

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Ciencias Farmacéuticas
Laboratorio de Química Farmacéutica



**SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA
DE NUEVOS HÍBRIDOS DERIVADOS
DEL ALDEHÍDO PODOFÍLICO**

TESIS DOCTORAL

ÁNGELA PATRICIA HERNÁNDEZ GARCÍA

Julio 2017

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Ciencias Farmacéuticas
Laboratorio de Química Farmacéutica

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor con Mención Internacional por
la Universidad de Salamanca por:

Ángela Patricia Hernández García

Los Doctores de la Universidad de Salamanca Dña. M^a Ángeles Castro González, y D. Pablo Anselmo García García, D. David Díez Martín y D. José M^a Miguel del Corral Santana

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado “**Síntesis y evaluación biológica de nuevos híbridos derivados del aldehído podofílico**”, presentado por la Graduada en Farmacia D^a Ángela Patricia Hernández García, ha sido realizado bajo su dirección en el Laboratorio de Química Farmacéutica del Departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Salamanca.

Para que así conste firman el presente certificado.

En Salamanca, junio de 2017

Fdo: M^a Ángeles Castro

Fdo: Pablo A. García

Fdo: David Díez

Fdo: Jose M^a Miguel del Corral

La financiación de la investigación realizada en este trabajo de Tesis Doctoral ha procedido de los siguientes proyectos de investigación:

- Nuevas estrategias de funcionalización de analgésicos y citotóxicos. Mineco, 2016-2018 (CTQ2015-68175-R)
- Nuevas estrategias de síntesis, funcionalización y transporte de agentes citotóxicos y analgésicos, Universidad de Salamanca, 2015 (USAL2015-04)
- Diseño de nuevas estrategias para el transporte y funcionalización de nuevos citotóxicos. Universidad de Salamanca, 2014 (18KAQD)

Su realización ha sido posible gracias a la concesión de una Ayuda de Formación de Personal Investigador de la Junta de Castilla y León cofinanciada por el Fondo Social Europea (2013 – 2017).

Una parte de los resultados presentados en esta memoria han sido publicados en:

- Castro, M. A.; García, P. A.; Hernández, A. P.; Díez, D. "An overview on heterocyclic podophyllotoxin derivatives" en "Chemistry and Properties in Targets in Heterocyclic Systems". Vol 19, pp.28-61 Italian Society of Chemistry, **2016**.
- Hernández, A. P.; Díez, P.; García, P. A.; Miguel del Corral, J. M.; Pérez-Andrés, M.; Díez, D.; San Feliciano, A.; Fuentes, M.; Castro, M.A. Design, synthesis and biological evaluation of lignohydroquinones. A new family of hybrids between podophyllaldehyde and diterpenylhydroquinone derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**. *Enviada*

 **ÍNDICE**
Y
ABREVIATURAS 

-ÍNDICE-

ÍNDICE Y ABREVIATURAS	7
-ABREVIATURAS-.....	11
RESUMEN Y ABSTRACT	13
INTRODUCCIÓN.....	17
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	35
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
1. Obtención de precursores ciclolignánicos.	53
1.1. Obtención del acetónido ciclolignánico 3	53
1.2. Obtención del aldehído podofílico	55
2. Lignohidroquinonas a partir de derivados diterpénicos.	57
2.1. Obtención de precursores diterpenilhidroquinónicos	58
2.2. Obtención de las lignohidroquinonas 22-24.....	59
2.3. Evaluación biológica	64
3. Lignohidroquinonas a partir de derivados monoterpénicos.	87
3.1. Obtención de precursores monoterpenilhidroquinónicos	88
3.2. Obtención de las lignohidroquinonas 42-44.....	93
3.3. Evaluación biológica	99
3.4. Comparación de los resultados de actividad de las lignohidroquinonas	114
4. 7 β ,9-Bisciclolignanos.	126
4.1. Obtención de 7 β -amino-4'-O-desmetilepipodofilotoxinas	128
4.2. Obtención del 7 β ,9-bisciclolignano 54.....	134
4.3 Evaluación biológica	135
PARTE EXPERIMENTAL.....	150
TECNICAS GENERALES	152
1. Obtención de precursores ciclolignánicos	155
2. Lignohidroquinonas a partir de derivados diterpénicos.	159
2.1. Obtención de precursores diterpenilhidroquinónicos.	159
2.2. Obtención de las lignohidroquinonas 22-24.....	162
3. Lignohidroquinonas a partir de derivados monoterpénicos	169

3.1. Obtención de precursores monoterpénilhidroquinónicos.....	169
3.2. Obtención de las lignohidroquinonas 44-46.....	173
4. Obtención de 7 β ,9-bisciclolignanos	182
4.1. Obtención de 4'-desmetilepipofilotoxina 47.....	182
4.2. Obtención del 7 β -aminociclolignano 51.	184
4.3. Obtención del 7 β ,9-bisciclolignano 54.....	187
5. Materiales y Métodos biológicos.....	188
5.1. Materiales	188
5.1 Métodos	189
CONCLUSIONES.....	195
ESPECTROSCOPIA	201
Tablas.....	203
Espectros.....	226
TABLAS DE ACTIVIDAD	261

-ABREVIATURAS-

Ac₂O: anhídrido acético

AcOEt: acetato de etilo

ADN: ácido desoxirribonucleico

AMCPB: ácido *m*-cloroperbenzoico

Ar: 3,4,5-trimetoxifenilo

BQ: benzoquinona

CCF: cromatografía en capa fina

d: doblete

dd: doble doblete

DDQ: 5,6-diciano-2,3-dicloro-1,4-benzoquinona

D.E.: desviación estándar

2,2-DMP: 2,2-dimetoxipropano

DMEM: Medio de cultivo "Dulbecco's Minimum Essential Medium"

DMF: *N,N'*-dimetilformamida

DMSO: dimetilsulfóxido

D.O: densidad óptica

EDTA: ácido etildiaminotetraacético

FITC: isotiocianato de fluoresceína

GI₅₀: concentración que inhibe el 50 % del crecimiento celular

HRMS: espectro de masas de alta resolución

HT-29: línea celular de carcinoma de colon humano

IP: yoduro de propidio

IR: infrarrojo

J: constante de acoplamiento

m: multiplete

MCF-7: línea celular de carcinoma de mama

MG-63: línea celular de osteosarcoma

MeOH: metanol

MeSO₃H: ácido metanosulfónico

MTT: 2,5-difenil-3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-tetrazol

MW: microondas

TsOH: ácido *p*-toluensulfónico

pir: piridina

PM: peso molecular

PBS: tampón fosfato salino (*phosphate buffered saline*)

PTS: *p*-toluensulfonato de piridinio

R: radical

RPMI: medio de cultivo “Roswell Park Memorial Institute”

RMN ¹H / ¹³C: resonancia magnética nuclear de protón / carbono 13

s: singlete

SN: sobrenadante

t: tiempo

t: triplete

T^a: temperatura

T. a.: temperatura ambiente

THF: tetrahidrofurano

TMSCl: clorotrimetilsilano

TMSCHN₂: trimetilsilil diazometano

VIH: virus de inmunodeficiencia humana

[α]₂₀: rotación específica a 20 °C

Δ: reflujo

δ: desplazamiento químico

λ : longitud de onda

v_{max}: número de onda de máxima vibración

°C: grados Celsius



RESUMEN Y ABSTRACT



-RESUMEN-

La hibridación es una estrategia muy empleada en el descubrimiento de nuevos fármacos en la que, mediante la combinación de diferentes moléculas, se pueden conseguir un número ilimitado de nuevas estructuras, aumentando enormemente así la variabilidad estructural de los compuestos. Existen numerosos casos donde se combina algún producto natural con otros que presenten diferentes estructuras, origen o mecanismo de acción. Este tipo de estrategia se ha empleado desde hace tiempo en el tratamiento del cáncer con el fin de descubrir nuevas terapias, mejorar el perfil farmacológico de las que ya están en uso o evitar resistencias y efectos secundarios.

Dentro de la gran variedad de productos naturales que existen, los lignanos son un grupo de compuestos que han despertado gran interés por sus propiedades farmacológicas, especialmente el grupo de los ciclolignanos, cuyo principal representante es podofilotoxina. Dentro de la quimiomodulación llevada a cabo en el esqueleto de podofilotoxina por nuestro grupo de investigación, el aldehído podofílico fue el compuesto que mejores perspectivas presentó debido a su alta citotoxicidad y selectividad frente a algunas líneas celulares tumorales. Estas características le han convertido en nuestro “cabeza de serie” para posteriores modificaciones, incluyendo la formación de nuevos híbridos con propiedades anticancerosas como los que se presentan en esta memoria.

