

## **NUEVOS PRODUCTOS DE ORIGEN NATURAL Y SINTÉTICO CON ACTIVIDAD ANTITUMORAL**



**Discurso leído por el Académico Electo**  
**Ilmo. Sr. D. ÁNGEL GUTIÉRREZ RAVELO**  
en el acto de su recepción el día 16 de diciembre de 2005

**Discurso de contestación**  
**por el Académico Numerario**  
**Excmo. Sr. D. ÁNGEL GUTIÉRREZ NAVARRO**  
**Rector Magfco. de la Universidad de La Laguna**

Excmo. Sr. Presidente  
Excmo. Sres. Académicos  
Señoras y Señores

En primer lugar quiero agradecer a los miembros de la Academia Canaria de Ciencias el honor que me han dispensado nombrándome miembro de la misma.

Deseo expresar mi gratitud a mis profesores. de D. Nacere Hayek y D. José Bretón, Y más tarde compañeros en la Universidad de La Laguna, por presentar mi candidatura. Intentaré con mi trabajo en esta prestigiosa institución hacerme valedor de este nombramiento.

Extiendo mi reconocimiento al Prof. Ángel M. Gutiérrez Navarro, por sus iniciativas en la Academia Canaria de Ciencias y por llevar a cabo mi presentación en este Acto. Además de coincidir en nombre, apellido y profesión hemos compartido muchos años en la ULL y una amistad franca, directa y leal.

Respetuosamente me dirijo a mi profesor el también Académico D. Agustín Arevalo que continúa siendo un ejemplo de dedicación y magisterio.

Mi gratitud para los profesores y compañeros el Académico Dr. Francisco García Montelongo, con el que me inicié en las labores de investigación, en aquellos momentos compartí espacios con D. Jorge Fuentes Duchemin, cuya amistad valoré y valoro sobremanera. No quiero olvidar a D. B. Manuel Fraga, compañero de carrera y codirector de tesis.

Gracias a todos aquellos alumnos y compañeros, de los que tanto he aprendido, los que me acompañan en mi actual grupo de trabajo; los Dres. Ana Estévez, Rafael Zarate, José Juan Marrero, Elisa Pérez y los licenciados Dulce Mesa, Nabil el Jaber, Sandra Jiménez, Juan Carlos Cedrón, Fátima Gutiérrez, Gabriela Borges, Elena Cequier, Daniel García, la administrativa María de Juan y el técnico Gregorio Roig.

Mención especial al Prof. A. González que con su inteligencia, dedicación, indesmayable entusiasmo, ilusión y optimismo frente a los problemas ha sido una de las personas en la que he querido mirarme como ejemplo inalcanzable.

La ULL, el Instituto de Bio-Orgánica y el Departamento de Química Orgánica me han generado un agradable ambiente de trabajo y me he sentido afortunado de tener excelentes compañeros, técnicos y administrativos. Sin estos factores hubiera sido imposible llevar a cabo mi investigación, mi puerta al día. Sólo me basta mirar cómo, dónde y con que empecé y ver la situación en la que me encuentro en este momento.

No quiero terminar esta parte de mi intervención sin nombrar a mi familia por su ayuda y apoyo constante; a mis padres, a Ninona, mi mujer y a mis cuatro hijos Tomás, Cristina, Adrián y Ana, indispensables en esta aventura de la vida.

A continuación paso a presentar un resumen de mi trabajo que he denominado:

## **NUEVOS PRODUCTOS DE ORIGEN NATURAL Y SINTÉTICO CON ACTIVIDAD ANTITUMORAL**

Uno de los objetivos principales de nuestro trabajo durante más de veinte años ha sido el de obtener sustancias con actividad antitumoral a partir de productos naturales y sintéticos.

Las cinco líneas principales de trabajo:

- A) Nuevas sustancias antitumorales de origen natural y obtención de quimiotecas focalizadas
- B) Productos útiles para la quimioprevención del cáncer inducido por infecciones virales
- C) Búsqueda de revertidores de la multiresistencia a fármacos anticancerígenos
- D) Biotecnología e Ingeniería Genética de Rutas Metabólicas
- E) Química Macro y supramolecular

Los resultados obtenidos hasta ahora nos indican que nos encontramos con nuevas sustancias potencialmente útiles en la lucha contra el cáncer y con la posibilidad de convertirse en fármacos de uso clínico.

Se han generado publicaciones, patentes, contratos y proyectos con la industria (empresas FAES, SYTEN, BIOMAR), basados en nuestra actividad investigadora.

## **II. Introducción**

Los sistemas de medicina tradicional basados en plantas han sido utilizados por todo el mundo durante cientos de años y en la actualidad siguen jugando un importante papel en los cuidados de la salud<sup>1-4</sup>. La Organización Mundial de la Salud (WHO) estima que aproximadamente el 80% de los habitantes del mundo recurren a la medicina tradicional para los cuidados de atención primaria<sup>5-6</sup>. El uso de productos naturales en el diseño de fármacos representa de una forma aproximada la evolución natural de esta antigua tradición.

Uno de los problemas sanitarios más importantes que se plantean en la actualidad es el tratamiento de las enfermedades tumorales<sup>7</sup>. Junto con la prevención y su vertiente de la quimioprotección, las técnicas quirúrgicas, las técnicas que usan energías radiantes en sus diversas versiones y todo el bagaje científico que se está acumulando tras el descubrimiento de los oncogenes, la quimioterapia, es decir el uso de agentes químicos de estructura conocida, constituye una herramienta muy utilizada. A su vez, el uso de esas sustancias, da lugar a la aparición de la multiresistencia (MDR), que puede ser eliminada con los correspondientes revertidores.

Los agentes quimioterapéuticos que se usan actualmente poseen un amplio espectro de estructuras químicas, hasta el punto de que no puede hablarse de una relación definida entre estructura y actividad y ni siquiera entre tipo de estructura y actividad. Por otro lado, los mecanismos, a través de los cuales estos agentes detienen el crecimiento selectivo de las

células cancerígenas frente a las células normales, se reducen a unos pocos. Con no mucha frecuencia aparecen fármacos con un mecanismo de acción desconocido que se encuentra en fase de investigación o bien se ha descubierto un nuevo mecanismo de acción. Así, por ejemplo, el taxol o paclitaxel<sup>8</sup> de Rhone-Poulanc ejerce su acción inhibiendo la mitosis al interaccionar con los microtúbulos e induciendo haces estables de éstos. El alcaloide natural colchicina y el lignano podofilotoxina inhiben también la mitosis impidiendo la polimerización de la tubulina, de manera parecida a como lo hacen los alcaloides de la Vinca, vincristina y vinblastina. El cisplatino<sup>9</sup>, otro antineoplásico profusamente utilizado, interacciona directamente con el DNA, formando un quelato del platino con dos átomos de nitrógeno (N-7) de guanina, impidiéndose así la replicación del DNA. El metotrexato ejerce su acción inhibiendo a la dehidrofolato reductasa, una enzima clave en la biosíntesis de las bases nitrogenadas del DNA, a la que se une con una KD = 10-11M. La velocidad de disociación del complejo enzima-inhibidor in vivo es lo suficientemente baja para privar a la célula de los intermediarios en la síntesis del DNA durante un período en el que se induce la muerte celular. La estructura del complejo enzima-inhibidor está bien determinada por rayos X, observándose como a pH fisiológico la porción 2,4-diaminopteridina del metotrexato está protonada y se une a restos carboxilato del centro activo. La inhibición de las topoisomerasas por ciertos tipos de lignanos es otro ejemplo de acción anticancerígena a nivel de una actividad enzimática clave. También ha sido decisivo el descubrimiento de los cánceres dependiente de hormonas.

Como resultado de los recientes avances en biología, existe ahora una demanda creciente de nuevos productos naturales. Específicamente, los campos de la genómica y proteómica prometen la rápida identificación de un gran número de productos genéticos para los cuales pequeñas moléculas moduladoras serán tanto de interés biológico como médico<sup>10-14</sup>. Además la combinación de biología celular y alta tecnología ha llevado al desarrollo de varios ensayos celulares en los cuales pequeñas librerías de moléculas pueden ser utilizadas para identificar y estudiar dianas previamente desconocidas<sup>15-16</sup>. En los últimos años ha adquirido una gran relevancia el concepto de *estructuras privilegiadas*, término usado por primera vez por Evans y colaboradores<sup>17-18</sup> para describir tipos de esqueletos seleccionados que se unen a múltiples y no relacionadas clases de receptores proteicos como ligandos con una alta afinidad. Recientemente Waldman y colaboradores han desarrollado el concepto de dominio para una más eficiente investigación en la búsqueda de fármacos candidatos. Esta estrategia esta basada en dominios de proteínas móviles conservadas estructural y genéticamente y los correspondientes productos naturales seleccionados durante la evolución. Los productos naturales biológicamente activos pueden considerarse entidades químicas que fueron seleccionados evolutivamente y validadas por su anclaje a particulares dominios de proteínas. Las estructuras que subyacen en estos tipos de productos naturales deben de proveernos de una potente guía para el desarrollo de nuevas moléculas bioactivas<sup>19-20</sup>.

*Teniendo todas estas ideas en mente en el presente trabajo motramos nuevas estructuras privilegiadas y desarrollado pequeñas quimiotecas de análogos de productos naturales bioactivos como revertidores del fenotipo MDR de fármacos anticancerígenos, como antitumorales y quimiopreventivos.*

### **III. Antecedentes y Resultados obtenidos**

Como resultado de nuestros trabajos de investigación en metabolitos secundarios bioactivos de origen natural y derivados sintéticos nuestras aportaciones en el campo de los antitumorales se han desarrollado fundamentalmente en torno a cuatro familias de productos naturales y una sintética *de novo*:

- a) Triterpenoquinonas y triterpenofenoles
- b) Sesquiterpenos  $\beta$ -dihidroagarofuranos
- c) Naftoquinonas isoprenílicas
- d) Benzotropolonas
- e) Bispiranoquinona

A continuación pasaremos a comentar las aportaciones y logros más significativos conseguidos con dichas moléculas en la evaluación de su potencial antitumoral, quimiopreventivo del cáncer y como revertidores del fenotipo de MDR.

## A) Actividad Antitumoral

El cáncer será la primera causa de muerte en el siglo XXI, y los productos naturales deben proveer nuevos agentes anti-cáncer más efectivos.

Hemos trabajado en el aislamiento, elucidación estructural y modificación por vía química de las estructuras de productos naturales que han sido activos como antitumorales en alguno de los siguientes mecanismos: daño a células tumorales en cultivo, daños al ADN, inducción de apoptosis e inhibidores de la enzima colino-quinasa.

Los productos estudiados como resultado de nuestros trabajos de investigación se refieren a cuatro familias químicas: triterpenoquinonas, sesquiterpenos  $\beta$ -dihidroagarofuranos, naftoquinonas isoprenílicas y benzotropolonas. Junto a familia sintética de bispiranoquinona.

En trabajos previos, las quinonas triterpénicas habían mostrado interesantes actividades citotóxicas frente a líneas celulares tumorales<sup>21</sup>. Las líneas celulares utilizadas en nuestros estudios han sido básicamente: **P-388**: linfoma de ratón (ATCC:CCL46); **A-549**: carcinoma de pulmón humano (ATCC:CL85); **HT-28**: carcinoma humano de colon (ATCC:HTB38); **MEL-28**: melanoma humano (ATCC:HTB72). Al objeto de mejorar estos resultados, llevamos a cabo modificaciones químicas orientadas a obtener derivados más activos y/o selectivos, así como para establecer relaciones estructura-actividad.

Las prenil-naftoquinonas constituyen un grupo importante de productos naturales estudiados en la investigación del cáncer<sup>22</sup>. Algunas quinonas relacionadas con el lapachol poseen un potencial notable como quimiopreventivos del cáncer, como se verá más adelante en el correspondiente apartado.

Los sesquiterpenos  $\beta$ -dihidroagarofuránicos han mostrado actividad antitumoral en cultivos celulares<sup>23</sup>, pero las estructuras por nosotros estudiadas han mostrado baja actividad hasta el momento<sup>24</sup>. Los datos de la bibliografía hablan de productos bioactivos con estereoquímicas y sustituyentes distintos a los que poseen nuestros compuestos. Sin embargo los que hemos aislados han destacado por su potencial como revertidores de la resistencia a fármacos antitumorales.

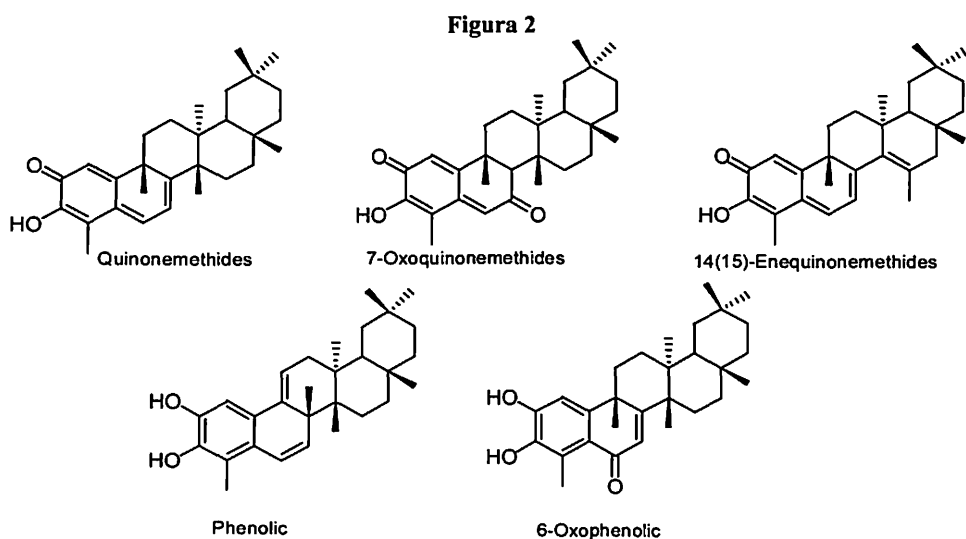
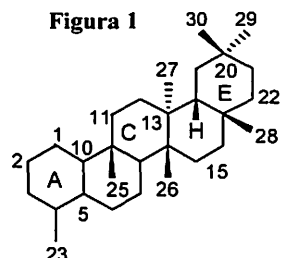
Las tropolonas y benzotropolonas de origen natural son escasas y, en general, muy activas. Hemos aislado, y determinado la estructura de una tropolona y un aducto Diels-Alder de una tropolona que poseen actividad genotóxica con potencial como fármaco anti-cáncer<sup>25</sup>. Las bispiranoquinona son una nueva familia de revertidores de la multiresistencia a drogas anticancerígenas.

### A-a) Nor-metilenquinonas triterpénicas con actividad antitumoral.

En un trabajo reciente sobre revisión de productos naturales con actividad anticancerígena<sup>26</sup>, dimos cuenta de nuestro trabajo de los últimos veinte años con productos

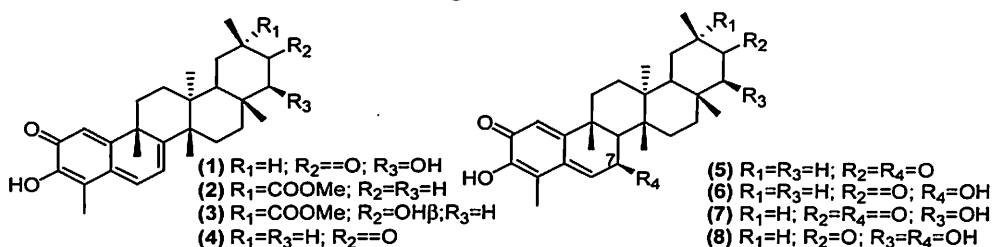
bioactivos de estas familias y presentamos también los resultados de las modificaciones sintéticas que nos han llevado a las series más potentes hasta ahora conocida.

El esqueleto básico de estos compuestos se presenta en la Figura 1, e invariablemente contiene funciones oxigenadas en los carbonos C-2 y C-3, con una única excepción, el celastranhidrido<sup>27</sup>, cuyo anillo A ha sufrido una ruptura oxidativa. Otros lugares de oxidación del sistema metilenoquinónico son los carbonos C-6 y C-7. Aquellos triterpenos con una insaturación adicional en C-14(15), presentan una migración de metilo y fueron aislados y caracterizados por primera vez en nuestro laboratorio<sup>28</sup>. El sistema más común de oxidación fuera de los anillos A y B es el carbono C-29, en forma de alcohol, ácido o metiléster. También se han encontrado productos que han perdido el grupo ácido en C-29, dando los correspondientes nor-derivados. Otras posiciones oxidadas son C-15, C-21, C-22, C-23 y C-28. Los grupos más importantes de esta familia de compuestos se muestran en la Figura 2, en la línea inferior se muestran ejemplos de nor-catecoles.



Hemos llevado a cabo estudios fitoquímicos de diversas especies, la mayoría del género *Maytenus* (*M. horrida*, *M. amazonica*, *M. macrocarpa*, *M. magellanica*, *M. disticha*, *M. chubutensis*, *M. boaria*, *M. blepharodes*, *M. cuzcoina*, *M. canariensis*,...). Aparte de la actividad antitumoral, algunos miembros de esta familia poseen actividad antimicrobiana. Las quinonas 1-8 (Figura 3), son los principales metabolitos secundarios presentes en las raíces de las especies del género *Maytenus*, siendo su abundancia dependiente de la especie.

Figura 3



Los resultados de las actividades citotóxicas (Tabla 1) de los compuestos 1-4 muestran que las diferentes funcionalidades en el anillo E afectan a la actividad y a la selectividad. También se observa en la misma tabla que los productos 7-hidroxi y 7-oxotriterpeno-metilenquinónicos 5-8, tienen muy baja citotoxicidad, quedando de manifiesto la importancia de la extensión de la conjugación a través del anillo B.

Tabla 1. Actividad citotóxica frente a líneas celulares (IC<sub>50</sub>  $\mu$ M) de 1-8.

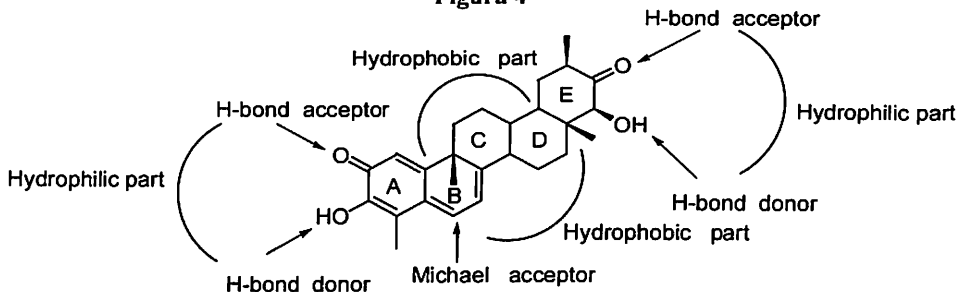
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
P-388	0.22	0.22	0.26	0.24	5.73	11.41	1.10	5.50
A-549	0.54	0.27	0.26	0.60	11.47	11.41	2.21	11.0
HT-29	1.10	0.27	0.26	0.60	11.47	11.41	2.21	11.0
MEL-28	1.10	0.27	0.26	0.60	11.47	11.41	2.21	11.0

P-388: mouse lymphoma (ATCC:CCL 46); A-549: human lung carcinoma (ATCC:CL85); HT-28: human colon carcinoma (ATCC: HTB38); MEL-28: human melanoma (ATCC:HTB72).

#### A-b) Quimioteca de análogos de triterpeno-quinonas

El diseño de los análogos de triterpeno-quinonas está basado en la estructura modular de este tipo de productos, los cuales poseen dos zonas hidrofílicas centradas en los anillos A y E, que contienen grupos aceptores y dadores de enlaces de hidrógenos, respectivamente. También tienen una parte hidrofóbica localizada en los anillos B, C y D, y el carbono C-6 puede actuar como aceptor de Michael (Figura 4).

Figura 4



Considerando este esquema de reactividad, decidimos estudiar la influencia sobre la actividad antitumoral de varias modificaciones sobre el esqueleto. En la Figura 5 y en la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos con acilaciones selectivas sobre el hidroxilo en el carbono C-3 del compuesto 1.

Figura 5

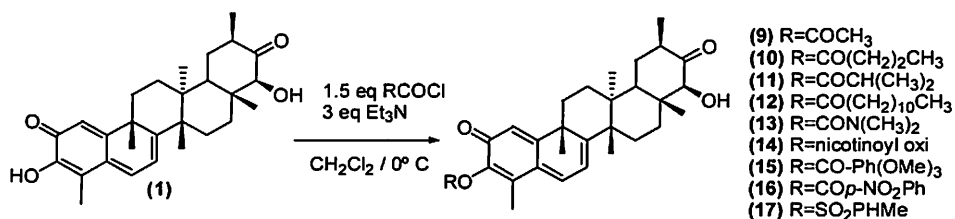


Tabla 2. Actividad citotóxica frente a líneas celulares (IC<sub>50</sub> μM) de 9-17

	P-388	A-549	HT-29	Mel-28	P-388	A-549	HT-29	Mel-28
<b>1</b>	0.22	0.54	1.10	1.10	<b>13</b>	0.20	0.99	0.99
<b>9</b>	0.52	1.04	1.04	1.04	<b>14</b>	1.84	1.84	1.84
<b>10</b>	----	2.03	2.03	----	<b>15</b>	----	7.94	----
<b>11</b>	----	10.2	10.2	----	<b>16</b>	17.0	17.0	17.0
<b>12</b>	0.40	1.62	1.62	1.62	<b>17</b>	0.85	1.69	1.69

P-388: mouse lymphoma (ATCC:CCL 46); A-549: human lung carcinoma (ATCC:CL85);

HT-28: human colon carcinoma (ATCC: HTB38); MEL-28: human melanoma (ATCC:HTB72).

