su fase eritrocítica, los parásitos del género *Plasmodium* consumen la fracción proteica de la hemoglobina a través de un conjunto de proteasas (cisteínicas, aspártico y metalo proteasas) dejando libre por un lado a los grupos hemo y por otro a los aminoácidos (Goldberg, 1992; Francis, Sullivan y Goldberg, 1997). El grupo hemo es altamente oxidante para los parásitos, afectando principalmente a sus membranas, por ende, han desarrollado un mecanismo de detoxificación que lo cristaliza espontáneamente en las condiciones acídicas de la vacuola digestiva bajo una forma inocua e insoluble, denominada Hemozoina (Orijh y Fitch, 1993; Olliaro, Cattani y Wirth, 1996); este fenómeno es indispensable para el crecimiento de estos parásitos. Por otra parte, el hemo presenta características espectrales infrarrojas idénticas a la de la β-Hematina, y se ha demostrado que la

Hemozoina es un cristal de unidades de hemo enlazadas a través de puentes entre el ión férrico central de un hemo y el grupo propionato carboxilato del próximo hemo y forman dímeros que se enlazan unos a otros mediante puentes de hidrógeno dando origen al cristal de la  $\beta$ -hematina (Bohle, Kosar y Madsen, 2002; Dorn *et. al.*, 1998; Slater, Swiggard, Orton, Flitter, y Goldberg, 1991). Sobre la base de este hecho se puede evaluar de una manera sencilla la actividad de las drogas sobre la formación de la  $\beta$ -Hematina, porción insoluble de la hemozoina. En consecuencia, aquellos compuestos que inhiban la cristalización del hemo, tal como la cloroquina, se consideran posibles antimaláricos (Baelmans, Deharo, Muñoz, Sauvain, Ginsburg, 2000).

De esta manera, para evaluar la posible actividad antimalárica de las 3-cloro-2N-[1'-alquil-1'-(4"-clorofenilcarbamoil)metil]amino-1,4-naftoquinona, se determinó la capacidad de estos compuestos en inhibir la cristalización del hemo. Los resultados demuestran que el compuesto **15** fue moderadamente activo inhibiendo este proceso mientras que el compuesto **17** fue tan activo como la cloroquina ( $p > 0.05$ ), resaltando la importancia en la sustitución por grupos metilo y, en especial, fenilmetilo en la inhibición de este proceso. De esto se desprende que la sustitución del núcleo de la naftoquinona con aminoácidos tal como fenilalanina puede mejorar la actividad biológica, alcanzando una  $CI_{50}$  de 6.07 mM (tabla 1).

**Tabla 1.** Actividad biológica *in vitro* de las 3-cloro-2N-[1'-alquil-1'-(4"-clorofenilcarbamoil)metil]amino-1,4-naftoquinonas ensayadas (**14-18**)



Compuesto	R	<sup>a</sup> Cl <sub>50</sub> (μM)	<sup>b</sup> (%)	<sup>c</sup> (Cl <sub>50</sub> , mM)
14	-CH <sub>2</sub> - CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	> 10	< 5	-
15	-CH <sub>3</sub>	1.92	48.9 ± 4.85	-
16	-CHOH-CH <sub>3</sub>	> 10	< 5	-
17	-CH <sub>2</sub> -(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> )	2.94	76.57 ± 5.96 *	6.07
18	-CH-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	> 10	< 5	-
CQ	-	0.059	84.16 ± 3.9	1.33
Leu	-	6.26	-	-
E-64	-	2.5	-	-

R: grupo sustituyente. a: inhibición del desarrollo parasitario por citometría de flujo; b: (%) inhibición de la formación de la hemozoina; c: Cl<sub>50</sub> de la inhibición de la formación de la hemozoina. Los resultados están expresados como la media ± EEM. \* p > 0.05 con respecto a la cloroquina. CQ= Cloroquina; Leu= Leupeptina

Por otra parte, al determinar la capacidad de los derivados de 3-cloro-1,4-naftoquinonas **15** y **17** como inhibidores de la proliferación parasitaria en cultivo, se pudo observar que estas mismas sustituciones fueron las más favorables alcanzando Cl<sub>50</sub> menores a 3 μM, siendo el compuesto **15** el más activo con una Cl<sub>50</sub> de 1.92 μM (tabla 1). Estos resultados sugieren que la actividad antimalárica de los dos compuestos en cultivo podría estar relacionada con la inhibición de la cristalización del hemo como su posible mecanismo de acción. Sin embargo, son necesarios estudios de actividad antimalárica en modelos *in vivo* y ensayos de toxicidad.

## CONCLUSIONES

Se sintetizó una nueva serie de derivados de las 3-cloro-2N-[1'-alquil-1'-(4"-clorofenilcarbamoil)metil]amino-1,4-naftoquinonas y se evaluó su actividad antimalárica *in vitro*. Los resultados encontrados en este trabajo señalan que el compuesto **17** fue un excelente inhibidor tanto en la formación de la beta hematina como del desarrollo de los cultivos de *P. falciparum*, con una  $CI_{50}$  de 6.07 mM y 2.94  $\mu$ M respectivamente; sin embargo, el derivado **15** se mostró como el más potente inhibidor del desarrollo parasitario con una  $CI_{50}$  de 1.92  $\mu$ M. Desafortunadamente, el resto de los compuestos mostraron poca habilidad para inhibir la cristalización del hemo y el desarrollo del cultivo de *P. falciparum*, lo cual sugiere que para la actividad biológica de los derivados de 3-cloro-1,4-naftoquinonas es indispensable la presencia de grupos metilo y fenilmetilo, correspondiente a los aminoácidos alanina y fenilalanina.