En este Tesis Doctoral se han sintetizados dos nuevas familias de compuestos híbridos a las que se ha denominado “lignohidroquinonas” y “bisciclolignanos” por combinación del aldehído podofílico con otros compuestos de origen natural que presentan también actividad citotóxica, y en los que el grupo tiene así mismo amplia experiencia, como son las terpenilhidroquinonas o los propios ciclolignanos, con el fin de mejorar la actividad biológica de los precursores por separado. Ambos precursores se han unido a través de enlaces éster mediante espaciadores alifáticos y aromáticos.

Además, se han realizado ensayos de citotoxicidad y ensayos sobre el ciclo celular de los nuevos híbridos sintetizados en comparación con los precursores. Todos los híbridos sintetizados fueron citotóxicos con valores de CI_{50} en el rango de μM o incluso inferior, presentando diferente selectividad en función de la familia estudiada, del espaciador utilizado, de la línea celular y del tiempo de duración de los ensayos. La evaluación del ciclo celular mostró la actividad apoptótica de los compuestos y la capacidad de bloqueo del ciclo en la fase G2/M. Los mejores resultados se han obtenido con el híbrido derivado de monoterpenilhidroquinonas y aldehído podofílico unidos mediante un espaciador aromático. Finalmente se ha podido confirmar que la hibridación es una buena estrategia para combinar moléculas con diferentes propiedades farmacológicas en una única estructura.

-ABSTRACT-

Hybridation is a widely used strategy in rational drug discovery. The combination of different active molecules can provide an unlimited number of combinations, which could greatly increase the chemo-diversity. In this sense, different kinds of natural products with varied structure, origin or mechanism of action have been combined to produce new bioactive entities. The synergistic or additive effect of those chemical entities is a promising approach in case of cancer therapy to avoid resistances or discover new applications for future treatments. Thus, a large number of hybrids have been recently described and applied in the treatment of cancer and other diseases.

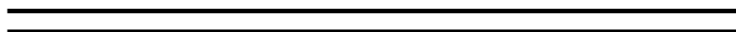
Among the huge variety of natural products, lignans have contributed to remarkable advances in the discovery of new plant-derived drugs, particularly cyclolignans with podophyllotoxin as its main representative. Our research group has been involved for several years in the design and development of new podophyllotoxin derivatives, among which, podophyllic aldehyde presented the most promising perspectives due to its high selective cytotoxicity against some cancer cell lines and therefore, became our lead compound for further modifications including conjugation with other molecules to obtain new anti-tumour drugs.

Two new families of hybrids, named lignohydroquinones and biscyclolignans, have been prepared in this PhD Thesis by conjugation between podophyllic aldehyde and other compounds derived from natural product with contrasted cytotoxic activity such as terpenylhydroquinones and cyclolignans themselves with the aim of improved the biological activities of the precursors separately. Both precursors were attached by aliphatic or aromatic linkers through ester bonds.

Several biological assays have been carried out in order to determine the bioactivity of the new hybrids in comparison with their precursors. All the final hybrids have been cytotoxic in μM range, showing different selectivity depending of the type of hybrids studied. Cell cycle evaluation by flow cytometry confirmed the apoptotic effect of the conjugates and the G2/M arrest. The best results were obtained with the hybrid derived from a monoterpenylhydroquinone and podophyllic aldehyde with an aromatic linker. Finally, it has been confirmed that the hybridation is a good strategy in order to combine molecules with different pharmacological activities in a single drug.



INTRODUCCIÓN



El descubrimiento de nuevos fármacos es una necesidad en la investigación sanitaria. Con el paso del tiempo y hasta nuestros días, se han utilizado diferentes procedimientos para alcanzar este fin en función de las situaciones históricas y sociales, pero siempre ha estado estrechamente ligado a las moléculas obtenidas de fuentes naturales¹.

La importancia de los productos naturales es un hecho constatado, desde el su uso como fármacos en tratamientos basados en la medicina tradicional² hasta los nuevos avances farmacológicos llevados a cabo en los últimos tiempos en este campo.^{3,4,5} Es por este motivo, que la obtención de nuevas entidades farmacológicamente activas a partir de compuestos de origen natural, sigue siendo una práctica habitual en el descubrimiento de nuevos fármacos, bien empleando la estructura tal y como se extrae de la naturaleza, o bien, por modificación estructural de las mismas.^{6,7}

Las fuentes naturales para la obtención de compuestos bioactivos son muy amplias. Cabe destacar que en la actualidad existen numerosos estudios sobre organismos marinos que están aportando nuevas estructuras y mecanismos de acción aún desconocidos,^{8,9} pero sin duda, son los organismos terrestres como plantas,¹⁰ hongos¹¹ y

¹ Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 629-661.

² Yuan, H.; Ma, Q.; Ye, L.; Piao, G. The traditional medicine and modern medicine from natural products. *Molecules* **2016**, *21*, 10.3390/molecules21050559.

³ Luo, Y.; Cobb, R. E.; Zhao, H. Recent advances in natural product discovery. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2014**, *30*, 230-237.

⁴ Martínez-Montiel, N.; Rosas-Murrieta, N. H.; Martínez-Montiel, M.; Gaspariano-Cholula, M. P.; Martínez-Contreras, R. D. Microbial and Natural Metabolites That Inhibit Splicing: A Powerful Alternative for Cancer Treatment. *Biomed. Res. Int.* **2016**, *2016*, 3681094.

⁵ Ochoa, J. L.; Bray, W. M.; Lokey, R. S.; Linington, R. G. Phenotype-Guided Natural Products Discovery Using Cytological Profiling. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 2242-2248.

⁶ Cragg, G. M.; Grothaus, P. G.; Newman, D. J. New horizons for old drugs and drug leads. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 703-723.

⁷ Guo, Z. The modification of natural products for medical use. *Acta Pharma. Sin. B.* **2017**, *7*, 119-136.

⁸ Kiuru, P.; D'Auria, M. V.; Muller, C. D.; Tammela, P.; Vuorela, H.; Yli-Kauhaluoma, J. Exploring marine resources for bioactive compounds. *Planta Med.* **2014**, *80*, 1234-1246.

⁹ Catalani, E.; Proietti Serafini, F.; Zecchini, S.; Picchiotti, S.; Fausto, A. M.; Marcantoni, E.; Buonanno, F.; Ortenzi, C.; Perrotta, C.; Cervia, D. Natural products from aquatic eukaryotic microorganisms for cancer therapy: Perspectives on anti-tumour properties of ciliate bioactive molecules. *Pharmacol. Res.* **2016**, *113*, Part A, 409-420.

¹⁰ Ouyang, L.; Luo, Y.; Tian, M.; Zhang, S. Y.; Lu, R.; Wang, J. H.; Kasimu, R.; Li, X. Plant natural products: from traditional compounds to new emerging drugs in cancer therapy. *Cell Prolif.* **2014**, *47*, 506-515.

¹¹ Macheleidt, J.; Mattern, D. J.; Fischer, J.; Netzker, T.; Weber, J.; Schroeckh, V.; Valiante, V.; Brakhage, A. A. Regulation and role of fungal secondary metabolites. *Annu. Rev. Genet.* **2016**, *50*, 371-392.

microorganismos¹² los que constituyen una de las fuentes más estudiadas por tradición y disponibilidad.

Los productos naturales se aplican prácticamente en todos los campos de la terapéutica, representando un porcentaje bastante elevado de los fármacos que hay en el mercado. Compuestos naturales, derivados y productos biológicos suponen 40 % de los fármacos aprobados para uso humano entre 1981 y 2014. Este porcentaje aumenta hasta el 54 % si se incluyen aquellos fármacos sintéticos basados en un producto natural.¹

La variabilidad estructural es una de las características fundamentales de los productos naturales y esto ha hecho que encuentren aplicación en diferentes tipos de enfermedades,^{13,14} pero donde juegan un papel muy importante es en el tratamiento del cáncer,¹⁵ donde hasta un 60 % de los fármacos usados para este fin tiene su origen en estructuras naturales.

Esta importancia de los productos naturales en el tratamiento del cáncer y la necesidad de terapias eficaces, que eviten la aparición de resistencias y efectos secundarios, ha motivado el trabajo de esta Tesis Doctoral donde se van a sintetizar nuevos compuestos basados en una familia de productos naturales, los ciclolignanos, y empleando la hibridación como estrategia para la síntesis y mejora del perfil terapéutico del representante más importante de esta familia, la podofilotoxina.

¹² Martínez-Klimova, E.; Rodríguez-Pena, K.; Sánchez, S. Endophytes as sources of antibiotics. *Biochem. Pharmacol.* **2017**, *134*, 1-17.

¹ Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 629-661.

¹³ Cheuka, P. M.; Mayoka, G.; Mutai, P.; Chibale, K. The Role of Natural Products in Drug Discovery and Development against Neglected Tropical Diseases. *Molecules* **2016**, *22*, 10.3390/molecules22010058.