Otros tipos de acilaciones, usando diferentes condiciones de reacción, se consiguieron vía adición de Michael en el carbono C-6 y posterior acetilación del sistema catecol generado. Los productos obtenidos y su propuesta de formación se muestran en las Figuras 6 y 7, y los resultados de actividad antitumoral en la Tabla 3, donde también se muestran como patrones de referencia los datos de algunos antitumorales utilizados en clínica. A la luz de la tabla puede observarse como alguno de nuestros productos presentan mejores citotoxicidades que *cis*-platino, etoposido o taxol y en el caso del compuesto 21 mejor selectividad que vinblastina.

Figura 6

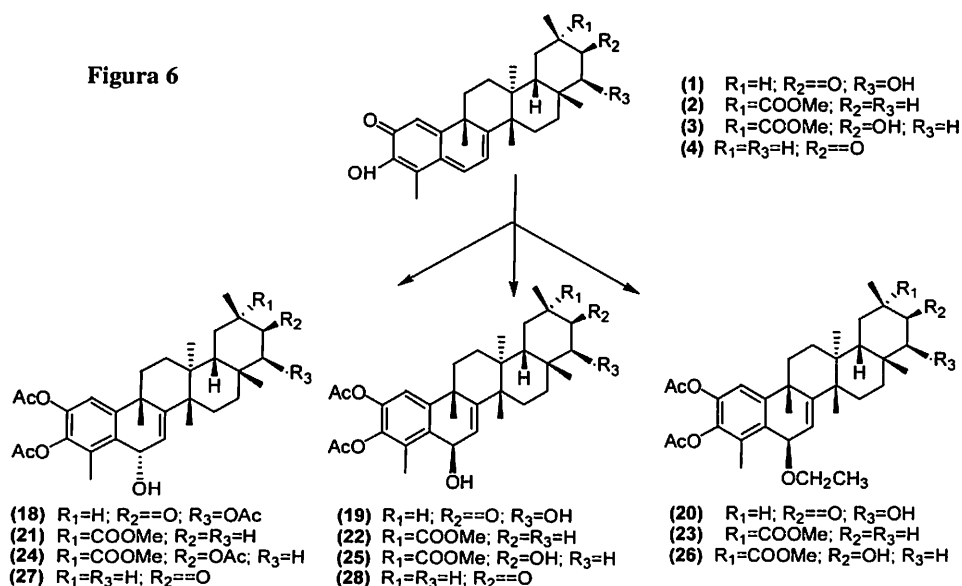




Figura 7

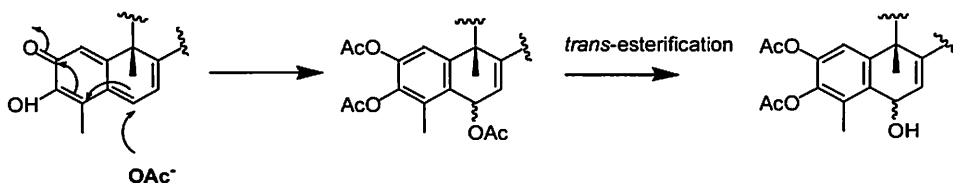


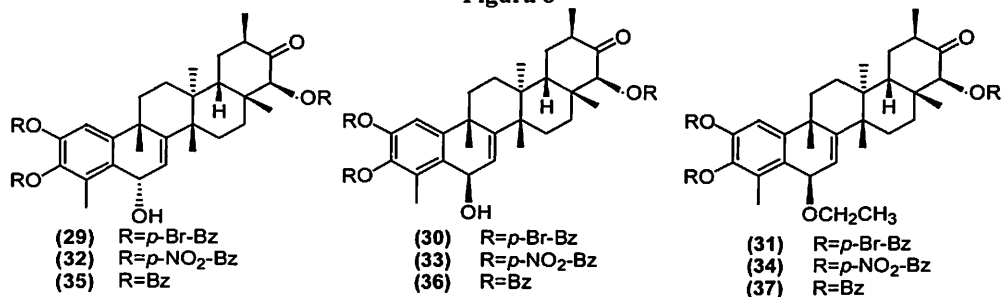
Tabla 3. Actividad citotóxica frente a líneas celulares (IC<sub>50</sub>  $\mu$ M) de 12-28.

Compounds	P-388	A-549	HT-29	MEL-28
1	0.22	0.54	1.10	1.10
2	0.22	0.27	0.27	0.27
3	0.26	0.26	0.26	0.26
4	0.24	0.60	0.60	0.60
18	0.17	0.43	0.86	0.86
19	17.2	17.2	17.2	17.2
20	0.16	0.82	0.82	0.82
21	0.044	0.18	0.18	0.18
22	2.22	2.22	2.22	2.22
23	0.21	0.84	1.68	0.84
24	0.19	0.19	0.19	16.0
25	16.0	16.0	16.0	16.0
26	0.15	0.15	0.15	0.19
27	0.23	0.23	0.23	0.23
28	19.0	19.0	19.0	19.0
<b>Cis-platinum</b>	8.33	16.67	33.33	33.33
<b>Etoposide</b>	0.17	0.17	1.70	0.85
<b>Vinblastine</b>	0.022	0.022	0.022	0.022
<b>Taxol</b>	0.59	0.012	0.012	0.012

P-388D<sub>1</sub>: Mouse lymphoma (ATCC CCL-46); AT-549: Human lung carcinoma (ATCC CCL-185); HT-28: Human colon carcinoma (ATCC HTB-38); SK-MEL-28: Human melanoma (ATCC HTB-72).

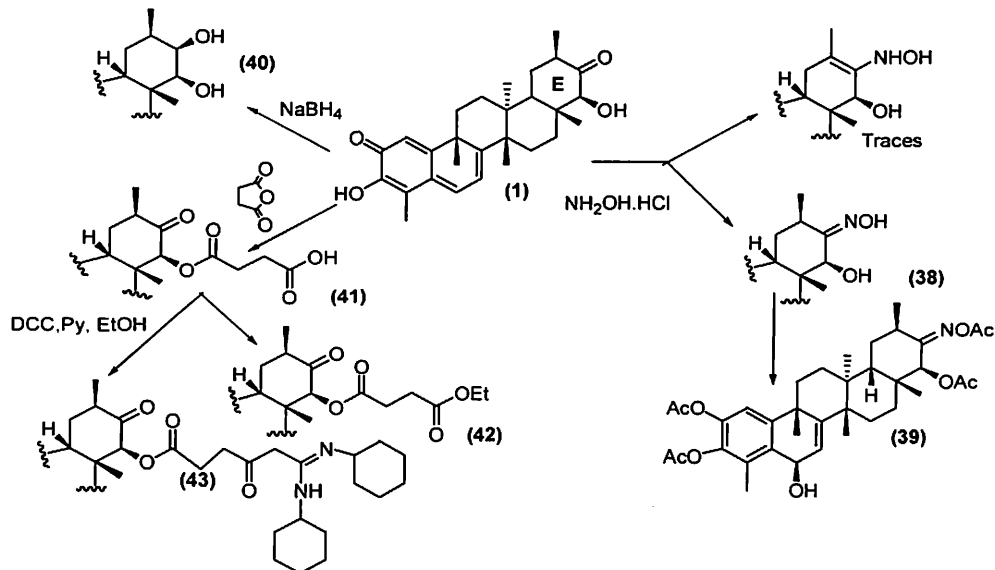
En la Figura 8 se muestran los productos 29-36 obtenidos por benzoilación del producto 1, los cuales fueron menos activos, indicando que el tamaño del grupo acilo localizado en los anillos A y E juega un papel significativo en la actividad, y que los efectos electrónicos presentes en el anillo aromático son irrelevantes.

Figura 8



En la Figura 9, se muestran las estructuras de los productos obtenidos mediante modificaciones realizadas sobre el carbonilo y el hidroxilo localizados en el anillo E, (productos 38-43) y los correspondientes resultados de actividad citotóxica en la Tabla 4. El único producto interesante de esta serie resultó ser el compuesto 38, obtenido por sustitución del grupo carbonilo por una oxima, que incrementó la actividad frente a las líneas celulares A-549 en dos veces, y en cuatro veces para las líneas celulares HT-29 y MEL-28.

Figura 9



Las oxidaciones de los productos 1-4 bajo diversas condiciones,<sup>6,9</sup> nos condujeron a los productos 44-53 (Figura 10) cuyos datos de citotoxicidad se muestran en la Tabla 5, siendo significativos algunos de ellos, con actividad similar a la de Etoposido, también incluido en dicha tabla.

Tabla 4. Actividad citotóxica frente a líneas celulares (IC50  $\mu$ M) de 38-43.

	P-388	A-549	HT-29	Mel-28		P-388	A-549	HT-29	Mel-28
1	0.22	0.54	1.10	1.10	39	0.16	0.16	0.16	0.16
2	0.22	0.27	0.27	0.27	40	0.23	0.23	0.23	0.23
3	0.26	0.26	0.26	0.26	41	0.93	1.87	0.93	0.22
4	0.24	0.60	0.60	0.60	42	0.08	0.44	0.44	0.44
38	0.22	0.27	0.27	0.27	43	0.13	0.13	0.13	0.33

P-388D<sub>1</sub>: Mouse lymphoma (ATCC CCL-46); A-549: Human lung carcinoma (ATCC CCL-185); HT-28: Human colon carcinoma (ATCC HTB-38); SK-MEL-28: Human melanoma (ATCC HTB-72).

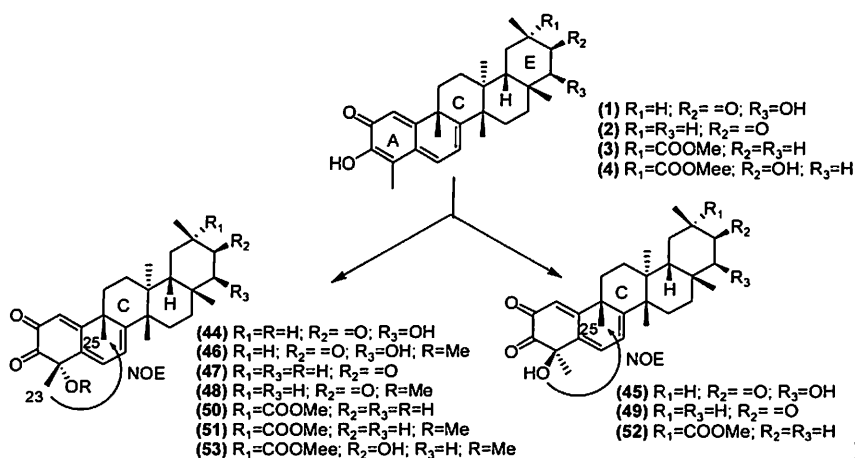


Figura 10

Tabla 5. Actividad citotóxica frente a líneas celulares (IC50  $\mu$ M) de 46, 48, 51 y 53.

	P-388	A-549	HT-29	MEL-28		P-388	A-549	HT-29	MEL28
	0.17	0.17	1.70	0.85	44	2.21	2.77	2.77	2.77
<i>Etp</i>									
1	0.22	0.54	1.10	1.10	46	0.11	0.54	0.54	0.54
2	0.22	0.27	0.27	0.27	48	0.06	0.56	0.56	0.56
3	0.26	0.26	0.26	0.26	51	0.10	0.20	0.20	0.20
4	0.24	0.60	0.60	0.60	53	0.24	0.98	0.98	0.98

P-388D<sub>1</sub>: Mouse lymphoma (ATCC CCL-46); A-549: Human lung carcinoma (ATCC CCL-185); HT-28: Human colon carcinoma (ATCC HTB-38); SK-MEL-28: Human melanoma (ATCC HTB-72).

A continuación mostramos los resultados obtenidos en la preparación de compuestos que presentan una extensión de la estructura a partir de un compuesto dicarbonílico 46 o bien por reacciones de hetero-Diels-Alder con demanda inversa de electrones de los compuestos 1 y 2 frente a bromanilo, Figuras 11 y 12. La actividad citotóxica se muestra en la Tabla 6.

Figura 11

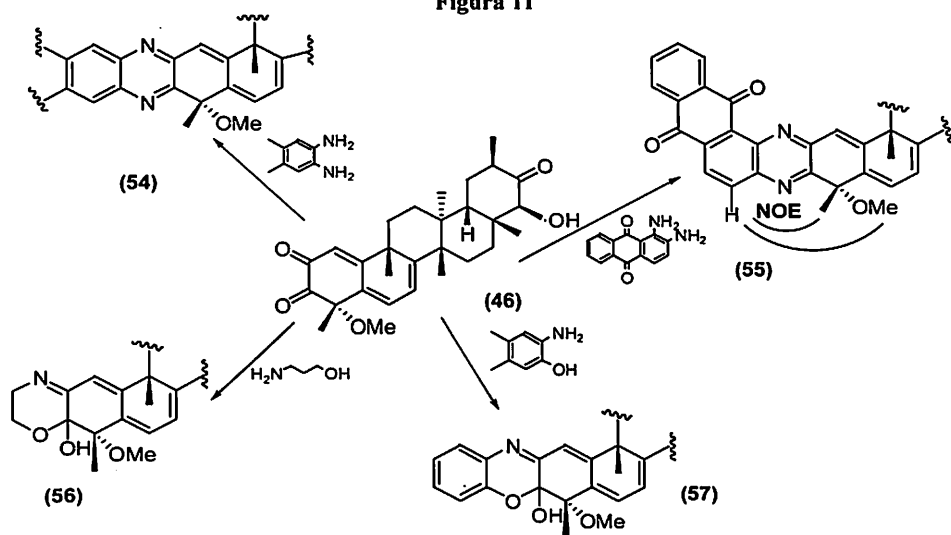


Figura 12

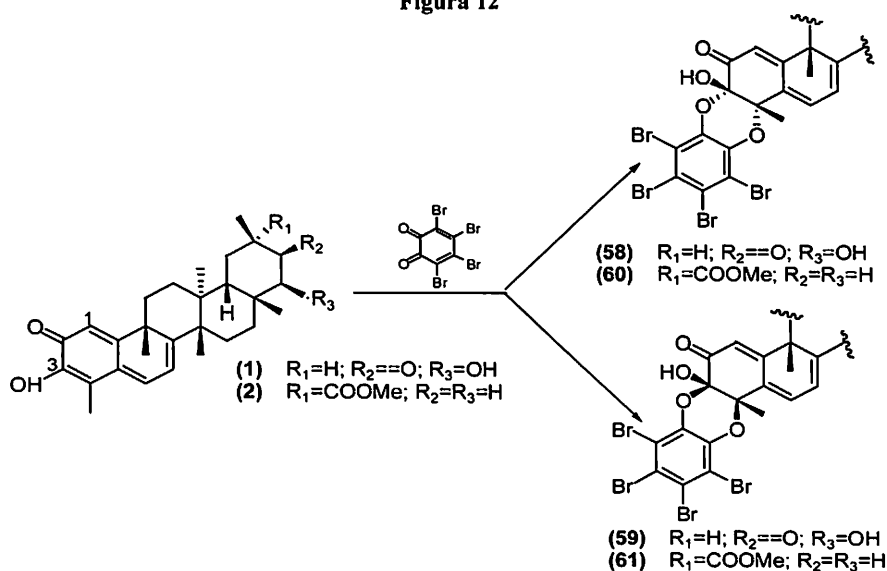


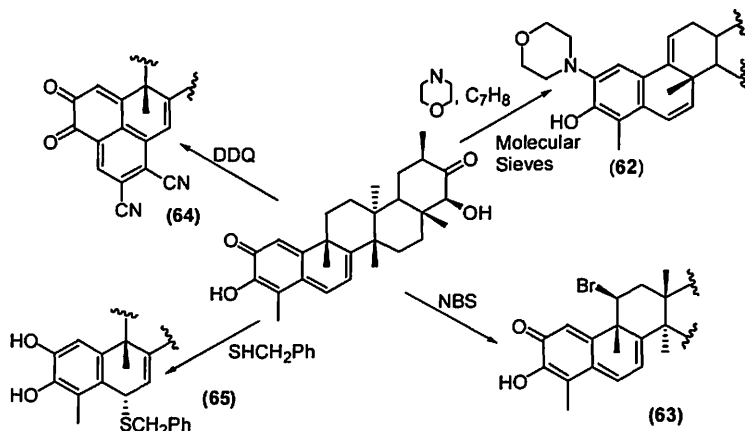
Tabla 6. Actividad citotóxica frente a líneas celulares (IC50  $\mu M$ ) de 1-8.

	P-388	A-549	HT-29	MEL-28		P-388	A-549	HT-29	MEL28
	17.6	17.6	17.6	17.6	58	0.14	0.14	1.16	0.58
54									
55	1.50	1.50	1.50	1.50	59	0.14	0.14	1.16	0.58
56	0.20	0.98	0.98	0.98	60	0.14	0.28	0.56	0.56
57	0.17	0.90	0.90	0.90	65	0.22	0.22	1.79	0.90

P-388: mouse lymphoma (ATCC:CCL 46); A-549: human lung carcinoma (ATCC:CL85); HT-28: human colon carcinoma (ATCC: HTB38); MEL-28: human melanoma (ATCC:HTB72).

En la figura 13 se observan otras transformaciones químicas selectivas que a partir del producto 1 nos condujeron a los productos 62-65. Los resultados de actividad se encuentran también en la Tabla 6.

Figura 13



#### A-c) Nor-catecol-triterpenos antitumorales:

En la Figura 14, se muestran las estructuras de catecoles de origen natural, éstos son productos menos abundantes que las triterpenoquinonas. En la Tabla 7 se puede observar que son menos activos que los metilén-quinónicos correspondientes. En este tipo de compuestos, la presencia de un grupo carbonilo en el carbono C-6 parece ser crítica para la actividad. Compuestos sin grupo carbonilo en C-6 presentan aún más baja actividad. En un intento de de establecer el papel de los diferentes grupos situados en el anillo aromático así como el del grupo carbonilo sobre C-6 realizamos algunas modificaciones sobre el más activo de los fenoles aislados hasta el momento, el producto 70, obteniéndose los compuestos 78-82 (Figura 15) y los datos de citotoxicidad se muestran en la Tabla 8. De estos datos se deduce que la introducción de grupos metoxilo disminuye la actividad mientras que la acetilación genera compuestos más activos.

Figura 14

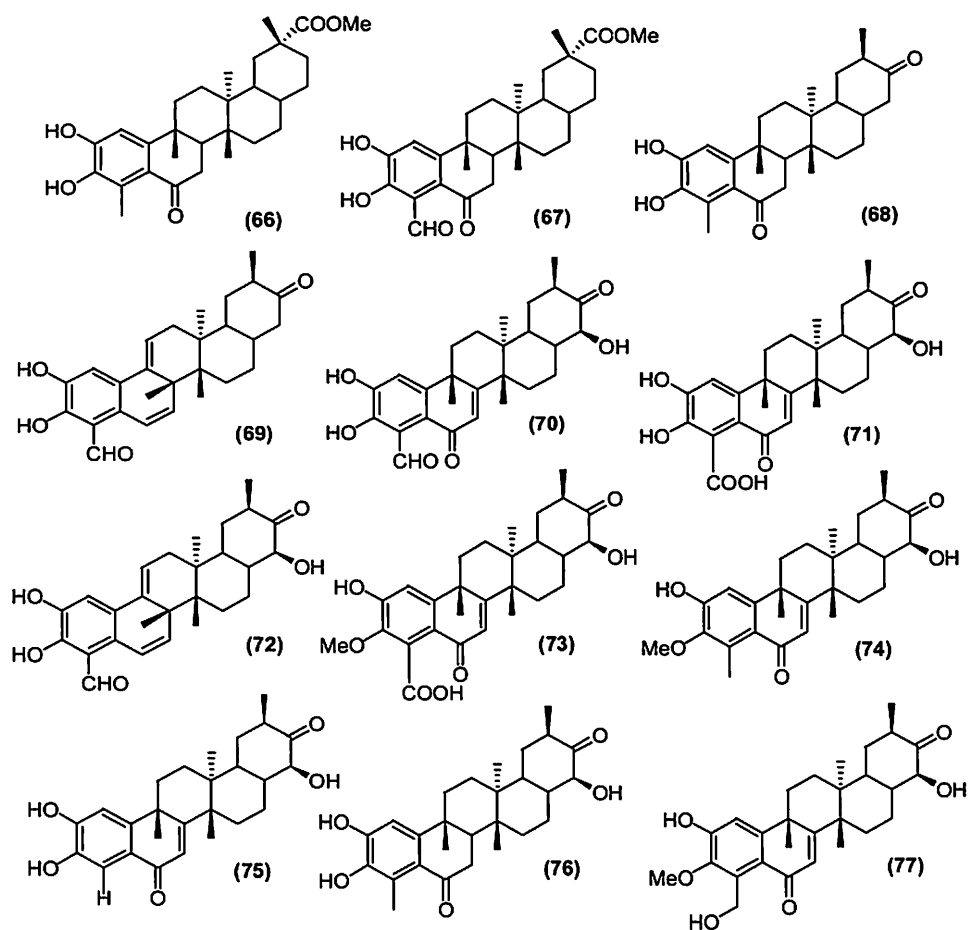


Tabla 7. Actividad citotóxica frente a líneas celulares (IC50  $\mu$ M) de 1-8.

	P-388	A-549	HT-29	Mel-28		P-388	A-549	HT-29	Mel-28
66	10.37	10.37	10.37	10.37	72	5.55	11.11	11.11	11.11
67	1.00	0.20	2.02	1.00	73	20.16	20.16	20.16	20.16
68	11.42	11.42	22.83	22.83	74	2.15	2.15	2.15	2.15
69	23.04	23.04	23.04	23.04	75	5.71	5.71	5.71	5.71
70	0.54	0.54	1.07	1.07	76	5.51	5.51	5.51	5.51
71	5.19	5.19	5.19	5.19	77	8.74	8.74	8.74	8.74

P-388: mouse lymphoma (ATCC:CCL 46); A-549: human lung carcinoma (ATCC:CL85); HT-28: human colon carcinoma (ATCC: HTB38); MEL-28: human melanoma (ATCC:HTB72).