Por otra parte, la estrategia de síntesis seguida en esta investigación resultó conveniente para la obtención de nuevos derivados de las 3-cloro-1,4-naftoquinonas, en una secuencia de tres pasos, lo cual representa un aporte significativo en la obtención de productos de origen sintético.

Finalmente, los resultados indican que los derivados de las naftoquinonas siguen siendo un interesante blanco en la búsqueda de nuevas drogas antimaláricas, por lo que sugerimos continuar con la síntesis de otros derivados de las 3-cloro-1,4-naftoquinonas, empleando distintos aminoácidos y anilinas sustituidas.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) de la Universidad Central de Venezuela (Proyectos PG 0630-5126-2.003 y PG 0630-5125-2.003) y a la Universidad Pedagógica Experimental Libertador, Instituto Pedagógico de Caracas (Proyecto CICNAT 04-004).

## REFERENCIAS

- Baelmans R., Deharo E., Muñoz V., Sauvain M., Ginsburg H. (2000). Experimental conditions for testing the inhibitory activity of chloroquine on the formation of beta-hematin. *Exp Parasitol*, 4, 243-248.
- Bittner, S., Gorohovsky, S., Lozinsky, E. y Shames, A. (2000). EPR study of anion radicals of various N-quinonyl amino acids. *Amino Acids*. 19, 439-449.
- Bodanszky, M. y Bodanszky, A. (1984). *The Practice of Peptide Synthesis*. Alemania: Springer-Verlag.
- Bohle, D., Kosar, A., Madsen, S. (2002). Propionic acid side chain hydrogen bonding in the malaria pigment  $\beta$ -hematin. *Biochem Biophys Res Comm*. 294, 132–135.
- Deharo, E., Gautret, Ph., Muñoz, V. y Sauvain, M. (2000). *Técnicas de Laboratorio para la Selección de Sustancias Antimaláricas*. (1ª ed). Bolivia: CYTED-IRD.
- Domínguez, J., León, C., Rodrigues, J., Gamboa de Domínguez, N., Gut, J. y Rosenthal, Ph. (2005). Synthesis and antimalarial activity of sulfonamide chalcone derivatives. *II Farmaco*, 60, 307–311.
- Domínguez, J., León, C., Rodrigues, J., Gamboa de Domínguez, N., Gut, J. y Rosenthal, Ph. (2005). Synthesis and evaluation of new antimalarial phenylurenyl chalcone derivatives. *J. Med. Chem.*, 48, 3654-3658.
- Dorn, A., Vippagunta, S., Matilde, H., Bubendorf, A., Vennerstrom, J. y Ridley, R. (1998). An assessment of drug-haematin binding as a mechanism for inhibition of haematin polymerization by quinoline antimalarials. *Biochem. Pharm.* 55, 727-736.

- Francis, S., Sullivan, D. y Goldberg, D. (1997). Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Ann. Rev. Microbiol.* 51, 97-123.
- Goldberg, DE. (1992). Plasmodial hemoglobin degradation: and ordered pathway in a specialized organelle. *Infect Agents Dis.* 1, 207-211.
- Hudson, A., Randall, A., Fry, M., Ginger, C., Hill, B., Latter, V., McHardy, N. and Williams, R. (1985). Novel anti-malarial hydroxynaphthoquinones with potent broad spectrum anti-protozoal activity. *Parasitology*, 90, 45-55.
- Hudson, A. (1993). Atovaquone - a novel broad-spectrum anti-infective drug. *Parasitol. Today*, 9, 66-68.
- Lazo, J., Aslan, D., Southwick, E., Cooley, K., Ducruet, A., Joo, B., Vogt, A. and Wipf, P. (2001). Discovery and biological evaluation of a new family of potent inhibitors of the dual specificity protein phosphatase Cdc25. *J. Med. Chem.* 44, 4042-4049.
- Lin, T., Zhu, L., Xu, S., Divo, A. and Sartorelli, A. (1991). Synthesis and Antimalarial Activity of 2-Aziridinyl and 2,3-Bis(aziridinyl)-1,4-naphthoquinonyl sulfonate and acylate derivatives. *J. Med. Chem.* 34, 1634-1639.
- Olliaro, P., Cattani, J., Wirth, D. (1996). Malaria, the submerged. *JAMA.* 275, 230- 233.
- Orijh AU, Fitch CS. (1993). Hemozoin production by *Plasmodium falciparum*: variation with strain and exposure to chloroquine. *Biochim Biophys Acta.* 1157, 270-274.
- Reinders, P., Van Vianen, P., Van der Keur, M., Van Engen, A., Janse, C. Y Tanke H. (1995). Computer software for testing drug susceptibility of malaria parasites. *Cytometry*, 19, 273-281.

Slater, A., Swiggard, W., Orton, B., Flitter, W. y Goldberg, D. (1991). An iron-carboxylate bond links the heme units of malaria pigment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 325-329.

Sperandeo N. y Brun R. (2003). Synthesis and biological evaluation of pyrazolynaphthoquinones as new potential antiprotozoal and cytotoxic agents. *Chembiochem.* 4, 69-72.

Trigg, P. y Kondrachine, A. (1998). In *Malaria. Parasite biology, pathogenesis and protection*; Sherman, I.W., Ed; ASM Press: Washington DC, pp. 11-22.

World Health Organization (1999) *Report on Infectious Diseases*. Geneva: World Health Organization.

World Health Organization (1995) *Control of Tropical Diseases (CTD). Malaria Control*. Geneva: World Health Organization.