¹⁴ Dong, M.; Pfeiffer, B.; Altmann, K. H. Recent developments in natural product-based drug discovery for tuberculosis. *Drug Discov. Today* **2017**, *22*, 585-591.

¹⁵ Cragg, G. M.; Pezzuto, J. M. Natural products as a vital source for the discovery of cancer chemotherapeutic and chemopreventive agents. *Med. Princ Pract.* **2016**, *25*, 41-59.

Podofilotoxina e hibridación molecular

Entre todos los compuestos naturales hemos centrado nuestra atención en la familia de los lignanos, que destaca por la gran variedad de actividades farmacológicas descritas para ellos, como las propiedades antifúngicas, antirreumáticas, inmunomoduladoras, antirretrovirales y citotóxicas.¹⁶

Hoy en día se siguen descubriendo nuevas estructuras de este grupo de metabolitos secundarios que aparecen ampliamente distribuidos en la naturaleza.^{17,18} Los lignanos son biosintetizados a partir de la ruta del ácido sikímico y se caracterizan estructuralmente por la unión de fenilpropanoides (C₆-C₃) a través de las posiciones C-8 y C-8'.¹⁹ Dentro de este gran grupo de compuestos que constituyen los lignanos se encuentra el grupo de los ciclolignanos²⁰, que presentan en su estructura una unión carbono-carbono adicional y cuyo representante más conocido es la podofilotoxina.

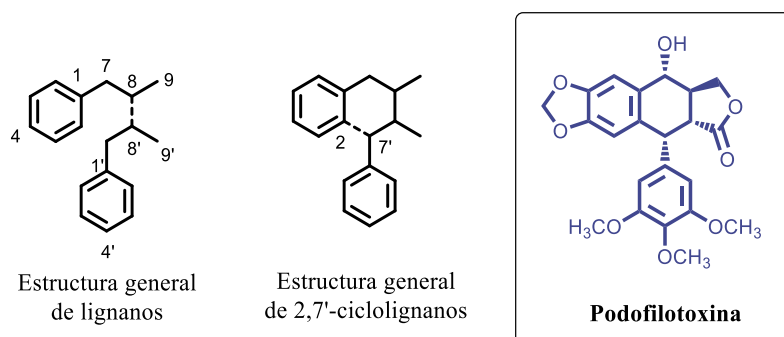


Figura 1: Estructura general de lignanos y 2,7'-ciclolignanos y podofilotoxina

Podofilotoxina es un ciclolignano presente en especies de muchos géneros del reino vegetal¹⁶ pero que generalmente se aísla de la resina del rizoma de las especies del género *Podophyllum* (Familia Berberidaceae). Existen numerosos trabajos descritos en

¹⁶ Zhang, J.; Chen, J.; Liang, Z.; Zhao, C. New lignans and their biological activities. *Chem. Biodivers.* **2014**, *11*, 1-54.

¹⁷ Gordaliza, M.; García, P. A.; Miguel del Corral, J. M.; Castro, M. A.; Gómez-Zurita, M. A. Podophyllotoxin: distribution, sources, applications and new cytotoxic derivatives. *Toxicol.* **2004**, *44*, 441-459.

¹⁸ Teponno, R. B.; Kusari, S.; Spiteller, M. Recent advances in research on lignans and neolignans. *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33*, 1044-1092.

¹⁹ Ayres, D. C.; Loike, J. D. *Lignans: chemical, biological and clinical properties*; Cambridge University Press: Cambridge, **1990**.

²⁰ Moss, G. P. Nomenclature of Lignans and Neolignans. *Pure Appl. Chem.* **2000**, *72*, 1493-1523.

bibliografía sobre la síntesis total del esqueleto de podofilotoxina,^{21,22,23} pero aún no es suficientemente rentable su obtención por esta vía dada la complejidad que a su estructura confieren sus cuatro carbonos asimétricos. Más recientemente se han diseñado procesos biotecnológicos que mejoran enormemente los problemas de estereoselectividad y regioselectividad en la síntesis del esqueleto de podofilotoxina.²⁴

El descubrimiento de la actividad de este compuesto se remonta siglos atrás, cuando fue utilizado en la medicina tradicional de América del Norte y del Himalaya como catártico y antihelmíntico.¹⁹ Su efecto como antivírico también ha sido estudiado y ha hecho que podofilotoxina sea uno de los agentes empleados en el tratamiento del *Condyloma acuminatum* causado por el virus del papiloma humano,²⁵ llegándose a conocer el mecanismo molecular por el que actúa el compuesto natural dentro del virus.²⁶ Pero sin duda, su efecto citotóxico es el que mayor interés ha despertado por su posible utilización como antitumoral. Algunos de sus derivados más recientes han mostrado también propiedades antioxidantes²⁷ y antitripanosoma,²⁸ antiinflamatorias y analgésicas,²⁹ habiendo sido usados también como insecticidas.³⁰

¹⁶ Zhang, J.; Chen, J.; Liang, Z.; Zhao, C. New lignans and their biological activities. *Chem. Biodivers.* **2014**, *11*, 1-54.

²¹ Andrews, R. C.; Teague, S. J.; Meyers, A. I. Asymmetric total synthesis of (-)-podophyllotoxin. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7854-7858.

²² Van Speybroeck, R.; Guo, H.; Van der Eycken, J.; Vandewalle, M. Enantioselective total synthesis of (-)-epipodophyllotoxin and (-)-podophyllotoxin. *Tetrahedron.* **1991**, *47*, 4675-4682.

²³ Reynolds, A. J.; Scott, A. J.; Turner, C. I.; Sherburn, M. S. The intramolecular carboxyarylation approach to podophyllotoxin. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12108-12109.

²⁴ Ionkova, I. Anticancer Lignans - from Discovery to Biotechnology. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2011**, *11*, 843-856.

¹⁹ Ayres, D. C.; Loike, J. D. *Lignans: chemical, biological and clinical properties*; Cambridge University Press: Cambridge, **1990**.

²⁵ Bernard, H. Established and potential strategies against papillomavirus infections. *J Antimicrob. Chemother.* **2004**; *53*, 137-139.

²⁶ Saitoh, T.; Kuramochi, K.; Imai, T.; Takata, K.; Takehara, M.; Kobayashi, S.; Sakaguchi, K.; Sugawara, F. Podophyllotoxin directly binds a hinge domain in E2 of HPV and inhibits an E2/E7 interaction in vitro. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 5815-5825.

²⁷ Zhang, J.; Zhang, Z.; Hui, L.; Chen, S.; Tian, X. Novel semisynthetic spin-labeled derivatives of podophyllotoxin with cytotoxic and antioxidative activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 983-986.

²⁸ Uddin, M. J.; Smithson, D. C.; Brown, K. M.; Crews, B. C.; Connelly, M.; Zhu, F.; Marnett, L. J.; Guy, R. K. Podophyllotoxin analogues active versus *Trypanosoma brucei*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 1787-1791.

²⁹ Guerrero, E.; Abad, A.; Montenegro, G.; Del Olmo, E.; Lopez-Perez, J. L.; San Feliciano, A. Analgesic and anti-inflammatory activity of podophyllotoxin derivatives. *Pharm. Biol.* **2013**, *51*, 566-572.

³⁰ a) Liu, Y.; Zhao, C.; Yang, L.; Zhao, Y.; Liu, T. Evaluation of insecticidal activity of podophyllotoxin derivatives against *Brontispa longissima*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2011**, *99*, 39-44. b) Huang, J.; Xu, M.; Li, S.; He, J.; Xu, H. Synthesis of some ester derivatives of 4'-demethoxyepipodophyllotoxin/2'-chloro-4'-demethoxyepipodophyllotoxin as insecticidal agents against oriental armyworm, *Mythimna separata* Walker. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 511-517.