Figura 15

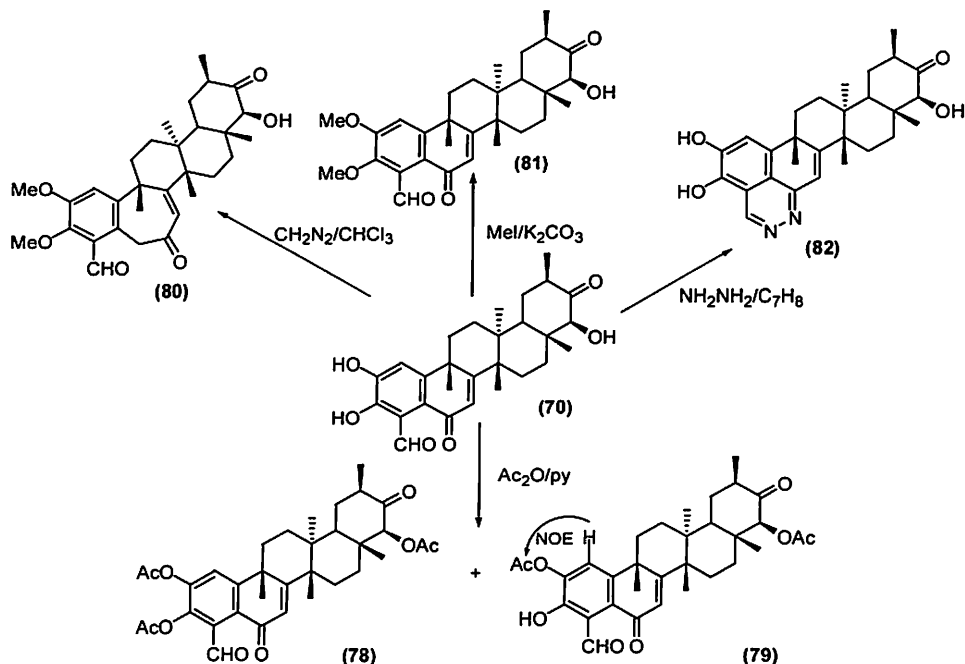


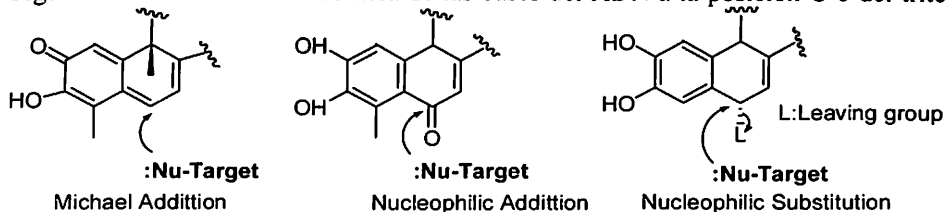
Tabla 8. Actividad citotóxica frente a líneas celulares (IC50  $\mu\text{M}$ ) de 1-8.

	P-388	A-549	HT-29	MEL-28		P-388	A-549	HT-29	MEL-28
70	0.54	0.54	1.07	1.07	80	9.58	9.58	9.58	9.58
78	0.20	0.20	0.42	0.42	81	5.06	5.06	5.06	5.06
79	0.18	0.22	0.22	0.22	82	1.08	1.08	2.17	1.08

P-388: mouse lymphoma (ATCC:CCL 46); A-549: human lung carcinoma (ATCC:CL85);  
HT-28: human colon carcinoma (ATCC: HTB38); MEL-28: human melanoma (ATCC:HTB72).

#### A-d) Mecanismo de acción

El mecanismo de acción de estos compuestos no ha sido aún del todo establecido. Sin embargo nosotros proponemos un mecanismo plausible para las triterpeno-quinonas y triterpenofenoles. Así ellos pueden interactuar con grupos nucleófilos, (:Nu) de la diana molecular vía una adición de Michael en las quinonas o vía una adición nucleofílica a C-6 en catecoles, o vía sustitución nucleofílica en triterpenos con sustituyentes en el carbono C-6 que puedan actuar como buenos grupos salientes. Nuestra hipótesis ha sido reforzada por los trabajos de Setzer<sup>30</sup> que llevaron a cabo usando cálculos semiempíricos tipo PM3 y Hartee-Fock 3-21G *ab initio* con tingenona (4) y las bases de nucleótidos adenina, guanina citosina y timina, sugiriendo para la tingenona una interacción casi intercalante con el ADN seguida de una adición nucleofílica de las bases del ADN a la posición C-6 del triterpeno.



### A-e) Resumen de relaciones Estructura-Actividad

Considerando toda la información obtenida, hemos elaborado unas conclusiones que pueden permitirnos prever la citotoxicidad de un producto de esta familia.

En *triterpenos metilen quinónicos* la actividad se ve incrementada con:

- La presencia de conjugación extendida de dobles enlaces en el anillo
- La presencia de carbonilo en C-2
- Con la existencia de grupos éster pequeños como sustituyentes en el carbono C-3

En *triterpenos fenoles* la actividad se ve aumentada con:

- La presencia sobre el carbono C-6 de un grupo carbonilo u otros sustituyentes (por ejemplo, OH, SCH<sub>2</sub>PH.....)
- En compuestos con grupo carbonilo sobre C-6, la presencia de un doble enlace C-7-C-8 o la presencia de un sustituyente atractor de electrones, o las dos cosas a la vez.
- En catecoles sustituidos en C-6 la estereoquímica  $\alpha$  y sustituyentes pequeños en el anillo A.

Como resultado de estas investigaciones varios productos han sido seleccionados para estudios más avanzados por el Instituto Nacional del Cáncer de EE UU y se encuentran protegidos bajo patente<sup>31</sup>.

### A-f) Nuevos derivados benzotropolónicos como lesionantes específicos de ADN.

El cáncer muestra y acumula un gran número de cambios genéticos durante el progreso hacia su malignización debido a una inestabilidad genética intrínseca. Estas alteraciones genéticas suelen afectar a la reparación del ADN y a las rutas de chequeo del ciclo celular que incrementan la sensibilidad de las células tumorales con respecto a los agentes lesionantes para el ADN.

Por ello, recientemente hemos iniciado un proyecto de búsqueda de productos naturales y sintéticos con capacidad de producir daño al ADN.

Así, en un estudio de la especie *Goupia glabra* (*Celastraceae*),<sup>32</sup> distribuida en la zona amazónica de Perú y comúnmente conocida como “capricornia”, “copiuba” y “muela rifarillo”, aislamos dos nuevas sustancias que denominamos goupionona A (**83**) y goupionona B (**84**), con novedosas estructuras de tropolona y de aducto Diels-Alder benzotropolona. Las estructuras se muestran en la Figura 16.

En los ensayos se utilizó un panel de cepas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, mutantes para cada uno de los genes implicados en las rutas de control del ciclo, que responden a lesiones en el ADN.

Se cuantificó la concentración inhibitoria al 50% (IC<sub>50</sub>) para cada compuesto y también para el antineoplásico doxorubicina en la cepa silvestre (WT) y en la cepa mutada rad9, como representante del panel.

En la Tabla 9 se observa que los compuestos goupionona A y goupionona B son 50 y 16 veces más citotóxicos para rad9 que para la cepa silvestre y que ninguno muestra toxicidad significativa hacia la cepa silvestre a una concentración superior a 100  $\mu$ g/ml. Los compuestos presentan también mayor citotoxicidad que la doxorubicina, lo cual indica que inducen muerte celular por lesiones en el ADN y que se comportan como genotóxicos, resaltando su potencial como moléculas anticancerígenas.



Figura 16

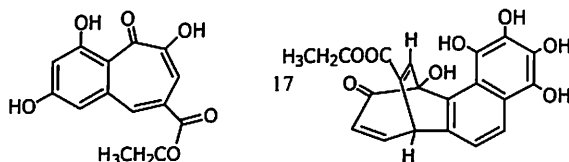


Tabla 9: Valores de IC<sub>50</sub> (µg/ml) para 83, 84 y doxorubicina en la cepa silvestre y en la cepa mutante Rad9.

	83	84	doxorubicina
Cepa silvestre	>100	>100	>100
Mutante Rad9	2	6	12.5

Este mismo método se ha aplicado a naftoquinonas y han sido recogidos en una tesis doctoral.<sup>33</sup>

## B) Actividad quimiopreventiva del cáncer

En 1980 Doll y Peto<sup>34</sup> indicaron que aproximadamente el 10% de los cánceres eran causados por agentes infecciosos. Los agentes responsables ordenados por el número de casos producidos son: la bacteria *Helicobacter pylori*, VIH, virus Epstein-Barr (VEB), esquistosomas, virus HTL-1 y trematodos de hígado<sup>34</sup>.

Hoy se sabe que los virus de la hepatitis B y C, el virus del papiloma humano, el virus linfotrópico-T y el virus Herpes humano 8 han sido incluidos como agentes infecciosos para los cuales existen evidencias razonables de causalidad con respecto a uno o más neoplasmas.

El virus de Epstein-Barr (VEB) es un  $\gamma$ -herpes que se encuentra presente en todos los humanos y que está relacionado con algunos tipos de linfomas tales como el linfoma de Burkitt y el de Hodgkin, con algunos carcinomas como el nasofaríngeo y también se asocia con la mononucleosis infecciosa, comúnmente llamada enfermedad del beso<sup>35</sup>.

Para el linfoma de Burkitt (BL), el genoma del virus de Epstein-Barr está presente en células tumorales aproximadamente un 95 % de los casos en África Sub-Sahariana, un 85 % en los casos de África del Norte y entre 1/5 y 1/3 de la población en el norte de América y Europa. La fracción en América Latina está indeterminada. Esta proporción representa los casos de linfoma de Burkitt en distintas áreas atribuido al VEB. Para la enfermedad de Hodgkin, el ácido nucleico del VEB está presente entre 30 y 50 % de los tumores, pero la relación depende de la edad (el 70 % de los casos en la infancia, 20% en jóvenes adultos y el 70 % de los grupos de avanzada edad). El VEB está presente en la mayoría de los casos de carcinoma nasofaríngeo indiferenciado (CNF). Este tipo comprende la gran mayoría de cáncer en la población de alto o medio riesgo. En las áreas de más bajo riesgo, sobre 10-25 % de CNF es del tipo 1 (queratinizante), que pocas veces infecta. Hemos asumido que el 100% del carcinoma nasofaríngeo indiferenciado en áreas de alto y medio riesgo (ASR>2.0 en hombres, 1.0 en mujeres) se relaciona con el VEB y el 90% de los casos de bajo riesgo<sup>34</sup>.

Nuestros esfuerzos se dirigen a la búsqueda de nuevos metabolitos secundarios (productos naturales) capaces de impedir la inducción de cáncer. Actualmente no existe ningún fármaco eficaz frente al Virus de Epstein-Barr, pero si se ha demostrado que diferentes tipos de productos naturales presentan actividad antipromotora de tumores. Algunos ejemplos los constituyen los carotenoides<sup>36</sup>, sesquiterpenos<sup>37</sup> y antraquinonas<sup>38</sup>.

Con estos antecedentes decidimos evaluar el potencial quimiopreventivo de una amplia variedad de naftoquinonas y sesquiterpenos.

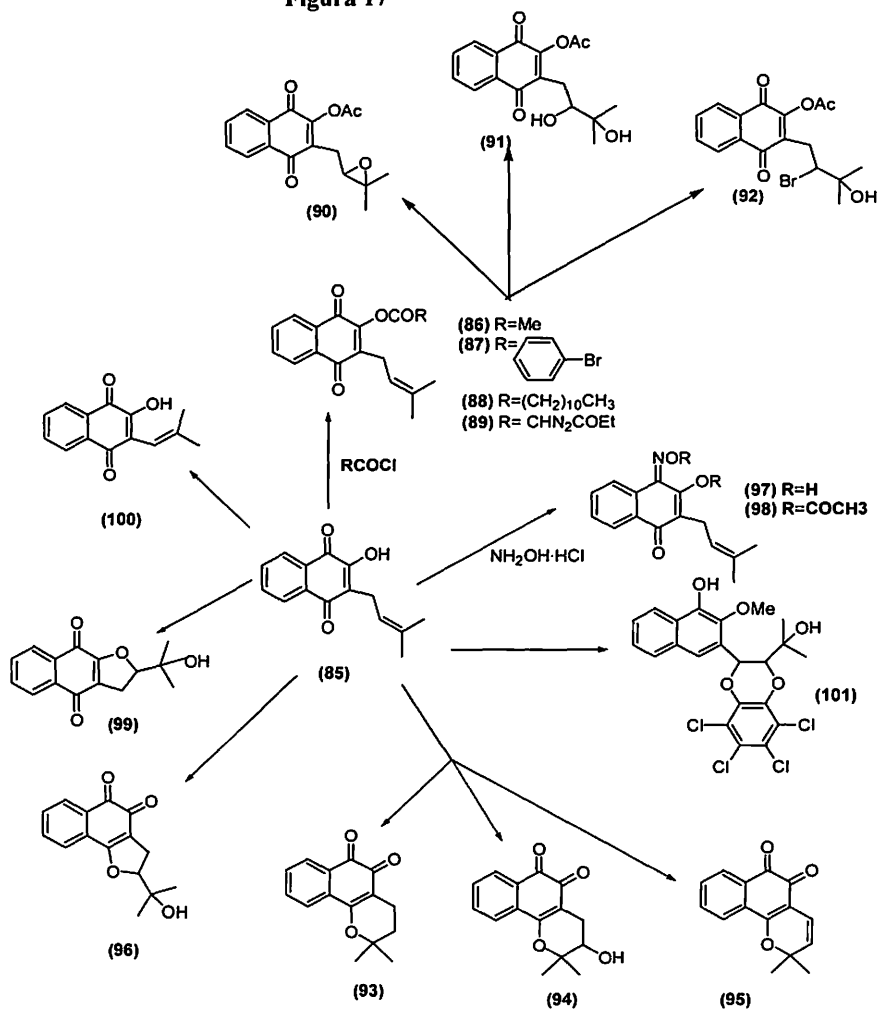
Dichos ensayos consisten en la incubación de células Raji, derivadas de linfomas de Burkitt que soportan el virus de Epstein-Barr, junto con phorbol (TPA), promotor de la actividad oncogénica del virus y diferentes cantidades de los compuestos cuya actividad queremos determinar. Mediante técnicas indirectas de inmunofluorescencia se determinó el porcentaje de inducción de antígenos tempranos del VEB, responsables de la iniciación de tumores<sup>40</sup>.

Hasta el momento presente hemos evaluado la actividad de un total de diecisiete naftoquinonas, de diferentes tipos, furano y piranonaftoquinonas angulares y lineales, naftoquinonas sencillas y derivados con nitrógeno y otros heteroátomos<sup>41-43</sup>. Se han estudiado quince sesquiterpenos con esqueleto básico de dihidro- $\beta$ -agarofurano, cinco de ellos con estructura polihidroxilada tipo 8-epi-4 $\beta$ -hidroxialato<sup>38,44</sup>, seis con esqueleto de 2 $\alpha$ ,4 $\beta$ -dihidroxi-celorbicol, dos de ellos con esqueleto de 3-deoximaitol, uno de la serie de la eunominina y uno de la serie 4 $\beta$ -dihidroxi-celorbicol.

#### **B-a) Actividad quimiopreventiva de productos que contienen sistemas aftyquinónicos.**

Las especies que contienen lapachol (1), una prenilnaftoquinona aislada de la madera de *Tabebuia impetiginosa* (Bignoniaceae)<sup>45</sup> y algunas naftoquinonas biológicamente relacionadas (por ejemplo: tahaebo, pau d'arco y lapachoroxo) se han usado generalmente en la medicina popular iberoamericana para el tratamiento del cáncer y de infecciones<sup>46</sup>. Por ello nos pareció interesante evaluar el posible potencial quimiopreventivo de una serie de derivados naftoquinónicos obtenidos a partir de lapachol (1) por reacciones de acilación, ciclación o modificación en la cadena lateral<sup>41</sup> (Figura 17).

Figura 17



Los resultados obtenidos se encuentran recogidos en la siguientes referencias 40-42 y 45.

Del análisis de dichos datos se puede deducir que los compuestos 86, 90, 91, 92 y 99 actúan como valiosos agentes en la quimioprevención del cáncer.

**Tabla 10:** Porcentajes de inducción de antígenos tempranos de virus Epstein-Barr en presencia de los compuestos 85-101.

Compuesto	1000	500	100	10
85	17.5 <sup>b</sup> (70)	44.6	63.6	97.8
86	0 (70)	22.7	56.0	82.1
87	21.3 (70)	48.0	71.9	100
88	17.3 (60)	49.5	76.9	100
89	16.9 (60)	46.7	72.5	100
90	2.5 (70)	33.8	61.3	89.3
91	4.7 (70)	35.2	62.4	90.2
92	5.2 (70)	38.5	63.7	91.7
93	14.7 (60)	45.9	71.6	100
94	23.6 (60)	50.3	73.9	100
95	19.9 (70)	47.8	68.5	100
96	20.7 (70)	49.7	73.7	100
97	10.5 (60)	42.2	66.2	94.8
98	12.3 (60)	40.6	63.9	92.9
99	7.7 (60)	40.8	65.0	92.5
100	15.7 (60)	43.1	68.2	96.3
101	14.6 (60)	41.7	64.0	94.7
$\beta$ - caroteno	8.6 (70)	34.2	82.1	100

Los valores entre paréntesis representan los porcentajes de viabilidad de células Raji. Relación molar/TPA (32 pmol=20 ng/ mL), 1000 rml = 32 nmol, 500 rml= 16 nmol, 100 rml = 3.2 nmol y 10 rml = 0,32 nmol. Los valores representan los porcentajes de inducción de AT-VEB, en la presencia de los compuestos relativos a un control 100.

A continuación mostramos conclusiones sobre relaciones Estructura-Actividad

*a) Modificaciones del grupo hidroxilo*

Los derivados **86-89** fueron obtenidos mediante reacciones de acilación de lapachol y una variedad de agentes de distinta lipofilia y carácter estereoelectrónico. Los derivados **87, 88** y **89** presentan actividades similares al lapachol. El derivado acetilado **86** resultó ser más activo que **85**, resultando más efectivo que el  $\beta$ -caroteno, un precursor de la vitamina A que ha sido ampliamente estudiado en la prevención del cáncer usando animales. Concluyéndose que la introducción en el grupo hidroxilo de grupos aceptores de puentes de hidrógeno conduce a derivados activos cuando dicho grupo no es voluminoso.

*b) Modificaciones en la cadena lateral*

El compuesto **90**, que presenta una cadena lateral con un átomo de carbono menos y fue obtenido a partir de **85** por oxidación de Hooker<sup>48</sup> mostró una importante actividad inhibitoria (10,7% de la inhibición fue inducida a 10 mol ratio/TPA). Las modificaciones sobre la cadena lateral del compuesto **86** llevaron a los compuestos **91, 92** y **93**, la actividad de estos derivados es mejor que la del lapachol pero no es mejor con respecto al derivado acetilado **86**. La sustitución del doble enlace en la cadena lateral isoprenílica por diferentes funcionalidades produce un descenso de la actividad inhibitoria, esto indica que la presencia del doble enlace en los derivados tipo 1,4-naftoquinona es necesaria para conseguir unos buenos niveles de actividad inhibitoria.

c) *Modificaciones en el C-1 del grupo carbonilo*

La reacción de **85** con hidroxilamina/ HCl proporcionó el producto **95**, el cual se acetiló para dar **96**. Los compuestos **95** y **96** fueron bastante menos activos que el lapachol, indicándonos que la presencia del grupo carbonilo en la posición **85** es imprescindible para la actividad quimiopreventiva.

d) *Reacciones de ciclación*

El tratamiento de **85** con AMCPB rindió vía un intermedio tipo epóxido la orto-dihidrofuranoquinona angular **97**, el derivado pirano **98** y la 1,4-naftoquinona lineal **99**. El derivado  $\beta$ -lapachona **100** y su isómero  $\alpha$  se obtuvieron por tratamiento de **85** con  $H_2SO_4$  vía un intermedio catiónico. Los derivados tricíclicos, tanto lineales como angulares, presentaron buenas actividades, en especial los del tipo furano. Con respecto a los anillos de seis miembros, el que presentó mejor actividad fue el producto **98**, que posee un grupo hidroxilo. Los compuestos **97**, **98** y **99** tienen el sistema *o*-quinona a diferencia del lapachol. En general, el aumento de planaridad en la molécula produce mejoras en la actividad quimiopreventora de tumores.

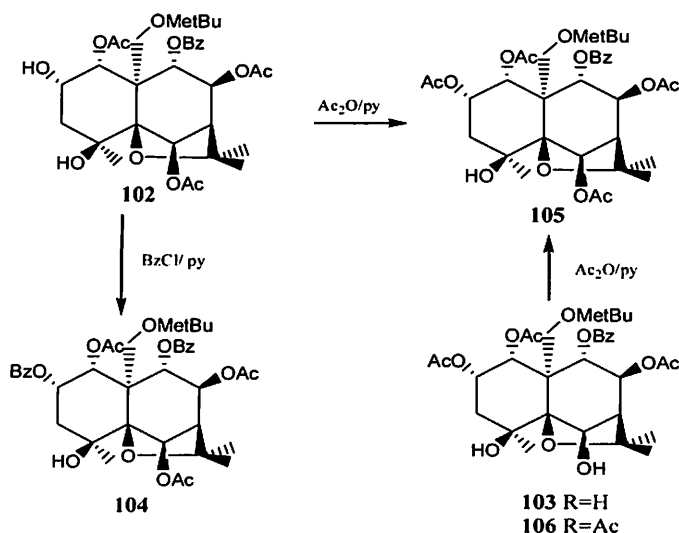
**B-b) Actividad quimiopreventiva de productos con esqueleto de sesquiterpeno.**

Otros compuestos que han presentado una importante actividad antipromotora de tumores son los sesquiterpenos agarofuránicos. Este tipo de productos se aislan de la familia Celastraceae, pudiéndose considerar marcadores quimiotaxonómicos de la misma. Alguno de ellos han mostrado importantes bioactividades como el evitar que se produzcan resistencias a fármacos como daunomicina en líneas celulares de leishmania<sup>43a</sup> con fenotipo de resistencia.