Podofilotoxina debe su acción farmacológica a su capacidad para inhibir la polimerización de la tubulina, proteína fundamental en la formación de los microtúbulos que constituyen, entre otros muchos elementos, el huso acromático implicado en el proceso de mitosis celular. Por este motivo, y dado que las células tumorales se encuentran en continua división, esta diana ha resultado muy eficaz y sigue siendo un objetivo farmacológico para la búsqueda de nuevos agentes anticancerosos.³¹ Los diferentes fármacos que interactúan con los microtúbulos se unen a sitios específicos y distintos de esta proteína, siendo éste el criterio que se ha seguido para clasificar a estos compuestos.³²

Existen tres sitios de unión principales conocidos con el nombre del primer compuesto para el que se describieron: sitio de unión de la colchicina, sitio de unión de los alcaloides de la vinca y sitio de unión del taxol.^{33,34}

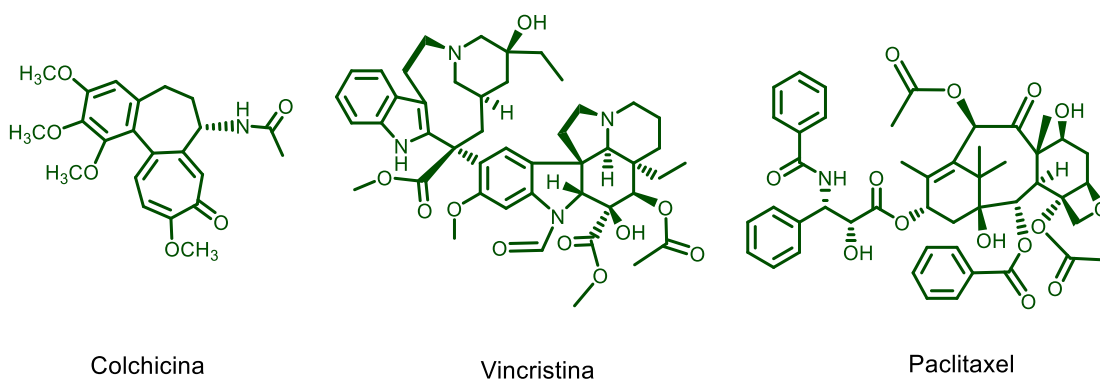


Figura 2: Compuestos de origen natural que dan lugar a las familias de fármacos que interfieren en la polimerización de la tubulina.

Los compuestos que interactúan con el sitio de unión del taxol promueven la polimerización de la tubulina, estabilizando los microtúbulos y conduciendo finalmente a la célula a un proceso de apoptosis. Debido a este mecanismo de acción, se conocen como agentes estabilizantes del huso acromático. Los compuestos que se unen al sitio

³¹ Zhao, Y.; Mu, X.; Du, G. Microtubule-stabilizing agents: New drug discovery and cancer therapy. *Pharmacol. Ther.* **2016**, *162*, 134-143.

³² Jordan, M. A.; Wilson, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer.* **2004**, *4*, 253-265.

³³ Yue, Q. X.; Liu, X.; Guo, D. A. Microtubule-binding natural products for cancer therapy. *Planta Med.* **2010**, *76*, 1037-1043.

³⁴ Stanton, R. A.; Gernert, K. M.; Nettles, J. H.; Aneja, R. Drugs that target dynamic microtubules: a new molecular perspective. *Med. Res. Rev.* **2011**, *31*, 443-481.

de los alcaloides de la vinca o al de la colchicina se denominan agentes desestabilizantes ya que inhiben la polimerización de la proteína y la consiguiente formación de los microtúbulos. Por tanto, cuando la célula entra en el proceso de mitosis se produce la diferenciación de los cromosomas, pero éstos no pueden separarse ya que este proceso es dependiente de la formación del huso acromático. De esta manera, el ciclo celular se detiene en metafase y los cromosomas se mantienen juntos hasta la muerte celular horas más tarde.^{35,17,19} Dentro de los compuestos que se unen al sitio de la colchicina³⁶ se encuentra podofilotoxina.

Si bien es cierto que podofilotoxina posee una citotoxicidad frente a células tumorales muy elevada, los efectos secundarios como la toxicidad gastrointestinal o la falta de selectividad impiden que pueda ser empleada directamente en quimioterapia, pero dadas sus potentes propiedades citotóxicas, este compuesto se ha convertido en “cabeza de serie” para la semisíntesis de nuevos fármacos con actividad antitumoral. Se han modificado cada uno de sus anillos introduciendo diferentes grupos funcionales¹⁷ y heterociclos,³⁷ y aún hoy sigue siendo punto de partida de nuevos compuestos con actividades biológicas.³⁸

De algunos estudios de modificación estructural de podofilotoxina han surgido fármacos con potentes propiedades anticancerosas como etopósido, tenipósido o etopofós.³⁹

³⁵ Guerram, M.; Jiang, Z.; Zhang, L. Podophyllotoxin, a medicinal agent of plant origin: past, present and future. *Chin. J. Nat. Medicines* **2012**, *10*, 161-169.

¹⁷ Gordaliza, M.; García, P. A.; del Corral, J. M.; Castro, M. A.; Gomez-Zurita, M. A. Podophyllotoxin: distribution, sources, applications and new cytotoxic derivatives. *Toxicon*. **2004**, *44*, 441-459.

¹⁹ Ayres, D. C.; Loike, J. D. *Lignans: chemical, biological and clinical properties*; Cambridge University Press: Cambridge, 1990; pp [256].

³⁶ Zefirova, O. N.; Diikov, A. G.; Zyk, N. V.; Zefirov, N. S. Ligands of the colchicine site of tubulin: A common pharmacophore and new structural classes. *Russ. Chem. Bull.* **2007**, *56*, 680-688.

¹⁷ Gordaliza, M.; García, P. A.; Miguel del Corral, J. M.; Castro, M. A.; Gómez-Zurita, M. A. Podophyllotoxin: distribution, sources, applications and new cytotoxic derivatives. *Toxicon*. **2004**, *44*, 441-459.

³⁷ Castro, M. A.; García, P. A.; Hernandez, A. P.; Diez, D. "An overview on heterocyclic podophyllotoxin derivatives" in "Chemistry and Properties in Targets in Heterocyclic Systems". Vol 19, pp.28-61 Italian Society of Chemistry, 2016.

³⁸ Yu, X.; Che, Z.; Xu, H. Recent advances in the chemistry and biology of podophyllotoxins. *Chemistry*. **2017**, *23*, 4467-4526.

³⁹ Meresse, P.; Bertounesque, E.; Imbert, T.; Monneret, C. Synthetic approaches to condensed aromatic analogues from etoposide, synthesis of A-ring pyridazine picroetoposide. *Tetrahedron*. **1999**, *55*, 12805-12818.

Estos derivados semisintéticos (figura 3) presentan dentro de su estructura un resto glicosídico en la posición C-7 β así como una desmetilación en O-4' que no solo mejora notablemente el perfil farmacológico de los compuestos en comparación con podofilotoxina, sino que ha provocado un cambio en el mecanismo de acción, siendo estos derivados semisintéticos inhibidores de la topoisomerasa II del ADN.⁴⁰ Estos fármacos son extensamente empleados en el tratamiento de tumores sólidos como el cáncer de pulmón, carcinoma testicular y cánceres hematológicos como linfomas o leucemias, estando etopósido incluido dentro de la lista de medicamentos esenciales que propone la OMS.⁴¹

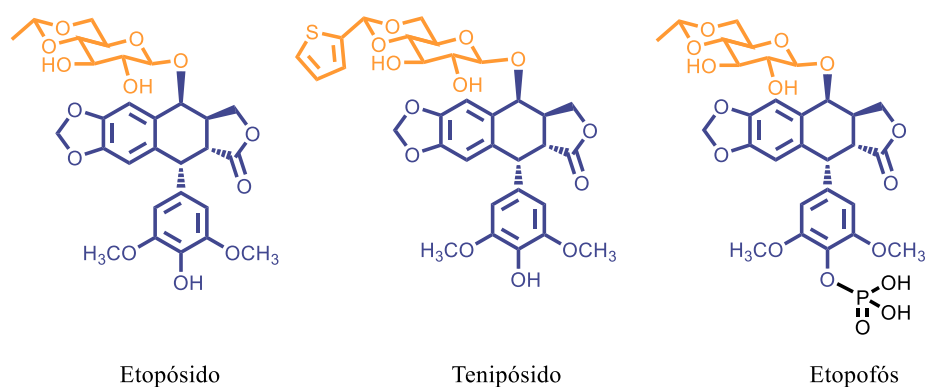


Figura 3: Derivados ciclignánicos inhibidores de la DNA-topoisomerasa II en uso clínico

A raíz de los efectos secundarios de etopósido como la inmunosupresión o la resistencia que se genera al fármaco tras un largo tratamiento, se ha seguido investigando en la búsqueda de nuevas estructuras que mejoren las propiedades farmacológicas.

⁴⁰ Montecucco, A.; Zanetta, F.; Biamonti, G. Molecular mechanisms of etoposide. *EXCLI J.* **2015**, *14*, 95-108.

⁴¹ World Health Organization, *WHO Model Lists Of Essential Medicines*, **2015**. http://search.credoreference.com/content/entry/sagepas/who_model_lists_of_essential_medicines/0

Algunos ejemplos de este tipo de inhibidores de la topoisomerasa se recogen en la figura 4.^{42,43,44,45,46,47}

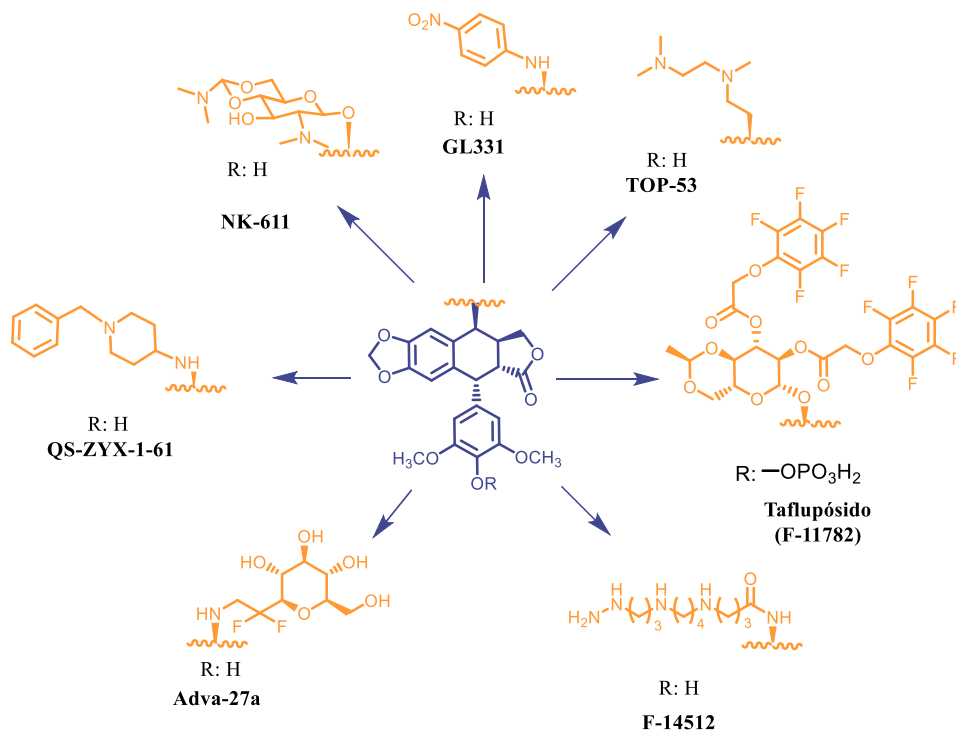


Figura 4: Otros derivados ciclolignánicos inhibidores de la topoisomerasa II

Desde el punto de vista químico, derivados como etopósido o tenipósido, pueden verse como fármacos conjugados formados por unión de dos moléculas diferentes, por un lado 4'-*O*-desmetilepipodofilotoxina y, por otro, un monosacárido, formando en conjunto un compuesto híbrido.

⁴² Byl, J. A. W.; Cline, S. D.; Utsugi, T.; Kobunai, T.; Yamada, Y.; Osheroff, N. DNA topoisomerase II as the target for the anticancer drug TOP-53: mechanistic basis for drug Action. *Biochemistry (N. Y.)* **2001**, *40*, 712-718.

⁴³ Barret, J.; Kruczynski, A.; Etiévant, C.; Hill, B. T. Synergistic effects of F 11782, a novel dual inhibitor of topoisomerases I and II, in combination with other anticancer agents. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2002**, *49*, 479-486.

⁴⁴ Chen, M. C.; Pan, S. L.; Shi, Q.; Xiao, Z.; Lee, K. H.; Li, T. K.; Teng, C. M. QS-ZYX-1-61 induces apoptosis through topoisomerase II in human non-small-cell lung cancer A549 cells. *Cancer. Sci.* **2012**, *103*, 80-87.

⁴⁵ Kruczynski, A.; Pillon, A.; Creancier, L.; Vandenberghe, I.; Gomes, B.; Brel, V.; Fournier, E.; Annereau, J. P.; Currie, E.; Guminski, Y.; Bonnet, D.; Bailly, C.; Guilbaud, N. F14512, a polyamine-vectorized anticancer drug, currently in clinical trials exhibits a marked preclinical anti-leukemic activity. *Leukemia.* **2013**, *27*, 2139-2148.

⁴⁶ Liu, Y. Q.; Tian, J.; Qian, K.; Zhao, X. B.; Morris-Natschke, S. L.; Yang, L.; Nan, X.; Tian, X.; Lee, K. H. Recent progress on C-4-modified podophyllotoxin analogs as potent antitumor agents. *Med. Res. Rev.* **2015**, *35*, 1-62.

⁴⁷ Merzouki, A.; Buschmann, M. D.; Jean, M.; Young, R. S.; Liao, S.; Gal, S.; Li, Z.; Slilaty, S. N. Adva-27a, a novel podophyllotoxin derivative found to be effective against multidrug resistant human cancer cells. *Anticancer Res.* **2012**, *32*, 4423-4432.

Esta estrategia, la hibridación o conjugación molecular, es una vía de obtención de fármacos mediante el diseño racional de nuevas estructuras que combinan dos o más moléculas de origen natural o sintético, dando lugar a los “sistemas híbridos” o “conjugados”.⁴⁸ Estos nuevos fármacos son sintetizados con el fin de mejorar el perfil farmacológico de las moléculas originales modulando la farmacocinética, el transporte a través de las membranas o evitar la degradación metabólica.^{49,50} También puede emplearse para aumentar la sinergia de los dos componentes que forman el híbrido o evitar las resistencias adquiridas a los fármacos.⁵¹

De hecho, la hibridación es una estrategia frecuente en la propia naturaleza donde surgen compuestos de origen biogénico mixto que amplían considerablemente la variabilidad estructural de los compuestos naturales, algunos de los cuales se caracterizan por poseer actividades farmacológicas muy interesantes.⁵² Como ejemplo se pueden citar productos naturales como la estricnina, un potente veneno utilizado en animales que surge de la combinación de un alcaloide derivado del triptófano y el monoterpeno loganina, precursor de los iridoides.⁵³ Otro ejemplo es la digoxina, uno de los fármacos más efectivos en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, que puede considerarse como un híbrido formado por un esqueleto de origen esteroídico y un polisacárido.⁵³

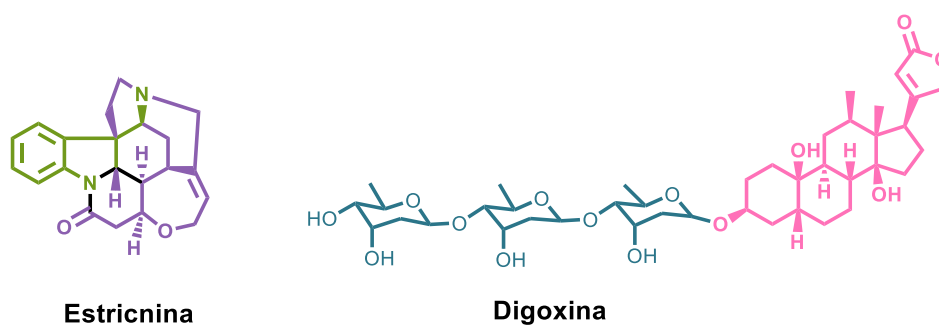


Figura 5: fármacos con estructura híbrida presentes en la naturaleza

⁴⁸ Ojima, I. Modern molecular approaches to drug design and discovery. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 2-3.

⁴⁹ Jia, J.; Zhu, F.; Ma, X.; Cao, Z.; Cao, Z. W.; Li, Y.; Li, Y. X.; Chen, Y. Z. Mechanisms of drug combinations: interaction and network perspectives. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 111-128.

⁵⁰ Fortin, S.; Berube, G. Advances in the development of hybrid anticancer drugs. *Expert Opin. Drug Discov.* **2013**, *8*, 1029-1047.

⁵¹ Bansal, Y.; Silakari, O. Multifunctional compounds: Smart molecules for multifactorial diseases. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *76*, 31-42.

⁵² Tietze, L. F.; Bell, H. P.; Chandrasekhar, S. Natural product hybrids as new leads for drug discovery. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2003**, *42*, 3996-4028.

⁵³ Mehta, G.; Singh, V. Hybrid systems through natural product leads: an approach towards new molecular entities. *Chem. Soc. Rev.* **2002**, *31*, 324-334.

Esta estrategia de hibridación está siendo así mismo muy aplicada en el descubrimiento de nuevos fármacos, donde se combinan todo tipo de estructuras, naturales o sintéticas, para formar los nuevos híbridos, muy especialmente en el tratamiento del cáncer,⁵⁴ donde la variabilidad estructural y de actividades farmacológicas que se generan por esta estrategia amplía enormemente las posibilidades de nuevas aplicaciones.⁵⁵

Existen muchos ejemplos de derivados de podofilotoxina descritos en bibliografía donde se puede observar que etopósido y derivados no son los únicos ejemplos en los que se ha intentado mejorar el perfil de este producto natural mediante esta estrategia.