En nuestro laboratorio hemos aislado y caracterizado varias decenas de estos productos y hemos publicado diversos trabajos sobre la determinación de la configuración absoluta de nuevos sesquiterpenos con esqueleto de dihidro- $\beta$ -agarofurano, que en algún momento ha generado controversias y al cual le hicimos una importante aportación con estudios de diroísmo circular que definitivamente evitaron dudas<sup>43b</sup>.

Así de la especie *Crossopetalum tonduzii*, una planta procedente de Panamá, hemos aislado los sesquiterpenos **102-106** (ver Figura 18). Para la elucidación estructural hemos usado datos espectroscópicos de Resonancia Magnética Nuclear  $^1H$  y  $^{13}C$ , correlaciones HSQC, HMBC y ROESY.

Figure 18



Los compuestos **102-106** fueron evaluados para determinar su actividad quimiopreventiva inducida por TPA. Los datos de actividad obtenidos se recogen en la Tabla 11.

**Tabla 11:** Porcentajes de inducción de antígenos tempranos de virus Epstein-Barr en presencia de los compuestos **102-106**.

Concentración (molratio/TPA) <sup>a</sup>	102	103	104	105	106	$\beta$ -caroteno
1000	0 <sup>b</sup> (60)	0 (60)	4.6 (60)	0 (70)	0 (70)	8.6 (70)
500	31.2	32.7	33.8	22.0	21.8	34.2
100	73.7	74.0	75.9	79.2	77.4	82.1
10	90.56	90.1	96.0	96.7	94.1	100

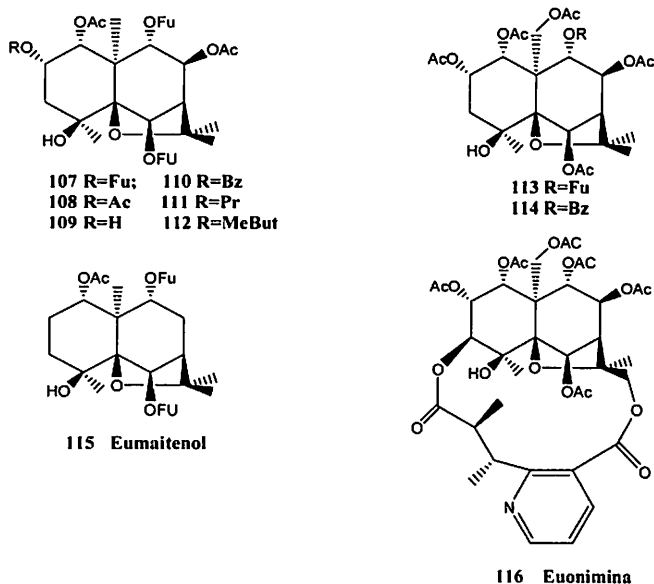
<sup>a</sup>Los valores entre paréntesis representan los porcentajes de viabilidad de células Raji.

Relación molar/TPA (32 pmol=20 ng/ mL), 1000 rnmol = 32 nmol, 500 rnmol= 16 nmol, 100 rnmol = 3.2 nmol y 10 rnmol = 0,32 nmol. <sup>b</sup>Los valores representan los porcentajes de inducción de AT-VEB, en la presencia de los compuestos relativos a un control 100.

Los compuestos **102**, **103** y **106** presentaron fuerte actividad inhibitoria. Este trabajo se encuentra publicado en la referencia 43.

En otro trabajo<sup>37</sup> publicado en el año 2000 dimos cuenta del aislamiento de otros sesquiterpenos de *Maytenus cuzcoina*. En total fueron 10 sesquiterpenos (**107-116**) (Figura 19) con esqueleto de dihidro- $\beta$ -agarofuránico, que también fueron ensayados para evaluar su potencial quimiopreventivo (Tabla 12).

**Figura 19**



**Tabla 12:** Porcentajes de inducción de antígenos tempranos de virus Epstein-Barr en presencia de los compuestos 107-116.

Concentración (molratio/TPA) <sup>a</sup>	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116
1000	0 <sup>b</sup> (70)	0 (70)	0 (70)	11.0(60)	6.3(70)	0 (70)	0 (70)	12.6(60)	10.5(70)	26.4(70)
500	32.2	27.4	28.5	42.9	34.9	32.7	25.9	48.0	40.2	59.6
100	76.9	74.8	76.7	87.1	77.9	78.0	72.0	86.9	84.6	86.7
10	94.6	93.0	95.8	100	100	96.2	91.0	100	100	100

<sup>a</sup>Los valores entre paréntesis representan los porcentajes de viabilidad de células Raji.

Relación molar/TPA (32 pmol=20 ng/ mL), 1000 nmol = 32 nmol, 500 nmol= 16 nmol, 100 nmol = 3.2 nmol y 10 nmol = 0,32 nmol.

<sup>b</sup>Los valores representan los porcentajes de inducción de AT-VEB, en la presencia de los compuestos relativos a un control 100.

Los compuestos 107-109, 112 y 113 presentan fuerte actividad antipromotora de tumores. Las actividades inhibitorias de estos compuestos son mayores que los productos tales como glicirrhizina y ácido retinoico, los cuales se presentan como típicos promotores antitumorales.

**Nuestros resultados indican que nos encontramos con dos nuevas familias de productos naturales cuyas prometedoras actividades nos obligarán en el futuro a encontrar nuevos metabolitos relacionados, al igual que productos sintéticos más potentes y selectivos.**

Nuevos estudios de actividad inhibitoria de promotores de tumores se realizarán sobre los productos de naturaleza naftoquinónica 86, 90, 91, 92, 99, los cuales resultaron más potentes que el  $\beta$ -caroteno.

Los compuestos 102, 103, 106-109, 112 y 113, todos ellos con un esqueleto sesquiterpénico, y más potentes que los compuestos patrones conocidos, actualmente se encuentran sometidos a estudios de investigación biológica en estadios más avanzados. También concluimos que los frutos de *Maytenus cuzcoina* podrían ser un efectivo recurso de agentes preventivos. Estos resultados se encuentran recogidos en las referencias 37 y 43.

### **C) Actividad revertidora de la multirresistencia a fármacos antitumorales**

Muchos autores han considerado que *leishmania* es un excelente modelo para la búsqueda de actividad antitumoral. Por eso, nuestros estudios se iniciaron con *leishmania* y se continuaron con cáncer.

En el caso específico de la leishmaniasis, una infección causada por diversas especies del género *Leishmania*, parásito protozooario quinetoplástico de la familia *Trypanosomatidae*. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la leishmaniasis se ha incrementado un 42% en los últimos 15 años, convirtiéndose en la segunda causa de muerte producida por protozoarios a nivel mundial<sup>50</sup>.

La ausencia de vacunas, así como la deficiencia en el control de los vectores, hace que el empleo de la quimioterapia sea el arma más efectiva en la lucha contra estas enfermedades infecciosas<sup>51</sup>.

Hasta ahora, y desde 1940, las drogas más recomendadas y utilizadas son los compuestos antimoniales pentavalentes, como meglumina antimonio (Glucantime, Aventis) y el estibogluconato de sodio (Pentostam, GlaxoSmithKline)<sup>52-54</sup>. En la India, alrededor del 50% de los casos de *leishmania* visceral son resistentes al Glucantime, debido a la aparición de líneas de *Leishmania donovani* resistente a los compuestos antimoniales. Existen fármacos alternativos o formulaciones conjuntas de fármacos, como la anfotericina B liposomal, para leishmania visceral y paramomicina tópica, para leishmaniasis cutánea. Sus mayores inconvenientes son el alto costo y escasa disponibilidad de los mismos<sup>55</sup>. Normalmente, son usadas cuando hay resistencia a los compuestos antimoniales.

Por otro lado, alquil-fosfolípidos (ALP), como la miltefosina y la edelfosina, han demostrado una significativa actividad antiproliferativa contra parásitos como *Leishmania* spp., *Tripanosoma cruzii* y *Tripanosoma brucei*<sup>56-61</sup>. La miltefosina es el primer fármaco que, por vía oral, es altamente efectivo contra leishmaniasis visceral en la India, lo cual ha sido demostrado en pacientes resistentes a compuestos antimoniales<sup>62</sup>, incluyendo un caso de un paciente con coinfección VIH/*Leshimania*<sup>63</sup>.

**La habilidad de las células cancerosas a desarrollar resistencia a fármacos citotóxicos no relacionados estructural y funcionalmente, es denominada multirresistencia a fármacos (MDR), lo cual ha constituido el principal impedimento para el éxito de la quimioterapia<sup>64</sup>.**

Estos hechos hacen que en las últimas dos décadas, haya aumentado el interés por los inhibidores de la glicoproteína-P como el principal mecanismo para revertir la MDR en los cánceres<sup>65</sup> o prevenir su aparición<sup>66</sup>.

Tumores que no responden satisfactoriamente a la quimioterapia, han dado respuesta positiva a tratamientos clínicos con moduladores MDR<sup>67,68</sup>. Sin embargo, muchos de estos moduladores que han demostrado actividad en los ensayos *in vitro*, han resultado ser MDR en los pacientes, así como tóxicos a altas dosis<sup>69</sup>.

La sobreexpresión de Pgp le provee a la célula resistencia contra un largo número de fármacos hidrofóbicos antitumorales (fármacos MDR), como las antraciclina, actinomicina D, alcaloides de la *Vinca*, colchicina y taxanos, entre otros<sup>70</sup>.

Según estudios etnobotánicos, extractos de plantas de la familia Celastraceae, han sido usadas por siglos en la medicina tradicional

### **C-a) Actividad revertidora de sesquiterpenos dihidro-β-agarofuranos**

Recientemente, hemos publicado que sesquiterpenos con esqueleto dihidro-β-agarofurano son buenos moduladores del fenotipo MDR en células eucariotas, revertiendo significativamente la resistencia a Pgp de los transportadores de daunomicina.

De las partes aéreas de *Crossopetalum tonduzii* se han aislado ocho compuestos de esta serie, cinco de los cuales se han publicado por primera vez en la literatura científica, (Tabla 13), y un noveno compuesto de *Maytenus macrocarpa* (R. and P.) Buquet, los cuales son efectivos en la reversión de la resistencia de la daunomicina (DNM) en una línea MDR de *L. tropica*, y su unión al dominio enlazante C-terminal del nucleótido recombinante (NBD2) de transportadores Pgp de *Leishmania*, lo cual ha permitido un mayor entendimiento sobre el modo y sitio de acción molecular de estos compuestos en las Pgp<sup>72</sup>. Igualmente, derivados de esta serie fueron aislados de las raíces de *Celastrus orbiculatus*, y resultaron efectivos como revertidores completos o parciales del fenotipo MDR en células cancerosas<sup>73</sup>.



**Tabla 13.** Afinidad enlazante a *Leishmania* NBD2<sup>a</sup> de los sesquiterpenos 118-126, aislados de *Crossopetalum tonduzi*, y 127 de *Maytenus macrocarpa*

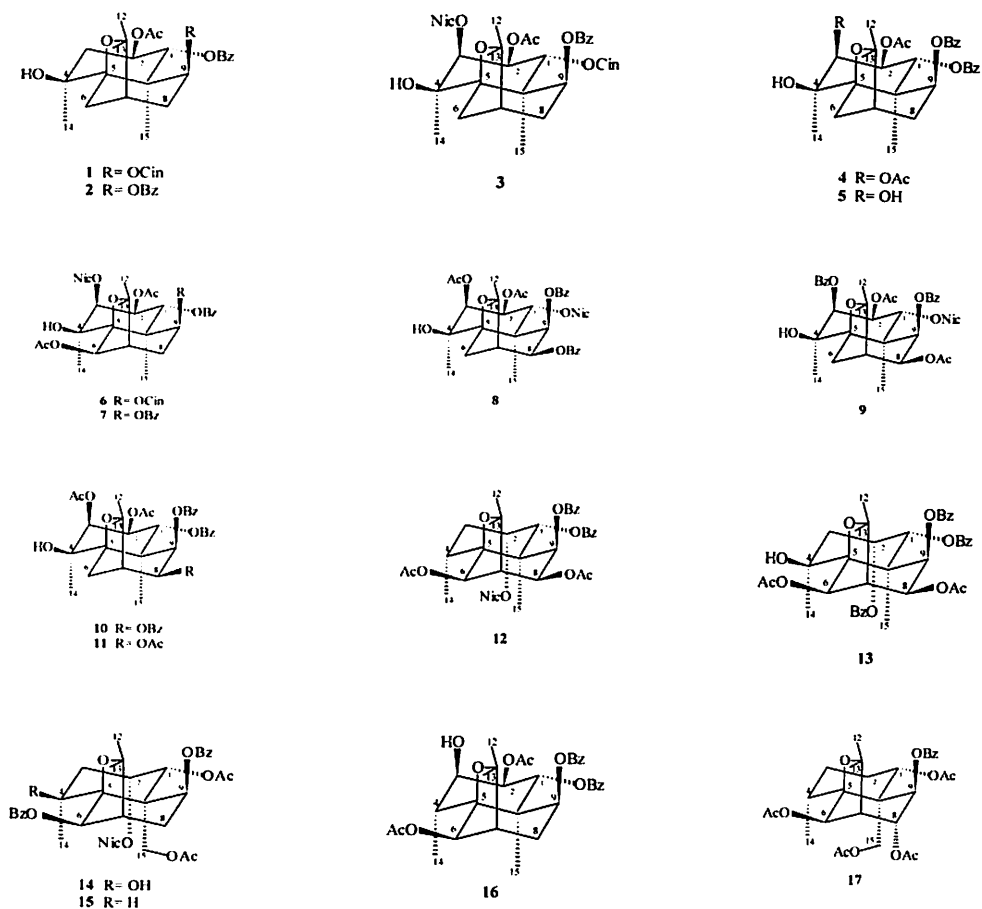
Compuesto	R1	R2	R3	R4	R5	R6	% a 50 $\mu$ M <sup>b</sup>
118	OH	ONic	OH	$\beta$ OAc	$\alpha$ OBz	OMeBut	31.1
119	OAc	OAc	OAc	$\beta$ OAc	$\alpha$ OBz	OMeBut	22.8
120	OAc	OAc	OH	$\beta$ OAc	$\alpha$ OBz	OMeBut	30.8
121	OAc	OAc	OAc	$\alpha$ ONic	$\beta$ OBz	OMeBut	31.8
122	OAc	H	OAc	$\alpha$ ONic	$\beta$ OBz	OMeBut	34.3
123	OBz	OH	OAc	$\beta$ OAc	$\alpha$ OBz	OMeBut	N.D.
124	OBz	OH	OH	$\beta$ OAc	$\alpha$ OBz	OMeBut	31.4
125	OAc	OH	OH	$\beta$ OMeBut	$\alpha$ OBz	OMeBut	27.5
126	OAc	H	OAc	$\beta$ OAc	$\alpha$ OBz	OAc	27.0

<sup>a</sup>El dominio NBD2 fue incubado, bajo condiciones previamente descritas en la parte experimental, de la referencia 72.

<sup>b</sup>La disminución de fluorescencia intrínseca fue representado como una función de la concentración, y el apagado producido a 50 $\mu$ M fue determinado gráficamente. N.D., no determinado debido a la alta fluorescencia intrínseca de este compuesto.

Por otro lado, del extracto de la corteza de las raíces de dos plantas chilenas del género *Maytenus* (Celastraceae), se han aislado diez nuevos compuestos con esqueleto dihidro- $\beta$ -agarofurano, además de siete compuestos publicados previamente por otros autores, *M. magellanica* (1-14), y *M. chubutensis* (15-17) (Figura 20). Catorce de estos (1-3 y 6-16), fueron analizados en la sobreexpresión de los transportadores de Pgp en *L. tropica*, con el fin de determinar su habilidad para revertir la resistencia al fenotipo, así como para modular la acumulación intracelular de fármacos<sup>74</sup>. De esta serie, los compuestos 1, 2, 3, 14 y 15 mostraron una actividad muy potente, siendo 1 el más activo de todos (Tabla 14).

Figura 20. Sesquiterpenos aislados de *Maytenus magellanica* y *Maytenus chubutensis*



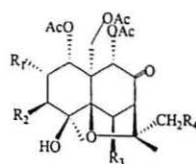
Com p	Inhibición del Crecimiento <sup>a</sup> (%)					
	30		15 $\mu$ M		7,5 $\mu$ M	
	Wt	$\mu$ M DNM- R150	Wt	DNM- R150	Wt	DNM- R150
1	7.5 $\pm$ 7.5	94.3 $\pm$ 3.5	7.3 $\pm$ 8.9	92.8 $\pm$ 3.6	0.0 $\pm$ 0.0	88.2 $\pm$ 6.7
2	13.3 $\pm$ 14.6	94.0 $\pm$ 2.6	4.1 $\pm$ 5.8	89.7 $\pm$ 7.5	5.3 $\pm$ 7.4	82.0 $\pm$ 9.2
3	7.5 $\pm$ 7.3	94.7 $\pm$ 2.2	3.7 $\pm$ 4.7	90.3 $\pm$ 7.2	2.5 $\pm$ 3.5	82.0 $\pm$ 1.7
6	1.9 $\pm$ 2.0	45.0 $\pm$ 10.0	1.5 $\pm$ 2.1	13.5 $\pm$ 3.5	1.5 $\pm$ 2.1	7.3 $\pm$ 4.4
7	3.7 $\pm$ 2.9	69.5 $\pm$ 0.7	0.7 $\pm$ 0.9	30.7 $\pm$ 1.1	2.2 $\pm$ 3.1	10.0 $\pm$ 4.3
8	11.0 $\pm$ 7.6	89.0 $\pm$ 0.0	6.0 $\pm$ 2.8	54.0 $\pm$ 6.5	0.5 $\pm$ 0.7	23.9 $\pm$ 5.7
9	19.7 $\pm$ 4.1	69.7 $\pm$ 10.1	12.9 $\pm$ 5.4	44.0 $\pm$ 15.6	0.0 $\pm$ 0.0	21.4 $\pm$ 9.4
10	20.5 $\pm$ 7.2	93.0 $\pm$ 1.4	15.8 $\pm$ 6.8	79.0 $\pm$ 8.5	0.5 $\pm$ 0.7	48.7 $\pm$ 9.0
11	23.0 $\pm$ 2.0	90.0 $\pm$ 4.2	14.4 $\pm$ 20.4	65.0 $\pm$ 6.4	1.7 $\pm$ 2.3	39.0 $\pm$ 8.4
12	13.3 $\pm$ 13.0	94.5 $\pm$ 2.1	13.0 $\pm$ 2.8	79.3 $\pm$ 10.7	1.7 $\pm$ 1.0	42.2 $\pm$ 9.8
13	16.2 $\pm$ 1.9	92.0 $\pm$ 2.8	19.7 $\pm$ 6.6	82.2 $\pm$ 12.1	9.7 $\pm$ 2.3	60.3 $\pm$ 10.2
14	45.0 $\pm$ 10.0	94.8 $\pm$ 3.6	25.8 $\pm$ 1.7	91.3 $\pm$ 7.0	8.2 $\pm$ 8.2	80.7 $\pm$ 9.0
15	35.0 $\pm$ 10.0	93.7 $\pm$ 3.5	27.5 $\pm$ 7.7	87.9 $\pm$ 9.9	11.5 $\pm$ 0.7	83.7 $\pm$ 6.1
16	11.7 $\pm$ 3.7	77.5 $\pm$ 11.3	3.5 $\pm$ 4.9	54.0 $\pm$ 14.5	0.0 $\pm$ 0.0	32.0 $\pm$ 11.6

**Tabla 14.** Efecto de los Sesquiterpenos de *M. magellanica* y *M. chubutensis* en la Citotoxicidad de DNM en una Línea MDR de *L. tropica* Line

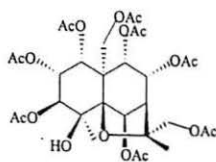
<sup>a</sup>Parásitos Silvestres (WT) y parásitos MDR (DNM-R150) fueron expuestos a 30, 15 y 7.5  $\mu$ M de diferentes sesquiterpenos, en ausencia o presencia de 150  $\mu$ M DNM, respectivamente. Los resultados son expresados como porcentaje de la inhibición del crecimiento relativa al crecimiento del control en ausencia de los sesquiterpenos. Los datos mostrados son un promedio de tres experimentos independiente  $\pm$  SD

De las hojas de *Maytenus chiapensis* fueron aislados cinco nuevos sesquiterpenos del mismo esqueleto (Figura 21), los cuales fueron ensayados igualmente en una línea MDR de *L. tropica* sobreexpresada en los transportadores de glicoproteína-P. De esta serie, sólo uno de ellos (compuesto 4) mostró una actividad muy débil (28% de inhibición del crecimiento a 60  $\mu$ M)<sup>75</sup>.

Figura 21. Sesquiterpenos aislados de *Maytenus chiapensis*



- 1  $R_1 = R_3 = \text{OAc}; R_2 = R_4 = \text{H}$
- 2  $R_1 = \text{OAc}; R_2 = R_4 = \text{H}; R_3 = \text{OH}$
- 3  $R_1 = R_3 = \text{OH}; R_2 = R_4 = \text{H}$
- 4  $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = \text{OAc}$



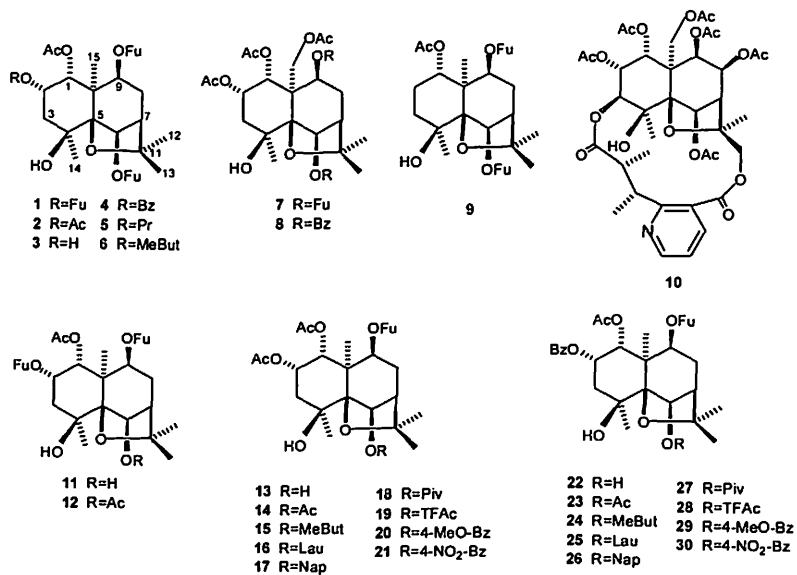
5

Considerando estos sesquiterpenos como “*estructuras privilegiadas*” hemos realizado un estudio de Estructura-Actividad tipo 3D-QSAR<sup>76</sup> de 30 sesquiterpenos (Figura 22) que presentan este esqueleto dihidro-β-agarofurano, 10 de los cuales fueron aislados de *Maytenus cuzcoina*<sup>77</sup> y 20 derivados semisintéticos, que no han sido descritos en la literatura previamente.

El estudio de actividad se realizó en una línea de crecimiento MDR de *L. tropica* en presencia de daunomicina (DNM) usando el ensayo basado en MTT. Su citotoxicidad intrínseca fue determinada usando la misma concentración de moduladores, tanto en parásitos silvestres (WT), como en parásitos MDR en ausencia de daunomicina. Después de 72 h. de incubación en presencia de 150 μM de DNM en cantidades crecientes de sesquiterpenos, la respuesta de los parásitos MDR fue observada y comparada con parásitos control, creciendo a la misma concentración de DNM, pero en ausencia del modulador. En este caso, la quimiosensibilización más eficaz a 150 μM de DNM la exhibieron los compuestos **2** y **4-8**<sup>78</sup> (Tabla 15). Todos los derivados químicos (compuestos **11-30**), fueron inactivos o menos activos que sus predecesores.



**Figura 22.** Sesquiterpenos de *M. cruzcoina* ensayados en la quimio-sensibilización de Líneas MDR de *Leishmania. Tropicana*



**Tabla 15.** Efecto de los sesquiterpenos de *Maytenus cuzcoina* en el crecimiento de Líneas de *L. tropica* WT y MDR.

compd	growth inhibition <sup>a</sup> (%)							
	15 $\mu$ M		7 $\mu$ M		3 $\mu$ M		1 $\mu$ M	
	WT	MDR	WT	MDR	WT	MDR	WT	MDR
1	23.4 + 3.1	93.5 $\pm$ 1.7	18.1 $\pm$ 6.4	86.2 = 0.2	13.8 $\pm$ 4.9	52.9 $\pm$ 10.1	- <sup>b</sup>	10.0 $\pm$ 9.8
2	15.2 $\pm$ 3.5	94.4 $\pm$ 1.8	9.7 $\pm$ 6.5	90.9 = 2.1	-	83.5 $\pm$ 9.2	-	24.5 $\pm$ 0.7
3	-	28.7 $\pm$ 8.1	-	9.1 = 6.3	-	-	-	-
4	35.3 $\pm$ 5.8	92.7 $\pm$ 5.5	21.4 $\pm$ 8.6	93.7 = 1.5	16.5 $\pm$ 4.1	74.8 $\pm$ 5.9	-	11.7 = 4.7
5	26.8 $\pm$ 2.9	95.8 $\pm$ 1.6	20.6 $\pm$ 2.5	94.8 $\pm$ 4.5	15.9 $\pm$ 5.7	89.1 $\pm$ 3.4	-	30.3 $\pm$ 2.5
6	31.5 $\pm$ 6.2	94.7 $\pm$ 2.5	24.9 $\pm$ 8.0	92.0 = 1.6	21.8 $\pm$ 7.7	87.6 $\pm$ 3.8	-	25.7 = 7.5
7	7.2 $\pm$ 6.0	94.3 $\pm$ 3.0	-	89.5 = 2.0	-	79.6 $\pm$ 6.8	-	25.7 = 7.6
8	15.2 $\pm$ 5.6	90.9 $\pm$ 5.0	11.0 $\pm$ 6.6	89.9 = 5.2	6.9 + 6.9	77.5 $\pm$ 5.0	-	18.0 $\pm$ 7.1
9	24.6 $\pm$ 7.1	89.9 $\pm$ 4.8	16.4 + 4.9	89.0 = 1.3	14.8 $\pm$ 2.8	66.9 $\pm$ 9.9	-	20.3 = 5.1
10	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	44.5 $\pm$ 2.1	-	28.5 = 13.4	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	10.9 + 7.9	-	-	-	-	-	-
14	-	50.6 + 9.3	-	17.1 = 6.7	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	80.5 $\pm$ 4.5	-	29.2 = 10.6	-	8.8 + 1.3	-	-
17	10.6 $\pm$ 0.6	95.2 $\pm$ 1.3	-	50.7 $\pm$ 8.5	-	16.5 $\pm$ 8.8	-	-
18	-	96.7 $\pm$ 0.0	-	82.5 + 5.9	-	44.5 $\pm$ 1.0	-	18.1 $\pm$ 7.4
19	-	7.1 $\pm$ 2.7	-	-	-	-	-	-
20	17.2 $\pm$ 0.6	98.4 $\pm$ 0.7	-	85.0 $\pm$ 3.2	-	35.4 $\pm$ 8.6	-	11.9 $\pm$ 6.7
21	-	59.5 $\pm$ 2.8	-	15.5 $\pm$ 3.0	-	-	-	-
22	8.0 $\pm$ 4.6	81.9 $\pm$ 3.3	-	41.1 $\pm$ 6.7	-	11.1 = 9.1	-	-
23	-	45.0 $\pm$ 5.2	-	14.3 $\pm$ 7.3	-	-	-	-
24	-	28.0 $\pm$ 9.2	-	10.4 $\pm$ 6.3	-	-	-	-
25	-	9.2 + 4.2	-	-	-	-	-	-
26	-	8.6 $\pm$ 3.5	-	-	-	-	-	-
27	-	77.6 $\pm$ 4.5	-	25.9 + 3.5	-	11.2 $\pm$ 4.7	-	-
28	-	36.9 $\pm$ 4.6	-	9.7 $\pm$ 2.3	-	-	-	-
29	-	11.8 $\pm$ 0.7	-	-	-	-	-	-
30	10.8 $\pm$ 2.5	51.1 $\pm$ 4.1	-	26.4 + 1.3	-	13.5 $\pm$ 4.4	-	6.4 $\pm$ 3.7

<sup>a</sup>Parásitos WT y MDR fueron expuestos a 15, 7, 3 y 1  $\mu$ M de diferentes sesquiterpenos, en la ausencia o presencia de 150  $\mu$ M de DNM, respectivamente. Los resultados son expresados como porcentaje de inhibición del crecimiento relativo al control de crecimiento en la ausencia de sesquiterpenos. Los datos mostrados son el promedio de tres experimentos independientes  $\pm$  SD. <sup>b</sup>Valores de inhibición del crecimiento entre 0 y 6% son indicados con una línea para su simplicidad.

Con la finalidad de confirmar la habilidad de los sesquiterpenos para superar la resistencia a fármacos, fueron determinados los valores de IC<sub>50</sub> para DNM, de la línea MDR, usando diferentes concentraciones de los sesquiterpenos más activos y selectivos. A 15  $\mu$ M (Tabla 16), los compuestos **2**, **7** y **8** reducen el índice de resistencia (Relación IC<sub>50</sub> entre líneas MDR y WT).

**Tabla 16.** Efecto de los sesquiterpenos **2**, **7**, y **8** (aislados en *M. cuzcoina*) en Valores de IC<sub>50</sub> en una Línea de *L. tropica*.

	MDR						WT	
	7 $\mu$ M			15 $\mu$ M			c	
	2	7	8	2	7	8		
IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> ( $\mu$ M)	30.0 $\pm$ 3.6	33.3 $\pm$ 9.8	39.0 $\pm$ 6.0	9.0 $\pm$ 1.4	11.0 $\pm$ 2.8	20.0 $\pm$ 4.2	290 $\pm$ 24.8	3.8 $\pm$ 0.9
RI <sup>b</sup>	7.8	8.7	10.2	2.3	2.9	5.2	75.5	1

<sup>a</sup>Parásitos WT y MDR fueron expuestos a concentraciones incrementadas de DNM en presencia o en la ausencia de sesquiterpenos a dos concentraciones diferentes (7 y 15  $\mu$ M). Los resultados son expresados como la concentración de DNM necesaria para inhibir el crecimiento de los parásitos en un 50%. Los datos mostrados son el promedio de tres experimentos independientes  $\pm$  SD. <sup>b</sup>Índice de Resistencia. Relación entre el IC<sub>50</sub> de una Línea MDR y el IC<sub>50</sub> de una Línea WT. <sup>c</sup>No fueron usados los sesquiterpenos.

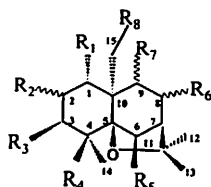
La resistencia a la DNM en la línea MDR de *L. tropica* está relacionada con la disminución intracelular de la acumulación de drogas, principalmente debido a la sobre-expresión de transportadores Pgp.

Afortunadamente, en los últimos 4 años se han registrado en el campo de la leishmaniasis un total de 22 patentes<sup>55</sup>. Nuestro grupo<sup>79</sup> ha publicado en el año 2002 el uso de la *trans*-chalcona (1,3-difenil-2-propen-1-ona) para preparar un fármaco para el tratamiento de leishmaniasis visceral, cutánea y mucocutánea, causada por especies de *L. major*, *L. mexicana*, *L. braziliensis* y *L. panamensis*. Se encontró que la chalcona posee potente actividad leishmanicida *in vitro*, con un valor IC<sub>50</sub> de 0.32 µg/mL frente a la forma prosmatigota de *L. braziliensis*.

Este modelo de líneas resistentes de *Leishmania* sirve de referencia para estudiar el efecto revertidor de MDR en líneas celulares de cánceres humanos. Sesquiterpenos de Celastraceas se unen específicamente a la clicoproteína-P humana y revierten de manera muy eficaz la multirresistencia a fármacos anticancerígenos.

La sobre-expresión de la glicoproteína-P ABCB1 (MDR), una bomba de flujo multifármacos, es uno de los mecanismos por el cual las células tumorales pueden desarrollar multiresistencia a fármacos (MDR), impidiendo así la eficiencia del tratamiento quimioterapéutico del cáncer. Es por esto, que en el estudio de sesquiterpenos de diversas plantas de la familia Celastraceae, incluyendo *M. cuzcoina*, *M. canariensis*, *M. magellanica* y *M. chubutensis* (Figura 23) se analiza la habilidad de los sesquiterpenos tipo dihidro-β-agarofurano para revertir el fenotipo MDR dependiente de la glicoproteína-P, y elucidar su mecanismo de acción molecular<sup>64</sup>. El aislamiento, así como la caracterización y purificación, de estos metabolitos se realiza según lo descrito previamente en la literatura científica<sup>73,76,78</sup>.

Figura 23. Estructura de los sesquiterpenos aislados y caracterizados en *M. cuzcoina*, *M. magellanica*, *M. chubutensis* y *M. canariensis* (OAc, acetato; OBz, benzoato; ONic, nicotinato; OPr, propionato; OMeBut, metilbutirato; OCin, cinamato; OFu, furoato; OH, grupo hidroxilo; H, hidrógeno).



Source and Compound	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>
<i>Maytenus cuzcoina</i>								
Cuzco1	OAc	αOBz	H	OH	OFu	H	βOFu	H
Cuzco2	OAc	αOFu	H	OH	OFu	H	βOFu	H
Cuzco2 hydrolyzed in 6	OAc	αOFu	H	OH	OH	H	βOFu	H
Cuzco2 acetylated in 6	OAc	αOFu	H	OH	OAc	H	βOFu	H
Cuzco3	OAc	H	H	OH	OFu	H	βOFu	H
Cuzco4	OAc	αOMeBut	H	OH	OFu	H	βOFu	H
Cuzco5	OAc	αOAc	H	OH	OFu	H	βOFu	H
Cuzco5 hydrolyzed in 6	OAc	αOAc	H	OH	OH	H	βOFu	H
Cuzco5 acetylated in 6	OAc	αOAc	H	OH	OAc	H	βOFu	H
Cuzco6	OAc	αOPr	H	OH	OFu	H	βOFu	H
Cuzco7	OAc	αOAc	H	OH	OFu	H	βOFu	OAc
Cuzco8	OAc	αOAc	H	OH	OBz	H	βOBz	OAc
Cuzco9	OAc	αOH	H	OH	OFu	H	βOFu	H
<i>Maytenus magellanica</i>								
Mama1	OBz	βOAc	ONic	OH	OAc	H	βOCin	H
Mama2	OBz	βOAc	ONic	OH	OAc	H	βOBz	H
Mama3	ONic	βOAc	OAc	OH	H	βOBz	βOBz	H
Mama4	ONic	βOAc	OBz	OH	H	βOAc	βOBz	H
Mama5	OBz	βOAc	OAc	OH	H	βOBz	βOBz	H
Mama6	OBz	βOAc	OAc	OH	H	βOAc	βOBz	H
Mama7	OCin	βOAc	ONic	OH	H	H	βOBz	H
Mama10	OBz	βOAc	H	OH	H	H	βOCin	H
Mama11	OBz	βOAc	H	OH	H	H	βOBz	H
Mama12	OAc	αONic	H	OH	OBz	H	βOBz	OAc
Mama13	OBz	αONic	H	H	OAc	βOAc	βOBz	H
Mama14	OBz	αOBz	H	OH	OAc	βOAc	βOBz	H
<i>Maytenus chubutensis</i>								
Machu1	OBz	βOAc	OH	H	OAc	H	βOBz	H
Machu4	OAc	αONic	H	H	OBz	H	βOBz	OAc
<i>Maytenus canariensis</i>								
C-3	OAc	H	H	OH	OAc	αOMeBut	αOBz	OAc

La actividad revertidora de la multiresistencia a fármacos *in vitro* de estos sesquiterpenos fue estudiada determinando la citotoxicidad de daunomicina y vinblastina (dos sustratos clásicos de glicoproteína-P) en células NIH-3T3 (células humanas MDR-1 transfectadas) expresado en la glicoproteína (Tabla 17). La relación entre IC<sub>50</sub> en ausencia y presencia de un modulador de glicoproteína-P nos indica el índice revertidor de resistencia, un parámetro que permite comparaciones cuantitativas entre la eficiencia de diferentes moduladores de glicoproteína-P. Este índice de reversión de daunomicina y vinblastina con sesquiterpenos dihidro-β-agarofurano fue determinado a concentraciones incrementadas de cada fármaco citotóxico y 3 concentraciones fijas del sesquiterpeno (10, 3 y 1 μmol/L).

**Tabla 17.** Habilidad Revertidora a la Resistencia a Multifármacos de los Sesquiterpenos, aislados en *M. cuzcoina*, *M. canariensis*, *M. magellanica* y *M. chubutensis*, sobre células NIH-3T3 transfectadas con la proteína MDR1 humana.

Sesquiterpene	Reversal index with daunomycin*			Reversal index with vinblastine†		
	10 μM	3 μM	1 μM	10 μM	3 μM	1 μM
Verapamil‡	16.11 ± 2.50	13.45 ± 1.41	7.04 ± 3.10	18.76 ± 5.00	13.18 ± 0.24	6.21 ± 1.10
Cuzco1	2.82 ± 0.70	2.43 ± 0.55	2.31 ± 0.60			
Cuzco2	10.03 ± 0.60	7.80 ± 0.70	7.10 ± 0.22	20.00 ± 2.00	5.10 ± 1.50	2.10 ± 0.50
Cuzco2 hydrolyzed	1.30 ± 0.60	0.86 ± 0.25	0.80 ± 0.31			
Cuzco2 acetylated	2.90 ± 1.20	1.60 ± 0.62	0.90 ± 0.12			
Cuzco3	11.29 ± 3.00	7.57 ± 2.10	4.23 ± 1.10	15.83 ± 3.50	14.86 ± 2.60	8.98 ± 1.80
Cuzco4	2.90 ± 0.80	2.10 ± 0.40	1.50 ± 0.40			
Cuzco5	21.50 ± 3.26	16.31 ± 4.08	12.52 ± 4.50	29.30 ± 8.00	25.00 ± 3.00	10.90 ± 3.22
Cuzco5 hydrolyzed	1.00 ± 0.10	0.80 ± 0.13	0.80 ± 0.30			
Cuzco5 acetylated	1.60 ± 0.20	1.00 ± 0.40	0.80 ± 0.21			
Cuzco6	4.00 ± 1.20	3.40 ± 1.00	2.80 ± 0.70			
Cuzco7	18.91 ± 0.30	11.76 ± 0.50	7.51 ± 0.24	31.30 ± 5.20	20.86 ± 2.60	14.30 ± 3.40
Cuzco8	4.70 ± 1.30	2.20 ± 0.60	2.00 ± 0.50			
Cuzco9	8.76 ± 1.60	3.66 ± 0.80	1.83 ± 0.70	20.89 ± 5.39	5.40 ± 3.30	2.73 ± 1.90
Mama1	5.00 ± 1.10	3.30 ± 1.10	1.80 ± 0.50			
Mama2	10.50 ± 1.50	4.60 ± 1.00	2.30 ± 0.40			
Mama3	10.70 ± 3.00	4.90 ± 1.00	2.90 ± 0.60			
Mama4	6.00 ± 1.20	5.50 ± 1.10	3.20 ± 1.10	20.00 ± 5.00	16.70 ± 3.00	9.20 ± 3.10
Mama5	26.67 ± 3.00	24.80 ± 4.00	8.70 ± 3.70	125.00 ± 17.00	117.00 ± 22.40	41.70 ± 7.00
Mama6	20.80 ± 5.00	13.90 ± 0.80	2.30 ± 0.40			
Mama7	7.10 ± 4.80	2.70 ± 0.90	1.60 ± 1.00			
Mama10	2.20 ± 0.80	1.40 ± 0.40	1.10 ± 0.40	57.10 ± 9.00	7.40 ± 3.00	3.50 ± 2.00
Mama11	4.10 ± 1.80	2.00 ± 0.10	1.50 ± 0.20	22.20 ± 4.00	5.40 ± 2.00	3.40 ± 2.70
Mama12	21.76 ± 0.90	12.75 ± 0.90	6.13 ± 2.10	87.10 ± 14.00	60.60 ± 11.00	55.60 ± 7.00
Mama13	3.30 ± 1.10	1.60 ± 0.60	1.40 ± 0.40			
Mama14	19.10 ± 4.00	10.30 ± 2.90	5.60 ± 0.80			
Machu1	18.80 ± 4.20	16.00 ± 5.00	11.40 ± 6.30			
Machu4	33.51 ± 3.20	31.11 ± 2.95	11.10 ± 4.80	103.21 ± 13.00	94.48 ± 8.00	33.67 ± 7.90
C-3	16.40 ± 5.20	10.80 ± 1.10	8.20 ± 1.70	63.50 ± 6.00	22.40 ± 4.50	10.32 ± 4.65

NOTA: Screening de los sesquiterpenos revertidores de resistencia a la daunomicina y vinblastina, dependiente de la glicoproteína-P en células NIH-3T3 transfectadas con la proteína MDR1 humana. El índice de reversión fue definido como la relación entre el IC<sub>50</sub> de células sin sesquiterpenos y el IC<sub>50</sub> de células con sesquiterpenos. Los resultados mostrados fueron obtenidos de series de dos a cuatro experimentos, independientes, realizados en triplicado; promedio ± SD (*P* < 0.05).

\*Índice Máximo de Reversión con daunomicina (Relación entre IC<sub>50</sub> de células WT y MDR) es de 27.5

† Índice Máximo de Reversión con vinblastina (Relación entre IC<sub>50</sub> de células WT y MDR) es de 128.3

‡ *Verapamil* es un clásico modulador de glicoproteína-P usado para comparación



Siete de estos sesquiterpenos (Cuzco5, Cuzco7, mama6, mama12, mama14, machu1 y C-3), revierten la resistencia a la daunomicina con eficiencia comparable al verapamil, mientras que mama5 y machu4 son superiores en potencia. Ensayando un subconjunto de sesquiterpenos con vinblastina, fue encontrado el mismo perfil de eficiencia revertidora de resistencia relativa a fármacos, como la descrita previamente. Sin embargo, notoriamente, casi todos los sesquiterpenos ensayados mostraron, sustancialmente, mayor índice de reversión con vinblastina que con daunomicina, y los más potentes (Machu4, Mama5, y Mama12) revierten la resistencia a la vinblastina a  $1\mu\text{mol/L}$ , con potencias 5 a 9 veces mayores que el verapamil. Lo cual nos indica, que a esta baja concentración, los sesquiterpenos previamente mencionados, son capaces de disminuir la resistencia a la vinblastina de células que sobreexpresan MDR1 de 128.3

a valores de 2 a 4 veces más pequeños; la resistencia intrínseca de células tipo silvestre varían su valor de 27.5 a valores de 2 a 3 veces más pequeños en el caso de daunomicina. La toxicidad intrínseca de los sesquiterpenos más potentes, usados a concentraciones superiores a  $10\mu\text{mol/L}$  en células wild-type NIH-3T3 sensibles, fue generalmente menor que con el verapamil ( $43.70 \pm 2.80$ ,  $14.20 \pm 2.20$ ,  $26.40 \pm 1.30$ ;  $18.70 \pm 1.50$ , y  $17.95 \pm 0.05\%$  de inhibición de crecimiento a  $10\mu\text{mol/L}$  para verapamil, Cuzco5, Mama5, Mama12, y Machu4, respectivamente;  $P < 0.05$ ).