Los grupos de Zi⁵⁶ y Yang⁵⁷ han propuesto recientemente otros compuestos conjugados de epipodofilotoxina con azúcares diferentemente sustituidos unidos a la posición C-7β del ciclolignano a través de un espaciador que incluye un anillo de triazol.

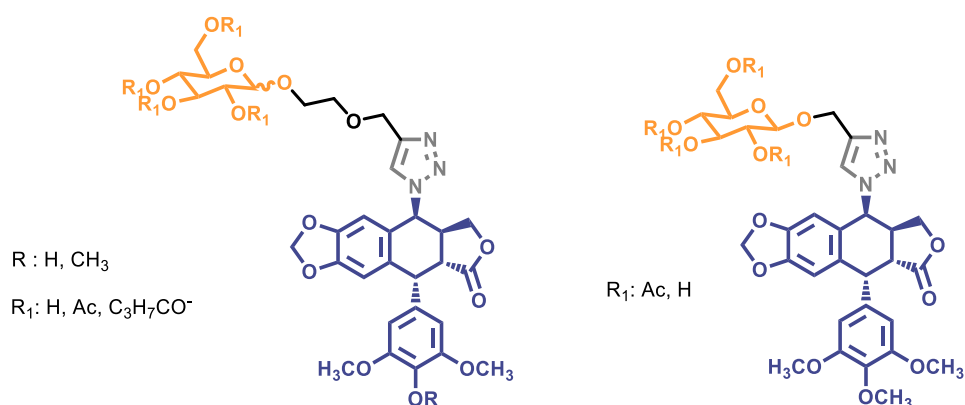


Figura 6: Híbridos de epipodofilotoxina y glicósidos unidos mediante un espaciador que contiene un anillo de triazol

⁵⁴ Berube, G. An overview of molecular hybrids in drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **2016**, *11*, 281-305.

⁵⁵ Decker, M. Hybrid molecules incorporating natural products: applications in cancer therapy, neurodegenerative disorders and beyond. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 1464-1475.

⁵⁶ Zi, C.; Xu, F.; Li, G.; Li, Y.; Ding, Z.; Zhou, J.; Jiang, Z.; Hu, J. Synthesis and Anticancer Activity of Glucosylated Podophyllotoxin Derivatives Linked via 4 beta-Triazole Rings. *Molecules.* **2013**, *18*, 13992-14012.

⁵⁷ Yang, R.; Ding, H.; Wu, Y.; Xiao, Q. Synthesis Podophyllotoxin Derivatives Via "Click Chemistry". *Chemical, Material and Metallurgical Engineering Iii, Pts 1-3.* **2014**, 881-883, 400-404.

También a través de un espaciador de triazol, Banday⁵⁸ y colaboradores han sintetizado híbridos de epipodofilotoxina con chalconas diferentemente sustituidas, obteniéndose resultados de citotoxicidad mejores que los de etopósido.

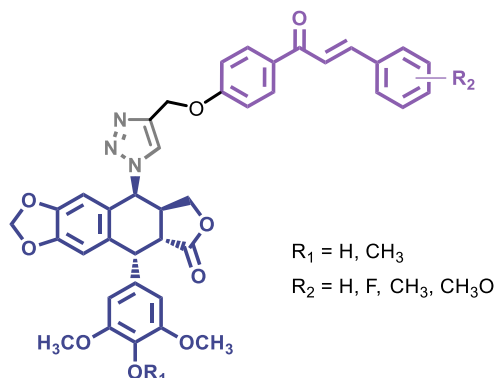


Figura 7: Híbridos de epipodofilotoxina con chalconas

Una estrategia seguida por muchos autores es la hibridación con productos naturales o derivados semisintéticos de ellos. De esta manera se encuentran híbridos de podofilotoxina con alcaloides como camptotecina,⁵⁹ un inhibidor de la Topoisomerasa I, y con vinorelbina,⁶⁰ uno de los alcaloides de la vinca, y por tanto, inhibidor de la polimerización de la tubulina.

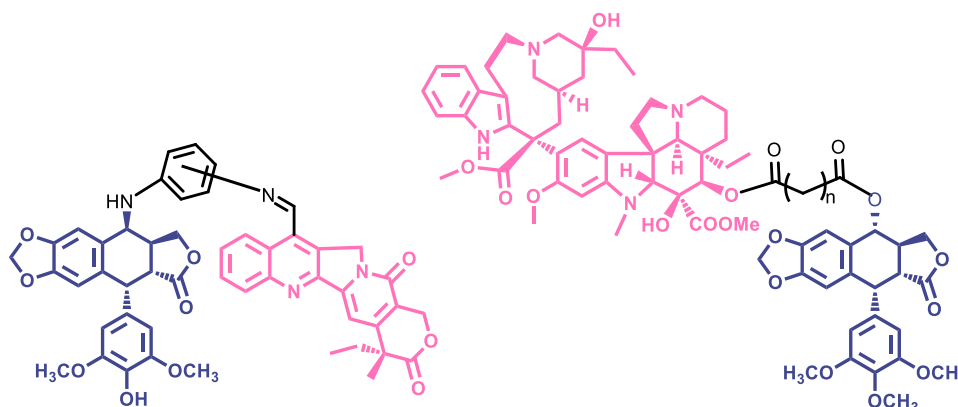


Figura 8: Derivados de podofilotoxina con los alcaloides camptotecina y vinorelbina

⁵⁸ Banday, A. H.; Kulkarni, V. V.; Hruby, V. J. Design, synthesis, and biological and docking studies of novel epipodophyllotoxin-chalcone hybrids as potential anticancer agents. *MedChemComm.* **2015**, *6*, 94-104.

⁵⁹ Ye, D.; Shi, Q.; Leung, C.; Kim, S.; Park, S.; Gullen, E. A.; Jiang, Z. L.; Zhu, H.; Morris-Natschke, S. L.; Cheng, Y.; Lee, K. Antitumor agents 294. Novel E-ring-modified camptothecin-4 β -anilino-4'-O-demethyl-epipodophyllotoxin conjugates as DNA topoisomerase I inhibitors and cytotoxic agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 4489-4494.

⁶⁰ Passarella, D.; Giardini, A.; Peretto, B.; Fontana, G.; Sacchetti, A.; Silvani, A.; Ronchi, C.; Cappelletti, G.; Cartelli, D.; Borlak, J.; Danieli, B. Inhibitors of tubulin polymerization: Synthesis and biological evaluation of hybrids of vindoline, anhydrovinblastine and vinorelbine with thiocolchicine, podophyllotoxin and baccatin III. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 6269-6285.

En los últimos trabajos recogidos en bibliografía sobre hibridación de podofilotoxina se pueden encontrar los del grupo de Zhang, que han sintetizado híbridos con pterostilbena, un derivado de resveratrol,⁶¹ fármaco al que se le atribuyen propiedades antioxidantes y anticancerígenas.⁶² A su vez, este grupo ha presentado un trabajo donde se describe la obtención y evaluación de conjugados de podofilotoxina con ácido *trans*-retinoico (ATRA, *all-transretinoic acid*) una de las formas activas de la vitamina A, al que también se le atribuyen propiedades anticancerígenas.⁶³ Del mismo modo que con la vitamina A, se han descrito otros híbridos con biotina, vitamina del grupo B.²⁶

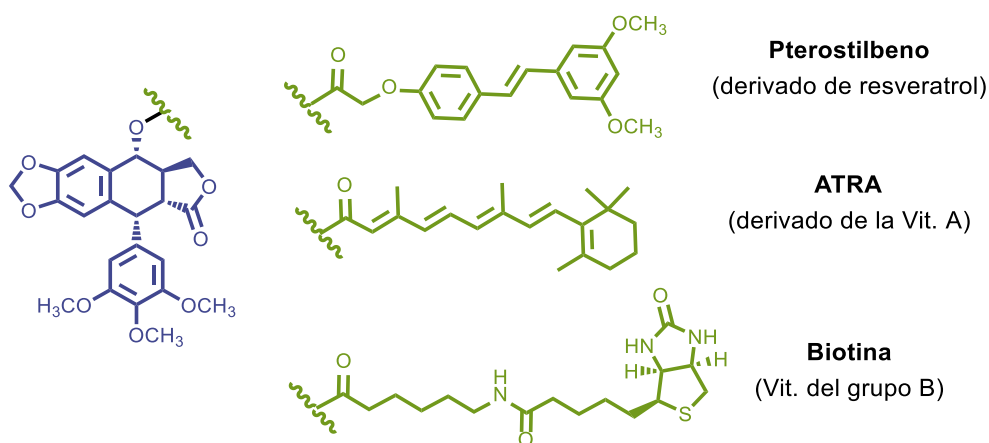


Figura 9: Híbridos de podofilotoxina con pterostilbena y vitaminas.