**Los sesquiterpenos de Celastraceas son prometedores moduladores de la glicoproteína-P humana con potencial aplicación en quimioterapia del cáncer debido a su eficaz potencia revertidora de multirresistencia y la gran especificidad para glicoproteína-P.**

Una reacción dominó se define como un proceso en el que se forman dos o más enlaces en una sola secuencia (involucrando varias transformaciones), sin aislar intermedios, cambiar condiciones de reacción o añadir reactivos adicionales<sup>81</sup>

El número de enlaces formados, la economía de átomos, la complejidad estructural y funcional introducida en la molécula final, la facilidad de manipulación experimental y las condiciones estequiométricas de los componentes determinarán la eficiencia de una reacción dominó.

Por otro lado, estas reacciones, por su mecanismo intrínseco, hacen que sean procesos más respetuosos con el medio ambiente debido fundamentalmente a la economía de átomos y la reducción de etapas sintéticas, lo que conlleva a una reducción en la formación de productos secundarios, uso de cantidades menores de disolventes y empleo de menos reactivos<sup>82</sup>

Las reacciones dominó son bastante comunes en la naturaleza, aunque la comparación directa y estricta con las reacciones de laboratorio no es posible debido a la implicación de multienzimas capaces de catalizar diferentes pasos.

Un ejemplo ilustrativo de reacción dominó es la biosíntesis de los ácidos grasos a partir de acetato<sup>83</sup>. Este proceso está catalizado por la enzima ácido graso sintasa que, en animales es una proteína multifuncional que posee todas las actividades catalíticas requeridas, mientras que las bacterias y plantas utilizan un conjunto de enzimas.

Las reacciones dominó se clasifican atendiendo al mecanismo del primer paso<sup>1</sup> y así se puede distinguir entre una transformación catiónica, aniónica, radicalaria, pericíclica, fotoquímica y catalizada por metales de transición. Este primer paso puede ser combinado con otras reacciones de estos tipos también en un segundo, tercero e incluso cuarto paso.

La combinación de reacciones del mismo mecanismo es conocido como reacciones **homo-dominó**, mientras que una secuencia de reacciones con diferentes mecanismos son reacciones llamadas **hetero-dominó**.

**Tabla 1. Clasificación de las reacciones dominó de acuerdo al mecanismo de los diferentes pasos.**

1 <sup>er</sup> Paso	2 <sup>o</sup> Paso	3 <sup>er</sup> Paso
1a catiónico	2a catiónico	3a catiónico
1b aniónico	2b aniónico	3b aniónico
1c radicalario	2c radicalario	3c radicalario
1d pericíclico	2d pericíclico	3d pericíclico
1e fotoquímico	2e fotoquímico	3e fotoquímico
1f especie carbenoide	2f especie carbenoide	3f especie carbenoide
1g catalizado por metal de transición	2g catalizado por metal de transición	3g catalizado por metal de transición
1h oxidación-reducción	2h oxidación-reducción	3h oxidación-reducción

Reacciones **homo-dominó** tales como catiónica-catiónica (1a/2a), aniónica-aniónica (1b/2b), radicalaria-radicalaria (1c/2c), pericíclica-pericíclica (1d/2d), y reacciones catalizadas por metales de transición se describen en la bibliografía química frecuentemente. También existe un buen número de referencias de reacciones **hetero-dominó** tipo pericíclica-aniónica (1b/2d) o aniónica-pericíclica-pericíclica (1b/2d/3d) que han sido investigadas durante años.

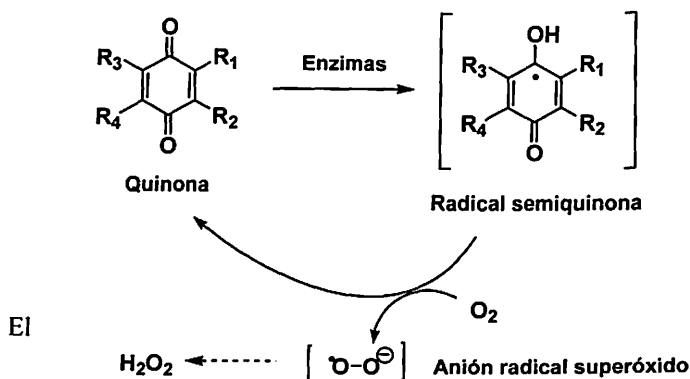
Estamos interesados en la búsqueda de compuestos basados en estructuras privilegiadas para la prevención y tratamiento del cáncer. En este sentido hemos trabajado intensivamente en el desarrollo de pequeñas quimiotecas a partir de productos naturales tales como lapachol, pristimerina y tingenona que han mostrado excelentes propiedades anticancerígenas<sup>87,88,92,90</sup>

Como objetivo concreto en el presente trabajo nos hemos propuesto la preparación de sistemas *bis*-piranobenzoquinona mediante reacciones dominó tipo aniónica-pericíclica basadas en dos reacciones bien conocidas como son la condensación de Knoevenagel y una reacción de hetero Diels-Alder con demanda inversa de electrones.

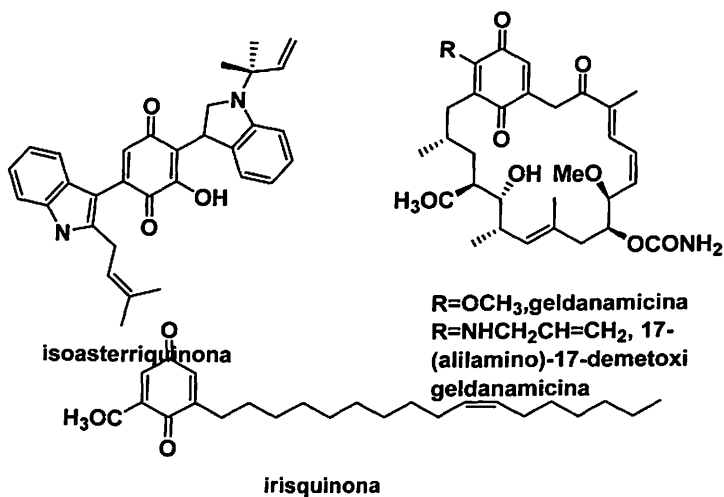
Este tipo de sistemas pensamos que pueden ser potencialmente bioactivo debido a las características estructurales que presentan.

En este sentido, moléculas con estructura quinónica constituyen una de las clases más importantes de compuestos en química orgánica por las interesantes bioactividades que presentan<sup>86</sup>. Entre las actividades descritas destacan las quinonas como anticancerígenas<sup>87</sup>, antimaláricas<sup>88</sup>, bactericidas<sup>89</sup>, herbicidas<sup>90</sup>, fungicidas<sup>91</sup> y reguladoras del crecimiento<sup>92</sup>.

Esta diversidad de bioactividades se relaciona con la distribución de densidad electrónica que presentan, con la habilidad de las quinonas para aceptar uno y/o dos electrones formando el anión radical o el dianión correspondiente y también por sus propiedades ácido-base<sup>93</sup>.

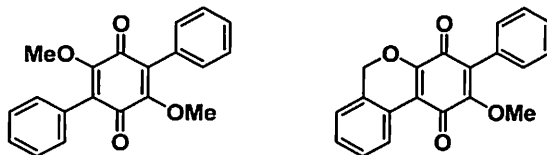


El agrupamiento 1,4-benzoquinona se encuentra presente en muchos productos naturales y compuestos de interés farmacológico y puede ser considerado como una estructura o subestructura privilegiada en química médica, según la definición dada por Evans a aquellas entidades químicas que se unen de manera eficiente a múltiples receptores<sup>94</sup>. Algunos ejemplos representativos<sup>85</sup> son isoasterriquinona y geldanamicina que son potentes inhibidores de tirosina kinasa e irisquinona que es un quimiosensibilizador.



El agrupamiento benzopirano se encuentra también presente en una gran variedad de productos naturales y sintéticos con potenciales actividades. El estudio de amplias quimiotecas de productos que incluye benzopiranos ha sido abordado por el profesor Nicolaou, ratificando la consideración de estructura privilegiada para dicha estructura<sup>95,96,97</sup>

El agrupamiento pirano-1,4-benzoquinona es un agrupamiento poco frecuente en la naturaleza existiendo unos pocos ejemplos tales como betulinan B aislado junto con betulinan A de los esporóforos del hongo *Lenzites betulina*<sup>98</sup>.



El betulinan B posee una potente inhibición de la peroxidación de lípidos con una concentración mínima inhibitoria de 2.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y siendo un excelente atrapador de radicales. El daño peroxidativo de las células y orgánulos de membranas por radicales libres ha estado implicado en la patogénesis de enfermedades tales como aterosclerosis, artritis, isquemia de miocardio y cáncer. El producto betulinan A resultó ser un compuesto cuatro veces más activo que la Vitamina E como atrapador de radicales<sup>99</sup>.

A continuación se muestran las estructuras de otros productos naturales descritos en la bibliografía que poseen un esqueleto de piranobenzoquinona, *bis*-piranobenzoquinona y piranofuranobenzoquinona.

El compuesto metilanhidrovilangina<sup>100</sup> se aisló de las frutas de *Myrsine africana* y *Maesa Lanceolata*.

De los esporóforos de *Hydnellum ferrugineum* y *H. zonatum* se aislaron los pigmentos hydnuferugina e hydnuferuginina cuyo esqueleto básico es una piranobenzoquinona<sup>101</sup>.

Con los datos expuestos anteriormente, que vinculan al agrupamiento 1,4-benzoquinónico y el benzopirano con estructuras privilegiadas y el hecho de que existan pocos metabolitos que presenten la unidad pirano-quinona, y a los que se les ha determinado su bioactividad, han mostrado ser potencialmente bioactivos, pensamos que la preparación de estructuras tipo *bis*-pirano-1,4-benzoquinona podría ser un buen acceso a moléculas bioactivas de interés.

Como objetivos concretos nos hemos planteado:

A) La síntesis de sistemas *bis*-piranobenzoquinona mediante reacciones dominó tipo Knoevenagel-hetero Diels-Alder a partir de 2,5-dihidroxibenzoquinona, formaldehído y alquenos ricos en electrones.

B) Optimización de las condiciones de reacción, tomando como reacción patrón la reacción de 2,5-dihidroxibenzoquinona, paraformaldehído y etil vinil éter.

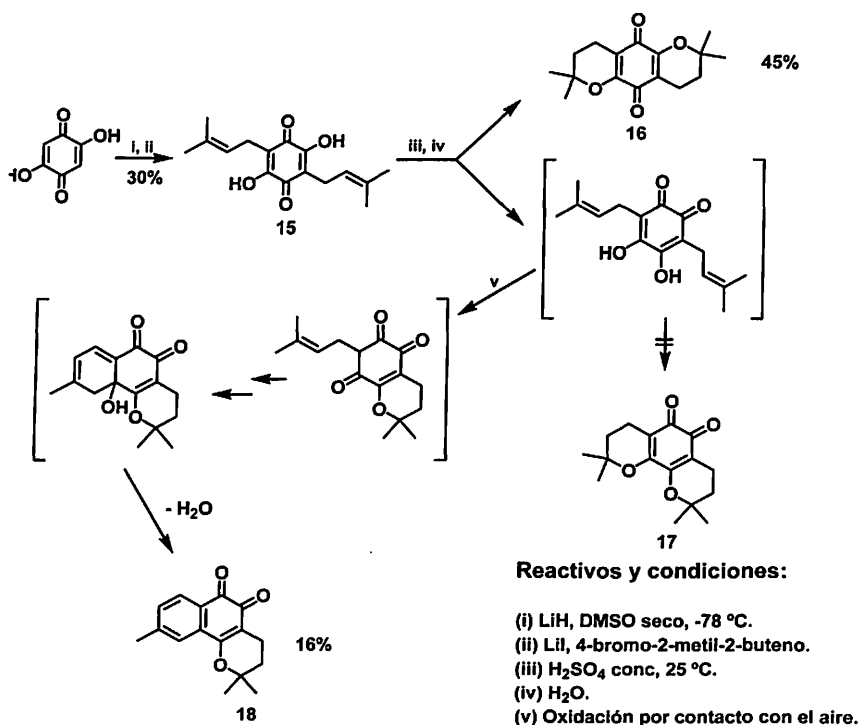
C) Introducir complejidad y diversidad estructural en los sistemas *bis*-piranobenzoquinonas mediante el uso de dienófilos cíclicos.

D) Explorar la versión “dos componentes” de dicha reacción mediante el uso de aldehídos que incluyen en su estructura un doble enlace.

E) Evaluación de la actividad biológica de los productos sintetizados.

Sólo existe en la bibliografía química un ejemplo de síntesis de sistemas *bis*-piranobenzoquinona y es el publicado por Nicolaides y colaboradores<sup>102</sup>. Ellos utilizan una aproximación biomimética basada en una doble alilación de 2,5-dihidroxibenzoquinona y posterior ciclación intramolecular en medio ácido, obteniendo bajos rendimientos en el producto deseado **16**, que es aislado junto con el aducto **18** (Figura 10).

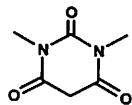
Figura 33: Síntesis de derivados de *bis*-piranobenzoquinona:



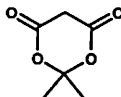
Cuando se trata 2,5-dihidroxi-1,4-benzoquinona con hidruro de litio, yoduro de litio, en DMSO seco, y dos equivalentes de 4-bromo-2-metilbut-2-eno se obtiene el producto 2,5-dihidroxi-3,6-bis(3-metilbut-2-enil)-1,4-benzoquinona **15** con un 30% de rendimiento. Cuando este compuesto fue tratado con ácido sulfúrico concentrado se obtuvieron los aductos 2,2,7,7-tetrametil-3,4,8,9-tetrahydropirano[2,3-*g*]cromen-5(2*H*),10(7*H*)-diona **16** y 2,2,9-trimetil-3,4-dihidro-2*H*-benzo[*h*]cromen-5,6-diona **18** con un rendimiento de 45 y 16% respectivamente. La esperada *o*-quinona **17** no se formó en el medio de reacción.

La síntesis de sistemas *bis*-piranobenzoquinonas, tal y como se ha mencionado en la introducción, se pretende abordar mediante una reacción dominó tipo Knoevenagel hetero Diels-Alder.

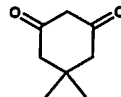
Existen antecedentes en la bibliografía química de llevar a cabo este mismo tipo de reacción con compuestos 1,3-dicarbonílicos tipo ácido N,N-dimetilbarbitúrico, ácido de Meldrum o dimedona<sup>103,104,105,106,107</sup>.



ácido N,N-dimetilbarbitúrico



<sup>38</sup> ácido de Meldrum

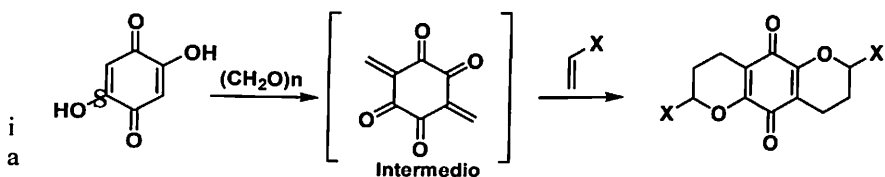


dimedona

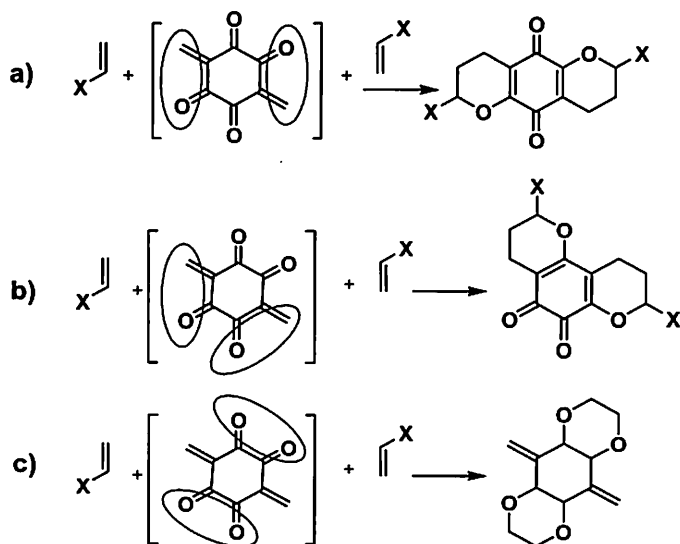
En nuestra aproximación nos proponemos usar el compuesto simétrico 2,5-dihidroxibenzoquinona como adecuado equivalente sintético de compuestos 1,3-dicarbonílicos, no existiendo ningún tipo de antecedente bibliográfico previo del uso de este reactivo en este tipo de reacción.

Nuestra estrategia sintética se basa en atrapar el intermedio, resultante de la condensación de 2,5-dihidroxibenzoquinona y paraformaldehído, u otros aldehídos, con dienófilos ricos en electrones, mediante un proceso dominó multicomponente.

La formación de los dos anillos piránicos se lleva a cabo mediante una reacción hetero Diels-Alder con demanda inversa de electrones donde la interacción dominante será la  $LUMO_{\text{Heterodieno}}-HOMO_{\text{Dienófilo}}$ .



alizamos el intermedio de reacción son posibles tres sistemas de dienos susceptibles de ser atrapados por los correspondientes dienófilos.

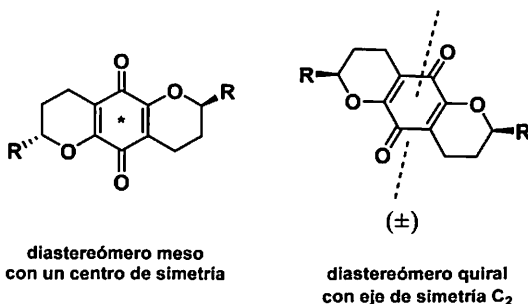


Energéticamente la posibilidad c) es claramente desfavorable frente a la a) y la b)<sup>108,109,110,111</sup> como se analizará más adelante.

En el caso a) los sistemas heterodiénicos no se encuentran en posiciones contiguas y dará lugar a la formación de *bispirano-1,4-benzoquinonas* lineales, mientras que en el caso b) los dos sistemas se encuentran en disposiciones contiguas y las correspondientes cicloadiciones darán lugar a *bispirano-1,2-benzoquinonas* angulares.

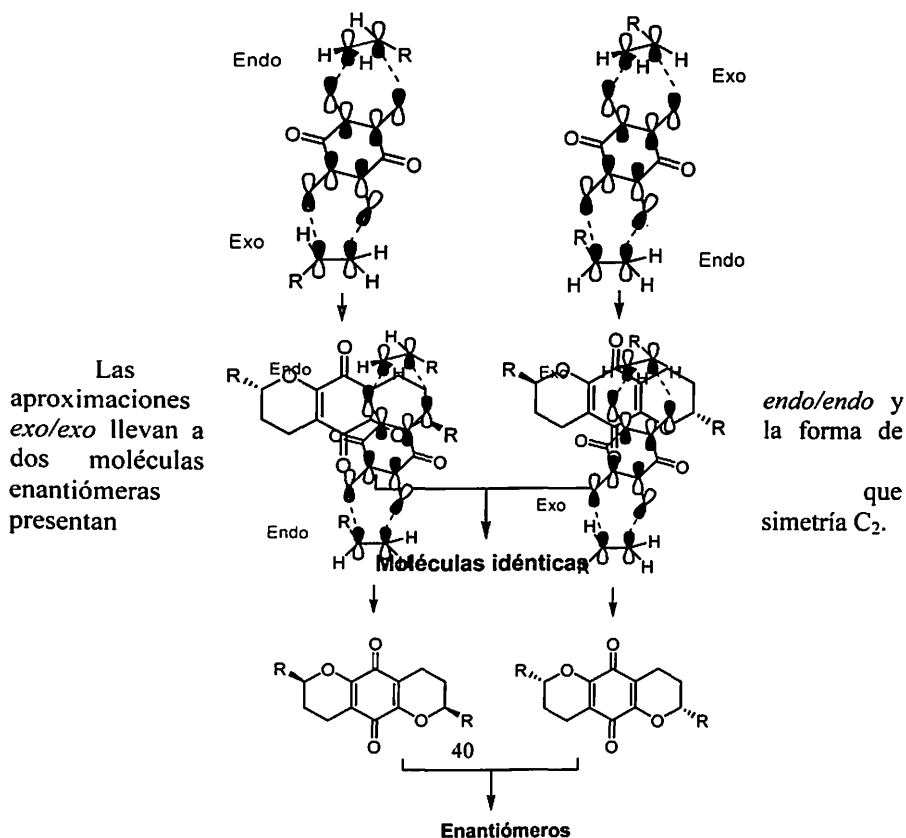
En nuestro caso las reacciones fueron regioselectivas puesto que sólo encontramos productos lineales. Los datos espectroscópicos de los productos obtenidos están de acuerdo para un patrón de *para*-quinonas en lugar de *orto*-quinonas<sup>112,91</sup>.

Los productos fueron obtenidos como una mezcla 1:1 de diastereómeros con distinto  $R_f$  e idénticos espectros de  $^1\text{H}$  RMN y  $^{13}\text{C}$  RMN. Cuando partimos de dienófilos aquirales, uno de estos diastereómeros posee un centro de simetría mientras que el otro es quiral y pertenece al grupo puntual de simetría  $C_2$ , mientras que con dienófilos quirales no se cumple esta regla.



diastereómeros son el resultado de las diferentes aproximaciones en el proceso de cicloadición<sup>113,114,115,116,117</sup> del intermedio con el doble enlace del dienófilo y que pueden ser *endolendo*, *exolexo*, *endolexo* y *exolendo*.

Las aproximaciones *endo/exo* y *exo/endo* llevan a la formación de moléculas idénticas y que resultan ser el diastereómero aquiral.



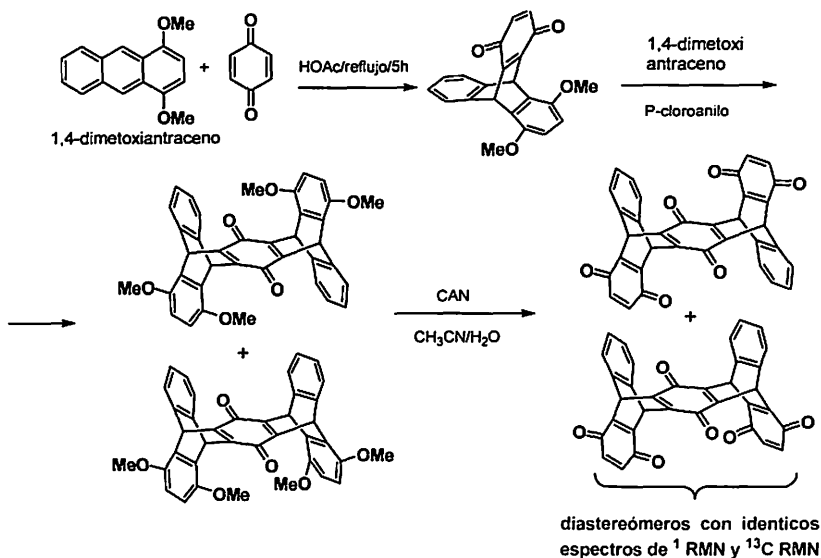
Nos llamó la atención que los diastereómeros obtenidos con distinto comportamiento cromatográfico, presentaran idénticos datos de  $^1\text{H}$  RMN y  $^{13}\text{C}$  RMN.

Encontramos casos en la bibliografía química de aductos diastereómeros con espectros coincidentes de  $^1\text{H}$  RMN y  $^{13}\text{C}$  RMN. Recientemente, el grupo de investigación del Profesor Xiao-Zhang Zhu, ha publicado un artículo sobre la síntesis de sistemas con estructura itpiceno quinona<sup>118</sup>.

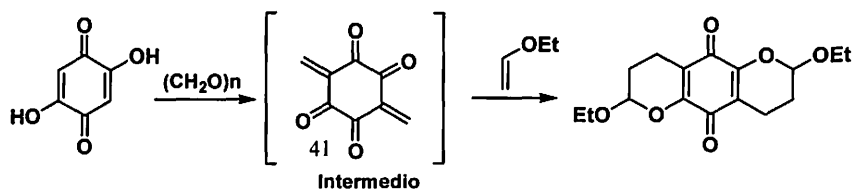
Estos sistemas son sintetizados mediante una reacción de hetero Diels-Alder entre *p*-benzoquinona y antraceno con sustituyentes metoxilo (Figura 11). Debido a la simetría de los reactivos se han obtenido como productos dos diastereómeros con idénticos espectros de  $^1\text{H}$  RMN y  $^{13}\text{C}$  RMN.



**Figura 34: Síntesis de derivados de iptienoquinonas:**



Como primer objetivo nos propusimos la búsqueda de las condiciones más adecuadas para llevar a cabo la reacción dominó Knoevenagel hetero Diels-Alder (DKHDA) tipo aniónica-pericíclica y para ello seleccionamos como reacción patrón la reacción de 2,5-dihidroxiquinona con paraformaldehído y vinil etil éter bajo diferentes condiciones.



La Tabla 2 ilustra los rendimientos obtenidos pudiéndose apreciar que sólo se obtienen rendimientos aceptables cuando se utilizan excesos de paraformaldehído y etil vinil éter.

**Tabla 2: Diferentes condiciones de reacción para optimizar la reacción de 2,5-dihidroxiquinona (I) con etil vinil eter.**

Entrada	I/ (CH <sub>2</sub> O) <sub>n</sub> / CH <sub>2</sub> CHOEt	Disolvente	Condiciones	Rendimiento %
1	1/16/9	dioxano	reflujo 100°C, 24h.	28
2	1/16/9	dioxano	tubo cerrado, 110°C, 8h.	50
3	1/16/9	dioxano	tubo cerrado, 110°C, 24h.	88
4 <sup>a</sup>	1/16/9	dioxano	tubo cerrado, 110°C, 24h.	32
5 <sup>a</sup>	1/32/9	dioxano	tubo cerrado, 110°C, 15h.	47
6 <sup>a</sup>	1/16/9	CH <sub>3</sub> CN	tubo cerrado, 110°C, 24h.	NO REACCIONA
7 <sup>b</sup>	1/8/9	dioxano	reflujo 100°C, 24h.	NO REACCIONA

<sup>a</sup> en lugar de paraformaldehído se usó formalina (solución acuosa de formaldehído al 36.5% en peso).

<sup>b</sup> uso de TAMA (Trifluoroacetato de N-metilnilina) y 1,3,5-trioxano como equivalente sintético de formaldehído.

Los mejores resultados se consiguieron con la siguiente proporción de reactivos 2,5-dihidroxi-benzoquinona/(CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>/etil vinil éter (1/16/9). Cuando la reacción se llevó a cabo con dioxano bajo reflujo, el rendimiento obtenido fue de un 28%, este rendimiento se consiguió mejorar usando un tubo cerrado a 110°. El uso de formalina en lugar de paraformaldehído dio rendimientos inferiores. También usamos TAMA<sup>119</sup> (Trifluoroacetato de N-metilnilina) y 1, 3,5-trioxano como un equivalente de condensación aldólica de formaldehído sin buenos resultados.

Dado que el proceso requiere largos tiempos de reacción decidimos utilizar irradiación con microondas<sup>120,121,122</sup> para ver si, éstos, se disminuían y conseguíamos aumentar los rendimientos. Usamos varios disolventes encontrando que efectivamente se acortaban los tiempos de reacción. Los resultados obtenidos se representan en la Tabla 3. Todas las reacciones se realizaron en un tubo cerrado.

**Tabla 3: Resultados obtenidos en la reacción de 2,5-dihidroxiquinona y etil vinil eter usando radiación con microondas.**

Entrada	I/ (CH <sub>2</sub> O) <sub>n</sub> /CH <sub>2</sub> CHOEt	Disolvente	Condiciones <sup>c</sup>	Rendimiento %
1	1/16/9	dioxano	MW, 45 min	37
2	1/16/9	dioxano	MW, 45 min	15
3	1/16/9	tolueno	MW, 45 min	54
4	1/16/9	<i>p</i> -xileno	MW, 45 min	NO REACCIONA
5	1/16/9	1,2-dicloroetano	MW, 45 min	78
6	1/8/9	1,2-dicloroetano	MW, 45 min	29
7	1/16/9	1,2-dicloroetano	MW, 20 min	88

<sup>c</sup> irradiación a 630 W con un microondas doméstico.

Se probaron distintos disolventes atendiendo a sus características frente a la irradiación con microondas. Esencialmente, la capacidad de un disolvente para calentarse con microondas depende de sus propiedades dieléctricas ( $\epsilon'$ ) y de la eficiencia con que la energía absorbida puede ser convertida en calor, descrita por el factor de pérdida dieléctrica ( $\epsilon''$ ). Para comparar la capacidad que tienen distintas sustancias de transformar energía de microondas en calor, a una frecuencia y temperatura determinada, se utiliza el factor de disipación  $\tan \delta$ , que se define como la tangente de la relación del factor de pérdida dieléctrica y la constante dieléctrica ( $\tan \epsilon''/\epsilon'$ ). Los valores del factor de disipación están recogidos en tablas y están comprendidos entre 0 y 1. Probamos desde disolventes transparentes al microondas como el dioxano hasta aquellos con adecuados valores de factor de disipación  $\delta$ , como el 1,2-dicloroetano ( $\tan \delta=0.44$ ). Utilizando este mismo disolvente se intentó ver si se podría variar la proporción de reactivos, pero no se consiguieron buenos rendimientos.

La proporción de diastereómeros 1:1 obtenidos en cada reacción fue ratificada por HPLC y no se observó variación de esta proporción al pasar de calentamiento convencional a irradiación con microondas.

Como consecuencia de los elementos de simetría presentes en los aductos, éstos muestran una gran simplicidad en sus espectros de  $^1\text{H}$  RMN y  $^{13}\text{C}$  RMN, observándose la mitad de las señales de protón y de carbono. A modo de ejemplo representativo, en la Figura 12 se muestran los espectros de  $^1\text{H}$  RMN y  $^{13}\text{C}$  RMN de los aductos obtenidos en la reacción de 2,5-dihidroxi-benzoquinona con paraformaldehído y etil vinil éter.

### **Biotecnología e Ingeniería Genética de Rutas Metabólicas.**

Los metabolitos secundarios juegan una variedad de funciones tales como atrayentes de polinizadores, y moléculas de defensa contra el ataque de animales y microorganismos, los cuales permiten la supervivencia de estos seres vivos en su ecosistema. Estas sustancias también tienen una gran importancia para el hombre. Sin embargo, a pesar de los grandes esfuerzos realizados por la industria química para lograr su síntesis, se han conseguido escasos éxitos, y así las plantas aún constituyen la mayor fuente de obtención de vitales compuestos medicinales.

A finales de los años 70, el cultivo de células vegetales se vio como una alternativa o vía adicional para la producción de estos metabolitos. No obstante, con cierta frecuencia las bajas cantidades obtenidas en estos cultivos, a menudo inferiores a las cantidades presentes en la planta, son un obstáculo para su explotación comercial. Sin embargo, algunos proyectos fueron exitosos y comercialmente explotados tales como la producción de shikonina, berberina, paclitaxel mediante el cultivo de células de *Lithospermum erythrorhizon*, *Coptis japonica* y *Taxus brevifolia* respectivamente.

Por otro lado, se han intentado diferentes estrategias para tratar de incrementar la producción de metabolitos secundarios en cultivo, éstas incluyen por ejemplo la manipulación del medio nutritivo, inducción de cultivos morfológicamente diferenciados que se conoce presentan mayor potencial bioquímico. Así el establecimiento y empleo de cultivos de raíces en cabellera tras la infección con *Agrobacterium rhizogenes* mostró un incremento en la producción de aquellos metabolitos secundarios que naturalmente se sintetizan y acumulan en las raíces de la planta, obteniendo la producción de cantidades igual o incluso superiores a las obtenidas en la raíces de la planta. Además, en los últimos 10-15 años, avances en biotecnología

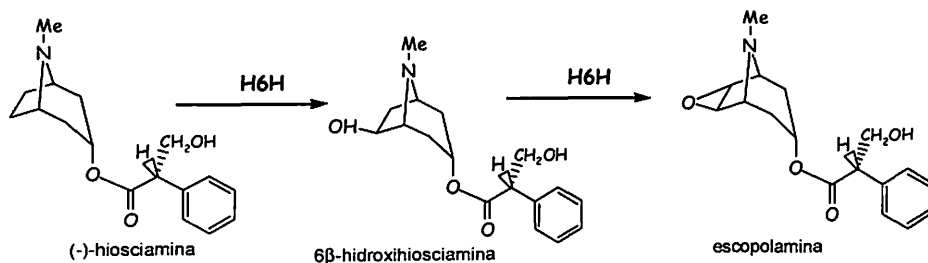
de plantas han permitido el éxito de la transformación genética de plantas, dirigidas principalmente a la mejora de características agrícolas. En los últimos años, y con los rápidos avances conseguidos en el campo de la tecnología del ADN recombinante, se ha logrado la elucidación, aislamiento y clonaje de genes responsables de la codificación de enzimas que participan en diversas rutas metabólicas, identificándose además muchos procesos metabólicos hasta ahora poco conocidos. Así, se ha comenzado a abordar la manipulación genética de plantas medicinales, principalmente para conseguir un incremento en la producción de diversas sustancias bioactivas, consiguiéndose atractivos resultados de manipulaciones genéticas dirigidas a la alteración y control del metabolismo secundario. Asimismo, se ha hecho posible confeccionar el metabolismo secundario de determinadas rutas de plantas medicinales y obtener mayores rendimientos en la producción de un producto diana, y al mismo tiempo también aplicar luz y conocimiento sobre el control de los complejos procesos metabólicos.

En nuestro laboratorio, se ha abordado la biotecnología de las especies *Atropa baetica*, *Maytenus canariensis*, *M. amazonica*, *Echium acanthocarpus*, *E. aculeatum*, *E. callythirsum* y *E. virescens*.

Con todas estas especies, se ha conseguido o se aborda el establecimiento de cultivos de raíces en cabellera tras el empleo de la bacteria *Agrobacterium rhizogenes*, además del intento por conseguir la sobreexpresión de genes codificadores de enzimas dianas, para sobreexpresar su síntesis y así conseguir una mayor acumulación de determinados metabolitos bioactivos.

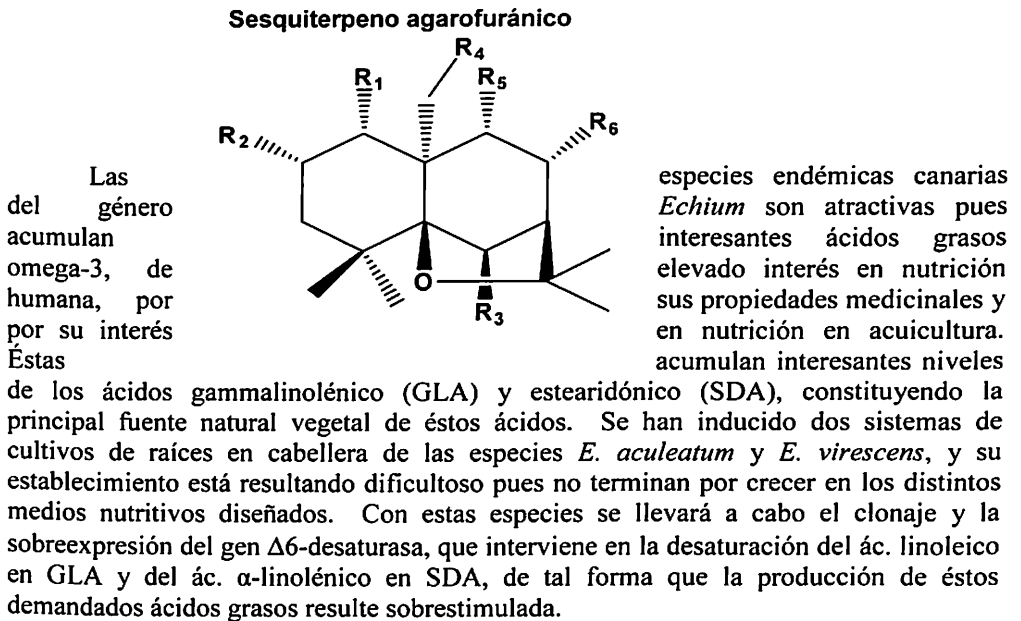
*Atropa baetica* sintetiza alcaloides tropánicos, siendo el mayoritario atropina seguido de escopolamina, pasos metabólicos catalizados por la enzima H6H. La sobreexpresión del gen *h6h* resultó en una alteración del metabolismo, consiguiéndose una mayor acumulación de escopolamina en detrimento de atropina en los cultivos de raíces en cabellera transgénicos establecidos. Asimismo, se ha conseguido la producción de enzima recombinante *h6h* en *Escherichia coli*, y se pretende emplear esta enzima en síntesis orgánica, empleando esta enzima recombinante como catalizador orgánico, para la obtención de productos enantioméricamente puros que pueden presentar cierta bioactividad.

**Figura 35.-** Esquema de la doble reacción catalizada por la enzima H6H (hiosciamina 6 $\beta$ hidroxilasa)

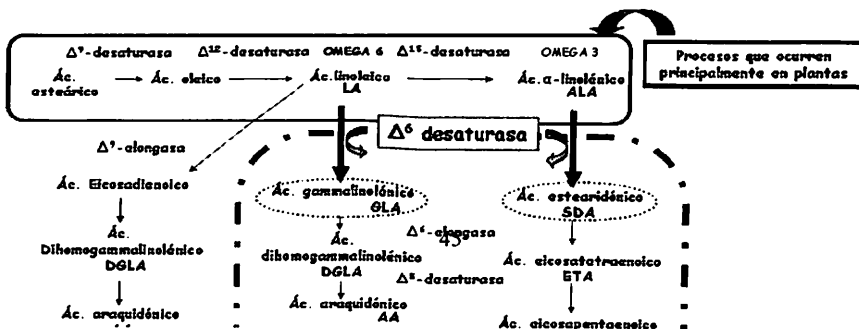


La especie *M. canariensis* presenta sesquiterpenos agrofuranicos, con distintas actividades biológicas (antitumoral, revertidor de MDR o disuasoria de la alimentación), metabolitos que aparecen principalmente en la corteza de raíz. Con esta especie se ha llevado a cabo su multiplicación in vitro y el establecimiento de protocolos para su propagación, que serán aplicados en futuras modificaciones genéticas. Además, se han inducido cultivos de raíces en cabellera como sistema biológico para investigar la síntesis y acumulación de estos metabolitos, y contemplar una posible modificación genética de esta ruta metabólica. Se siguen los esfuerzos por conseguir similares resultados con *M. amazonica*.

**Figura 36.-** Estructuras moleculares de diferentes sesquiterpenos agrofuranicos de *Maytenus canariensis*



**Figura 37.-** Metabolismo de los ácidos grasos omega-3 y 6 derivados de ácidos grasos esenciales y enzimas (elongasas y desaturasas) que participan en la ruta.



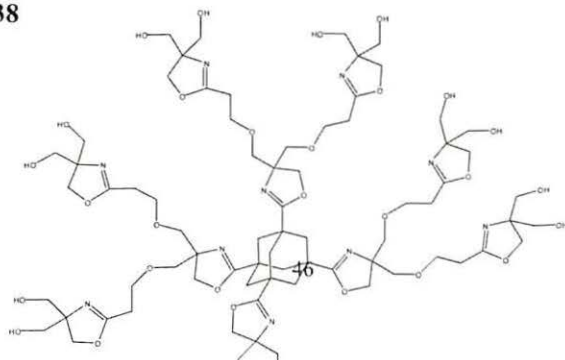
## Química Macro y Supramolecular

Nuestra área de trabajo se divide en dos subáreas, una dedicada a la síntesis y desarrollo de metodología sintética orientada a la obtención de compuestos de alto valor añadido, y otra dirigida al diseño de nuevas estructuras macro y supramoleculares con aplicaciones que van desde la ciencia de materiales a la medicina pasando por la síntesis orgánica, la catálisis, la biología molecular el transporte y suministro de fármacos, etc.

Dentro de la primera estamos trabajando en la síntesis de un nuevo neoclerodano, la (+) Teubrevina G. Los clerodanos son una familia de diterpenos que presentan interesantes propiedades biológicas de las que cabe destacar la actividad antiinflamatoria. La novedosa estructura y funcionalidad que presenta este neoclerodano lo hace un interesante objetivo sintético. Este proyecto se desarrolla en colaboración con el Profesor Andreas Gansäuer de la Universidad de Bonn que aporta su extensa experiencia en la síntesis estereoselectiva controlada por los reactivos.

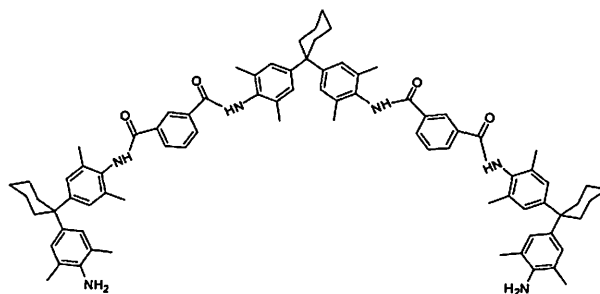
En el área de la química macro y supramolecular nuestro interés está centrado en la síntesis de nuevas estructuras dendríticas para su aplicación en varios campos que van desde la catálisis química al transporte y suministro de fármacos, pasando por la potencial aplicación en ciencias de materiales y aplicaciones biomédicas. Estas estructuras están basadas en anillos de oxazolidina, figura \* y su síntesis se desarrolla a través de una metodología versátil, que permite la manipulación racional de las potenciales nuevas propiedades de la macromolécula, de manera que tanto el núcleo, el espacio interior y la periferia de ella puede ser diseñada a deseo. (Por ejemplo la síntesis de un dendrímero de tamaño medio que posea un interior hidrofóbico, de tamaño definido, y una periferia hidrofílica de manera que pueda actuar como modelo enzimático o bien como transportador y suministrador de fármacos. Si quieres puedes introducir este ejemplo. Como lo consideres.

Figura 38



Ya dentro de la química supramolecular otros dos aspectos que estamos estudiando es el de la obtención de nuevos organogeladores con propiedades predefinidas, por un lado, y por otro el diseño y síntesis de nuevos lazos moleculares y la determinación del efecto molde en el mecanismo de formación de los mismos. El interés de estas moléculas radica, entre otros, en el hecho de poseer dimensiones de nanoescala.