⁶¹ Zhang, L.; Wang, J.; Liu, L.; Zheng, C.; Wang, Y.; Chen, Y.; Wei, G. Podophyllotoxin-pterostilbene fused conjugates as potential multifunctional antineoplastic agents against human uveal melanoma cells. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 10601-10608.

⁶² Fulda, S. Resveratrol and derivatives for the prevention and treatment of cancer. *Drug Discov. Today.* **2010**, *15*, 757-765.

⁶³ Zhang, L.; Wang, J.; Liu, L.; Zheng, C.; Wang, Y. Synthesis and antiproliferative activity of novel All-Trans-Retinoic Acid-Podophyllotoxin conjugate towards Human Gastric Cancer Cells. *Molecules.* **2017**, *22*, 10.3390/molecules22040628.

²⁶ Saitoh, T.; Kuramochi, K.; Imai, T.; Takata, K.; Takehara, M.; Kobayashi, S.; Sakaguchi, K.; Sugawara, F. Podophyllotoxin directly binds a hinge domain in E2 of HPV and inhibits an E2/E7 interaction in vitro. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 5815-5825.

El grupo de Kamal y colaboradores ha sintetizado numerosos análogos de epipodofilotoxina con diferentes derivados nitrogenados en la posición C-7β, incluyendo análogos de combretastatinas,⁶⁴ sulfamidas,⁶⁵ quinazolininas,⁶⁶ y ácidos cinámicos.⁶⁷

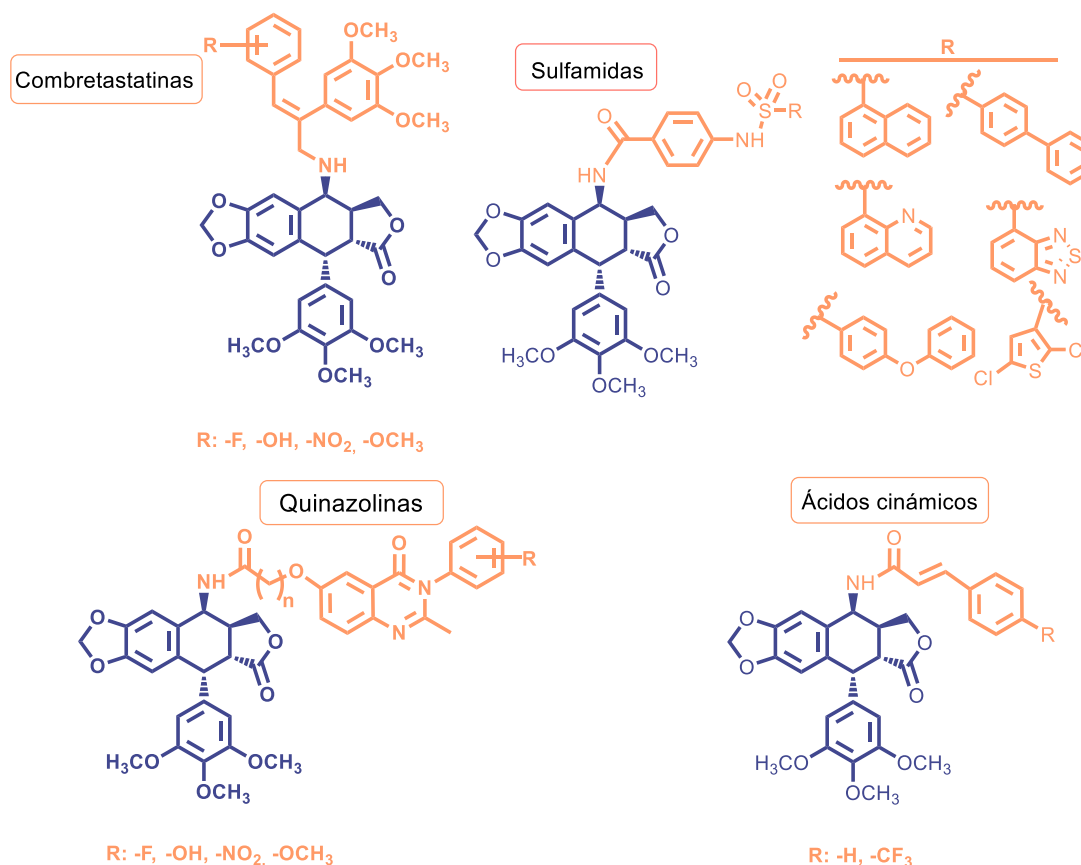


Figura 10: Diferentes híbridos de 7β-aminoepipodofilotoxina sintetizados por Kamal y colaboradores

⁶⁴ Kamal, A.; Kumar, B. A.; Suresh, P.; Shankaraiah, N.; Kumar, M. S. An efficient one-pot synthesis of benzothiazolo-4β-anilino-podophyllotoxin congeners: DNA topoisomerase-II inhibition and anticancer activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 350-353.

⁶⁵ Kamal, A.; Suresh, P.; Ramaiah, M. J.; Mallareddy, A.; Imthiajali, S.; Pushpavalli, S N C V L; Lavanya, A.; Pal-Bhadra, M. Synthesis and biological evaluation of 4β-sulphonamido and 4β-[(4'-sulphonamido)benzamide] podophyllotoxins as DNA topoisomerase-IIα and apoptosis inducing agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 2054-2066.

⁶⁶ Kamal, A.; Tamboli, J. R.; Vishnuvardhan, M. V.; Adil, S. F.; Nayak, V. L.; Ramakrishna, S. Synthesis and anticancer activity of heteroaromatic linked 4β-amido podophyllotoxins as apoptotic inducing agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 273-280.

⁶⁷ Kamal, A.; Nayak, V. L.; Bagul, C.; Vishnuvardhan, M. V.; Mallareddy, A. Investigation of the mechanism and apoptotic pathway induced by 4β-cinnamido linked podophyllotoxins against human lung cancer cells A549. *Apoptosis.* **2015**, *20*, 1518-1529.

Además, este mismo grupo ha sintetizado una serie de híbridos a partir de dos unidades de epipodofilotoxina, a los que han denominado bisepipodofilotoxinas,⁶⁸ y que están unidas por las posiciones C-7 β mediante diferentes espaciadores diaminaados más o menos rígidos mejorando los valores de citotoxicidad del fármaco etopósido.

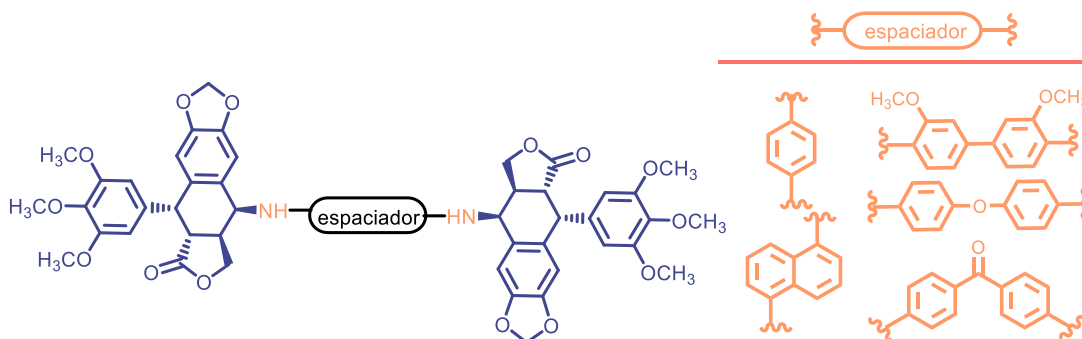


Figura 11: Bisepipodofilotoxinas

Por su parte, el grupo de Zhang también ha publicado recientemente un trabajo donde se presenta la síntesis de híbridos de podofilotoxina con fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), inhibidores de la enzima ciclooxigenasa. Se ha demostrado que las zonas cercanas a los tumores presentan una elevada actividad de esta enzima por lo que se pretende añadir selectividad, conjugando el producto natural citotóxico con estos inhibidores enzimáticos.⁶⁹

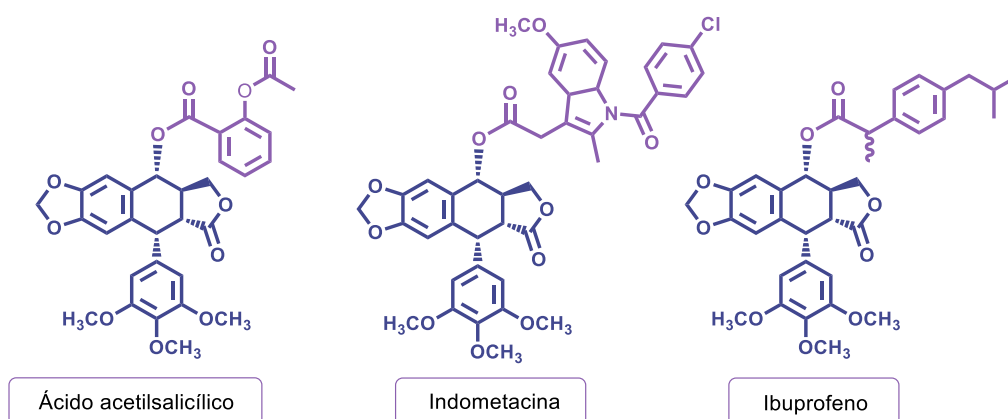


Figura 12: Híbridos de podofilotoxina con AINEs

⁶⁸ Kamal, A.; Laxman, E.; Ramesh Khanna, G. B.; Reddy, P S M M; Rehana, T.; Arifuddin, M.; Neelima, K.; Kondapi, A. K.; Dastidar, S. G. Design, synthesis, biological evaluation and QSAR studies of novel bisepipodophyllotoxins as cytotoxic agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 4197-4209.