Los geles son compuestos que se encuentra de manera habitual en nuestra vida diaria pero que en los últimos diez años han experimentado un notable desarrollo como materiales únicos con múltiples aplicaciones que van desde la cosmética a la ciencia de materiales y aplicaciones en farmacología. Nuestro organogelador está basado en poliamidas



**Figura 39**

La obtención de moléculas de tamaño nano es de importancia crucial a la hora del desarrollo y diseño de nuevos dispositivos útiles tanto en electrónica, fotónica como en medicina. Los lazos moleculares se conocen de su existencia y funcionalidad en la naturaleza. Los lazos moleculares en los que estamos estudiando el mecanismo de su formación están basados en los desarrollados por el Prof. Vögtle,

Figura 40

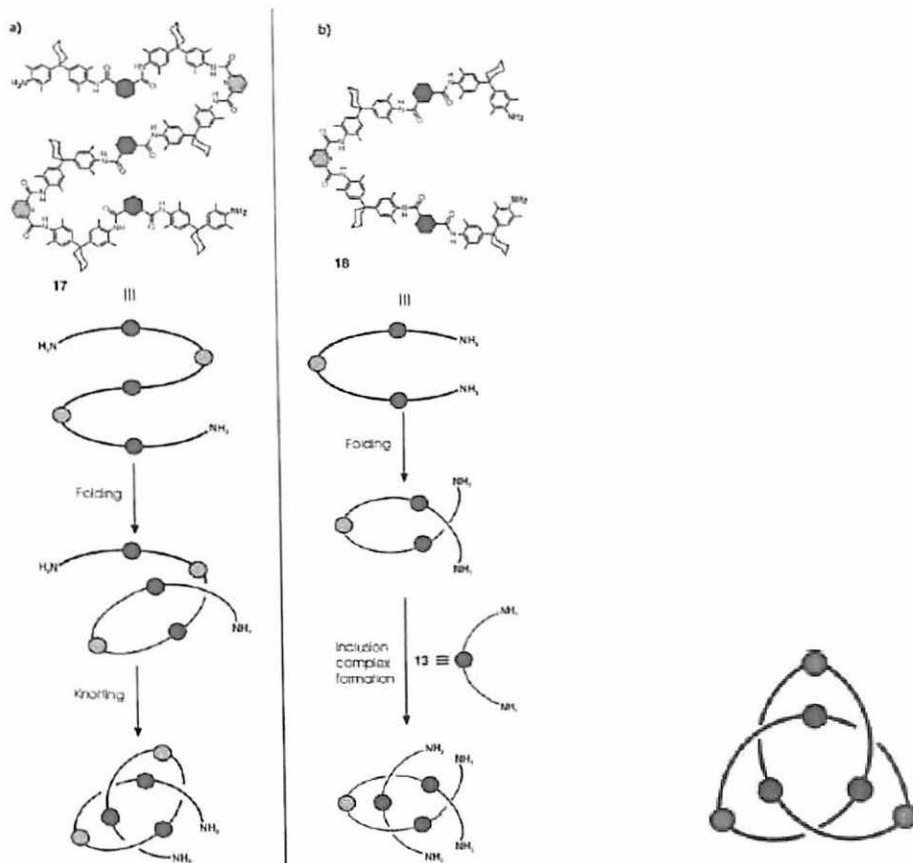


Fig \*

Los diseños están basado en el uso de bloques estructurales distintos a las unidades de piridina así como los que incorporan una funcionalidad en posición 4 de las unidades de ciclohexanos. La importancia en la determinación del mecanismo de formación está en la posibilidad de introducir asimetría en la topología del lazo, ya de por sí poseer elemento de quiralidad topológica.

### Referencias

1. H.M. Chang, y col. *Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica*, World Scientific Publishing, Singapore **1986**, Vol 1,2.
2. S. Dev, *S. Environ. Health Perspect.*, **1999**, 107,783.
3. L.D. Kapoor, *CRC Handbook of Ayurvedic Medicinal Plants*, CRC Press, Boca Raton **1990**.
4. R.E. Schultes; R.F: Raffauf. *The Healing Forest*, Dioscorides Press, Portland, **1990**.



5. R. Arvigo y col. *Rainforest Remedies*, Lotus Press, Twin Lakes, **1993**.
6. N.R. Farnsworth y col. *Bull. WHO*, **1985**, 63, 965.
7. M.R. Boyd, K. D. Paull. *Drug Development Research*, **1995**, 34, 91-109.
8. D.M. Vyas, J.F. Kadow, *Prog. Med. Chem.* **1995**, 32, 289-337.
9. J. Reedijk, *Chem. Commun.*, **1996**, 801-806.
10. G.R. Lenz, y col. *Drug Discovery Today* **2000**, 5, 145-156.
11. E. S. Razvi, y col. *J. Mod. Drug Discovery* **2000**, 41-42.
12. J. Rosamond y col. *Science* **2000**, 287, 1973-1976.
13. M.D. Garret, y col. *Eur. J. Cancer*. **1999**, 35, 2010-2030.
14. C.E. Barry, y col. *Biochem. Pharmacol.* **1999**, 59, 221-231.
15. S.L. Schreiber, y col. *Science*, **1999**, 286, 971-974.
16. L. Silverman, y col.. *Curr.Opin.Chem.Biol.* **1998**, 2397-403.
17. G.A. Cordell y col.. *Pure Appl. Chem.* **1999**, 71, 1089-1094.
18. D.G. Corley, y col. *J. Nat. Prod.* **1994**, 57, 1484-1490.
19. H. Waldmann. H. y col. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 307-311.
20. H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 1174-78.
21. A.G., González; A.G. Ravelo; I.L. Bazzocchi; J. Jiménez; C.M. González; J.G. Luis; E.A. Ferro; L. Moujir; F.G. De las Heras. *Il Farmaco*, **1988**, 43, 264.
22. A.G. Ravelo; A. Estévez-Braun; E. Pérez-Sacau; *Studies in Natural Products Chemistry, Ed. Atta-ur-Rahman, Elsevier*, **2003**, 29, 719-770.
23. Y. Kuo ; M. King ; G. Chen; H. Chen; C. Chen; L. Chen, K. Lee. *J. Nat. Prod.* **1994**, 57, 263-269.
24. H. Chávez, N. Callo, A. Estévez-Braun; A.G. Ravelo; A.G., González. *J. Nat. Prod.*, **1999**, 62, 1576-1577.
25. D. Mesa-Siverio, A. Estévez-Braun, A.G. Ravelo, J.R. Murguía, A. Rodríguez-Afonso. *Eur. J. Org. Chem.*, **2003**, 4243-4247.
26. A.G. Ravelo, A. Estévez-Braun, H. Chávez, E. Pérez-Sacau, D. Mesa-Siverio. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **2004**, 4, 241-265.
27. C.B. Gamlath, A.A.L. Gunatilaka, Y. Tezuka, T. Kikuchi, *Tetrahedron Letters*, **1988**, 29, 109-112.
28. A.G., González, B. M. Fraga, C.M. González, A.G. Ravelo, E. Ferro, X.A. Dominguez, M.A. Martínez, J. Fayos, A. Perales, M.L. Rodríguez, *Tetrahedron Letters*, **1983**, 24, 3033-3036.
29. A.G., González, N.L. Alvarenga, A. Estévez-Braun, A.G. Ravelo, R. Estévez-Reyes, *Tetrahedron*, **1996**, 52, 10667-10672.
30. W.N. Setzer, M.T. Holland, C.A. Bozeman, G.F. Rozmus *Planta Med.* **2001**, 67, 65-67
31. Patente: BIOMAR y H. Chávez, A. Estévez-Braun, A.G. Ravelo. *New cytotoxic derivatives of natural compounds from Maytenus sssp. Plants.* (1999) GB 9929836.6. Universidad de La Laguna y Biomar. VIGENTE: 1999 Gran Bretaña.
32. D. Mesa-Siverio, A. Estévez-Braun, A. G. Ravelo, J. R. Murguía y A R. Afonso. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 4243-4247.
33. E. Pérez-Sacau. Tesis Doctoral, Universidad de La Laguna, 2003. *Actividad antitumoral producida por mecanismos selectivos de lesiones al ADN*. Páginas 175-195.
34. J. Dorta, E. Blasco, A. G. Ravelo, B. N. Díaz Chico, (Ed.) *Oncología Molecular* **2002** ICIC, página 155-160. ISBN: 84-95792-58-3.
35. G. Millar. Epstein-Barr virus in Virology. *B.N. Fields, ed. (NY: Raven Press)* **1990**, 1921-1958.
36. M. Tsushima, T. Maoka, M. Katsuyama, M. Kozuka, T. Matsuno, H. Tokuda, H. Nishino, A. Iwashima. *Boil. Pharm. Bull.* **1995**, 18, 227-233.
37. A.G. González, B.M. Tincusi, I.L. Bazzocchi, H. Tokuda, H. Nishino, T. Konoshima, I.A. Jiménez, A.G. Ravelo, *Biorg. Med. Chem* **2000**, 8, 1773-1778.
38. S. Ueda, T. Umemura, K. dohguchi, T. Matsuzazaki, H. Tozuda, H. Nishino, A. Iwashima. *Phytochemistry* **1994**, 36, 323-325.

39. Murakami, A.; Ohigashi, H.; Koshimizu, K. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1996**, *60*, 1.
40. E. Pérez Sacau, A. Estévez-Braun, A. G. Ravelo, E. A. Ferro, H. Tokuda, T. Mukainaka, H. Nishino, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 483-488.
41. Atta-ur-Rahman (Ed.) *Studies in Natural Products Chemistry* **2003**, Vol.29, Elsevier, pág.719-760, A.G. Ravelo, A. Estévez-Braun, E. Pérez -Sacau.
42. E. Pérez Sacau, Tesis Doctoral Universidad de La Laguna, *Estudio de*
43. *ortoquinonas como heterodienos en la formación de benzodioxinas. Obtención de análogos del antitumoral Lapachol: Relaciones estructura-actividad*, **2002**.
44. a) I. A. Jiménez, I. L. Bazzocchi, M. J. Núñez, T. Mukainaka, H. Tokuda, H. Nishino, T. Konoshima, A. G. Ravelo. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1047-1050. b) A.G. González, M.P. Núñez, A.G. Ravelo, J.G. Sazatornil, J. Trujillo, I.L. Bazzocchi, E.Q. Morales, O.M. Muñoz. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1992**, 1437-1441.
45. D. V. C Awang, D. Kindack, B. Dawson, *J. Chromatogr.* **1986**, *368*, 439.
46. A.G. Ravelo, A. Estévez-Braun, H. Chávez-Orellana, E. Pérez Sacau, D. Mesa-Sivero. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2004**, *4*, 241-265.
47. F. Muñoz-Martínez, Peihua Lu, F. Cortés-Selva, J.M. Pérez-Victoria, I. A. Jiménez, A. G. Ravelo, F. J. Sharom, F. Gamarro, S. Castanys. *Cancer Research* **2004**, *64*, 7130-7138.
48. E. J., Corey, A.G. Myers, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 3559.
49. S.C. Hooker, A. Steyermark, *J. Chem. Soc.* **1936**, *58*, 1163.
50. B. M, Tincusi, A. Jiménez, A.G. Ravelo, R. Missico, *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1520-1523.
51. S.I. Hirst, and L.A. Stapley. *Parasitology Today*, **2000**, *16*, 1-3.
52. J. M. Pérez-Victoria, F. J. Pérez-Victoria, A. Parodi-Talice, I. A. Jiménez, A. G. Ravelo, S. Castanys, and F. Gamarro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **2001**, *45*, *9*, 2468-474.
53. World Health Organization: WHO Model prescribing information: drugs used in parasitic diseases (2<sup>nd</sup> Ed.). WHO, Geneva (1995).
54. J. D. Berman. *Clin. Infect. Dis.*, **1997**, *24*, 684-703.
55. B. L. Herwaldt, J. D. Berman. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **1992**, *46*, 296-306.
56. J. E. Piñero, I. A. Jiménez, B. Valladares, A. G. Ravelo. *Expert Opin. Ther. Patents*, **2004**, *14*(8), 1113-1123.
57. S. L. Croft, R. A. Neal, W. Pendergast, and J. H. Chan. *Biochem. Pharmacol.* **1987**, *36*, 2633-2636.
58. S. L. Croft, R. A. Neal, E. A. Thornton, and D. B. Herrmann. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **1993**, *87*, 217-219.
59. S. L. Croft, D. Snowdon, and V. Yardley. *Antimicrob. Chemother.*, **1996**, *38*, 1041-1047.
60. Y. Le Fichoux, D. Rousseau, B. Ferrua, S. Ruetter, A. Lelièvre, D. Grousson, and J. Kubar. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1998**, *42*, 654-658.
61. R. Schmidt-Ott, T. Klenner, P. Overath, and T. Aebischer. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **1999**, *93*, 85-90.
62. J. A. Urbina. *Parasitology*, **1997**, *114*, S91-S99.
63. T. K. Jha, S. Sundar, C. P. Thakur, P. Bachmann, J. Karbwang, C. Fischer, A. Voss, and J. Berman. *N. Engl. J. Med.*, **1999**, *341*, 1795-1800.
64. C. P. Thakur, P. K. Sinha, R. K. Singh, S. M. Hassan, and S. Narain., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **2000**, *94*, 696-697.
65. F. Muñoz-Martínez, L. Peihua, F. Cortés-Selva, J. M. Pérez-Victoria, I. A. Jiménez, A. G. Ravelo, F. J. Sharom, F. Gamarro, and S. Castanys. *Cancer Research.*, **2004**, *64*, 7130-138.
66. H. Thomas, H. M. Coley. *Cancer Control*, **2003**, *10*, 159-65.
67. L. Beketic-Oreskovic, G. E. Duran, G. Chen, C. Dumontet, B. I. Sikic. *J. Natl Cancer Inst (Bethesda)*, **1995**, *87*, 1593-602.
68. H. S. Chan, G. De Boer, J. J. Thiessen, et al., *Clin. Cancer Res.*, **1996**, *2*, 1499-508

69. D. Belpomme, S. Gauthier, E. Pujade-Lauraine, et al., *Ann. Oncol.*, **2000**, *11*, 1471-476.
70. G. A. Fisher, B. I. Sikic. *Hematol. Oncol. Clin. N. Am.*, **1995**, *9*, 363-82.
71. J. M. Pérez-Victoria, A. Di Pietro, D. Barron, A. G. Ravelo, S. Castanys, F. Gamarro. *Current Drug Targets*, **2002**, *3*, 311-33
72. J. M. Pérez-Victoria, B. M. Tincusi, I. A. Jiménez, I. L. Bazzocchi, M. P. Gupta, S. Castanys, A. G. Ravelo. *J. Med. Chem.*, **1999**, *42*, 4388-393.
73. S. E. Kim, Y. Ho Kim, J. J. Lee. *J. Nat. Prod.*, **1998**, *61*, 108-11.
74. M. L. Kennedy, F. Cortés-Selva, J. M. Pérez-Victoria, I. A. Jiménez, A. G. González, O. M. Muñoz, F. Gamarro, S. Castanys, A. G. Ravelo. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2001**, *44*, 26, 4668-676.
75. M. J. Núñez, F. Cortés-Selva, I. L. Bazzocchi, I. A. Jiménez, A. G. González, A. G. Ravelo, J. A. Gavin. *J. Nat. Prod.*, **2003**, *66*, 572-574
76. S. M. Green, G. R. Marshall. *Trends. Pharmacolo. Sci.*, **1995**, *16*, 285-91.
77. A. G. González, B. M. Tincusi, I. L. Bazzocchi, H. Tokuda, H. Nishino, T. Konoshina, I. A. Jiménez, A. G. Ravelo. *Bioorg. Med. Chem.*, **2000**, *8*, 1773-778.
78. F. Cortés-Selva, M. Campillo, C. P. Reyes, I. A. Jiménez, S. Castanys, I. L. Bazzocchi, L. Pardo, F. Gamarro, A. G. Ravelo. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2004**, *47*, 3, 576-87.
79. A. G. González, I. A. Jiménez, A. G. Ravelo, I. L. Bazzocchi. *Phytochemistry*, **1990**, *29*, 2577-579.
80. PATENTE: Ravelo AG et al.: ES2173017 (2002)
81. Tieze, L.F. *Chem. Rev.* 1996, *96*, 115.
82. Varma, R.S. *Green Chem.* 1999, *1*, 43.
83. Dewick, P.M. *Medicinal Natural Products, a Biosynthetic Approach*, Ed. John Wiley & Sons, 1998, *3*, 32.
84. Giomi, D.; Nesi, R.; Turchi, S.; Mura, E. *J. Org. Chem.* 2000, *65*, 360.
85. Meyer, E.F.; Brandenburg, J.; Parsons, P.J.; de Meijere, A. *J. Org. Chem.* 1991, *56*, 6487.
86. O'Brien, P. J. *Chem. Biol. Interact.* 1991, *80*, 1.
87. Ravelo, A.G.; Estévez-Braun, A.; Orellana, H.C.; Pérez-Sacau, E.; Siverio, D.M. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2004, *4*, 241.
88. Pérez-Sacau, E.; Estévez-Braun, A.; Ravelo, A.G.; Yapu, D.G.; Turba, A.G. *Chemistry & Biodiversity*, 2005, *2*, 264.
89. Haraguchi, H.; Yokohama, K.; Oike, S.; Ito, M.; Nozaki, H.; *Archives of Microbiology*. 1997, *167*, 6.
90. Stein, R.R.; Castellvi, A.L.; Bogacz, J.P.; Jerome, P.; Wraight, C.A. *Journal of Cellular Biochemistry*, 1984, *24*, 243.
91. Guiraud, P.; Steiman, R.; Seigle-Murandi, F.; Silva, A.A.; Bieber, L. *Revista de Microbiología*, 1992, *23*(2), 106.
92. Ravelo, A.G.; Estévez-Braun, A.; Pérez-Sacau, E. Atta-ur-Rahman (Ed.) *Studies in Natural Products Chemistry*, Elsevier, 2003, *29*, 719.
93. Pérez-Sacau, E.; Estévez-Braun, A.; Ravelo, A.G.; Ferro, E.A.; Tozuda, H.; Mukainaka, T.; Nishino, H. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2003, *11*, 483.
94. Evans, B.E.; Rittle, K.E.; Bock, M.G.; Di Pardo, R.M.; Freindinger, R.M.; Whitter, W.L.; Lundell, G.F.; Veber, D.F.; Anderson, P.S.; Chang, R.S.L.; Lotte, V.J.; Cerino, D.J.; Chen, T.B.; Kling, P.J.; Kimkel, K.A.; Springer, J.P.; Hirshfield, J. J. *Med. Chem.* 1988, *31*, 2235.
95. Nicolaou, K.C.; Pfefferkorn, J.A.; Roecker, A.J.; Cao, G.Q.; Barluenga, S.; Mitchell, H.J. *J. Am. Chem. Soc.* 2000, *122*, 9939.
96. Nicolaou, K.C.; Pfefferkorn, J.A.; Mitchell, H.J.; Roecker, A.J.; Barluenga, S.; Cao, G.Q.; Affleck, R.L.; Lillig, J.E. *J. Am. Chem. Soc.* 2000, *122*, 9954.
97. Nicolaou, K.C.; Pfefferkorn, J.A.; Barluenga, S.; Mitchell, H.J.; Roecker, A.J.; Cao, G.Q. *J. Am. Chem. Soc.* 2000, *122*, 9968.
98. Zjawiony, J.K. *J. Nat. Prod.* 2004, *67*, 300.

99. In-Kyoung, L.; Bong, S.Y.; Soo, M.C.; Won, G.K.; Jong, P.K.; In-Ja, R.; Koshino, H.; Ick-Dong, Y. *J. Nat. Prod.* 1996, 59, 1090.
100. Canguro, L.A.; Midiwo, J.O.; Graus, W.; Ugi, I. *Phytochemistry*, 2003, 64, 85
101. Gripenberg, J. *Acta Chemica Scandinavica*, 1981, B(35)7, 513.
102. Nicolaides, D.N.; Gautan, D.R.; Litinas, K.E.; Papamehael, T. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* 2002, 1, 1455.
103. Simon, C.; Constantieux, T.; Rodriguez, J. *Eur. J. Org. Chem.* 2004, 4957.
104. Tieze, L.F.; Evers, H.; Töpken, E. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, 40(5), 903.
105. Tieze, L.F.; J. *Het. Chem.* 1990, 27, 47.
106. Tieze, L.F.; Beifus, U. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1993, 32, 131.
107. Tieze, L.F.; Modi, A. *Med. Res. Rev.* 2000, 20, 304.
108. Sounet, P.A. *Tetrahedron*, 1980, 36, 557.
109. Wang, H.; Wang, Y.; Han, K.L.; Peng, X.J. *J. Org. Chem.* 2005, 70, 4910.
110. Waldeck, D.H. *Chem. Rev.* 1991, 91, 415.
111. Tesis Doctoral, Elisa Pérez Sacau, Universidad de La Laguna, 2003.
112. Thomson, R.H. *Naturally Occurring Quinones*, 2<sup>nd</sup> Ed., 2, 44.
113. Fringuelli, F.; Minuti, L.; Pizzo, F.; Taticchi, A. *Acta Chem. Scand.* 1993, 47, 255.
114. Saber, J.; Sustmann, R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1980, 19, 77.
115. Fleming, I. *Pericyclic Reactions*, Oxford Science Publ. Oxford University Press, 1999, 67.
116. Mintas, M. Schuster, D.I.; Williard, P.G. *J. Am. Chem. Soc.* 1998, 110, 2305.
117. Mintas, M. Schuster, D.I.; Williard, P.G. *Tetrahedron*, 1998, 44, 6001.
118. Xiao, Z.Z.; Chen, C.F. *J. Org. Chem.* 2005, 70, 917.
119. Gras, J.L. *Tetrahedron Lett.* 1978, 24, 211.
120. Varma, R.S. *Green Chem.* 1999, 1, 43.
121. Bose, A.K.; Banik, B.K.; Lavlinskaia, M.; Manhas, M.S. *Chemtech.* 1997, 27, 18.
122. Eycken, E.V.; Appukkuttan, P.; Borggraeve, W.; Dehaen, W.; Dallinger, D.; Kappe, C.O. *J. Org. Chem.* 2002, 67, 7904.