⁶⁹Zhang, L.; Liu, L.; Zheng, C.; Wang, Y.; Nie, X.; Shi, D.; Chen, Y.; Wei, G.; Wang, J. Synthesis and biological evaluation of novel podophyllotoxin-NSAIDs conjugates as multifunctional anti-MDR agents against resistant human hepatocellular carcinoma Bel-7402/5-FU cells. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *131*, 81-91.

Pero la posición C-7 no es el único punto de anclaje de otras estructuras a los derivados de podofilotoxina. Otros autores han introducido derivados de 5-fluorouracilo a través de la posición O-4' como de Guan y colaboradores,⁷⁰ donde se han unido ambos fragmentos del híbrido a través de cadenas de espaciadores flexibles.

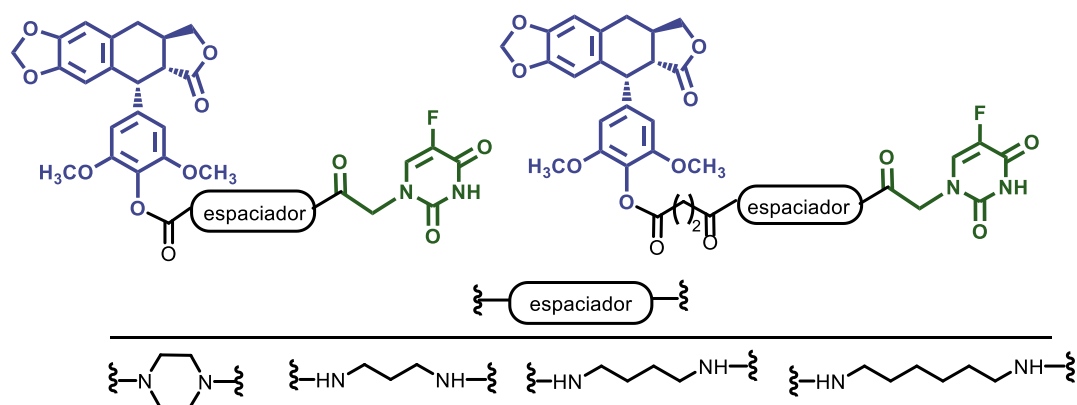


Figura 13: Híbridos de desoxipodofilotoxina con 5-fluorouracilo.

En nuestro grupo de investigación también se ha iniciado la síntesis de híbridos de podofilotoxina que se detallan en el apartado siguiente junto con aquellas modificaciones estructurales más relevantes sobre podofilotoxina y que han motivado los objetivos de este trabajo de Tesis Doctoral.

⁷⁰ Guan, X. W.; Xu, X. H.; Feng, S. L.; Tang, Z. B.; Chen, S. W.; Hui, L. Synthesis of hybrid 4-deoxypodophyllotoxin-5-fluorouracil compounds that inhibit cellular migration and induce cell cycle arrest. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, 26, 1561-1566.

ANTECEDENTES
Y
OBJETIVOS

Nuestro grupo de investigación lleva mucho tiempo trabajando en la quimiomodulación y quimioinducción de bioactividad en productos naturales, entre ellos, los ciclolignanos. Tomando como cabeza de serie la podofilotoxina, se han llevado a cabo numerosas modificaciones sobre su esqueleto carbonado. En la figura 14 se recogen algunas de las más representativas que han permitido sacar algunas conclusiones de relación estructura-actividad, llegando a mejorar en muchos casos la citotoxicidad y la selectividad del producto natural.

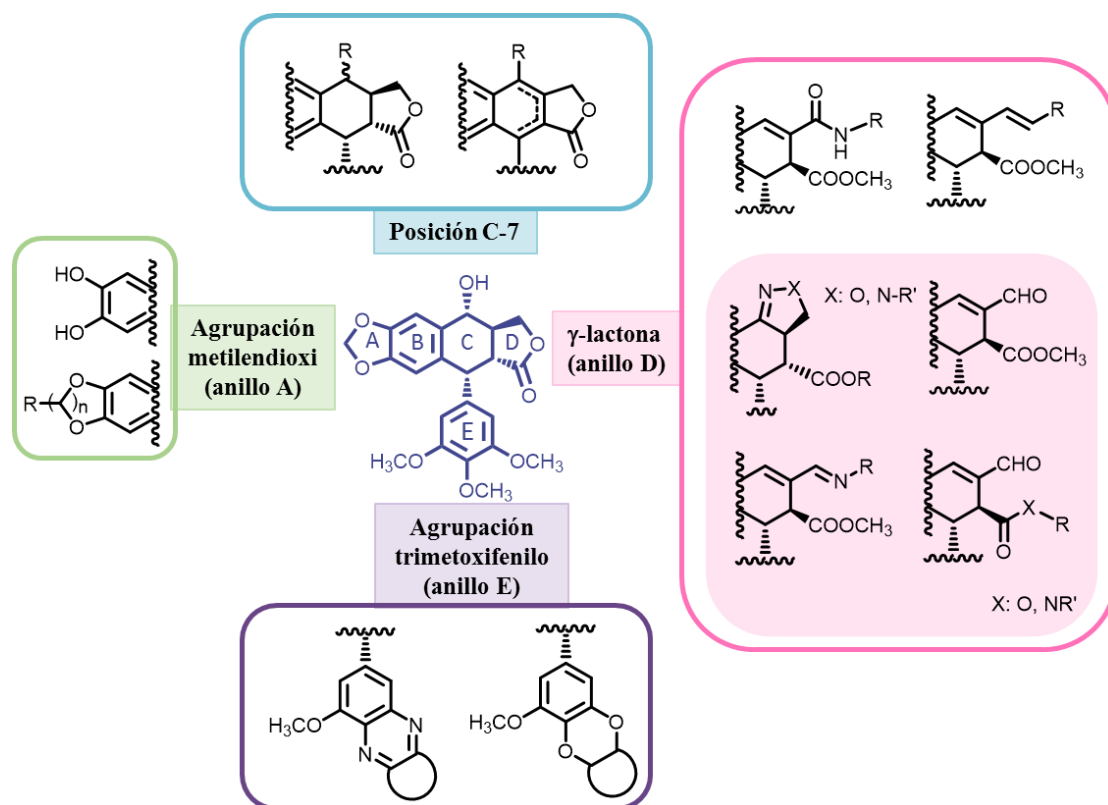


Figura 14: Modificaciones estructurales llevadas a cabo por nuestro grupo de investigación en el esqueleto de podofilotoxina.

- La **agrupación metilendioxi** (anillo A) parece importante para la actividad de inhibición de tubulina, ya que está presente en la gran mayoría de compuestos activos frente a esta diana. En nuestro grupo se han sintetizado varios derivados con modificaciones en este anillo, llegando a compuestos con una interesante actividad inmunosupresora tanto *in vitro* como *in vivo*.⁷¹

⁷¹ Gordaliza, M.; Castro, M.A.; Miguel del Corral, J.M.; López-Vázquez, M.; San Feliciano, A.; Faircloth, G. T. In vivo immunosuppressive activity of some cyclolignans. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 2781-2786.

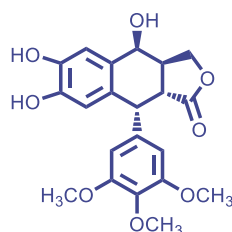


Figura 15: Derivado ciclolignánico con actividad inmunosupresora modificado en el anillo A

- La configuración y la sustitución en la **posición C-7** es fundamental para la actividad, ya que la sustitución del hidroxilo por otros grupos funcionales o la introducción de sustituyentes más voluminosos en disposición 7β disminuye la actividad antimitótica de los compuestos,⁷² favoreciendo la actividad inhibidora de la topoisomerasa II como se ha explicado anteriormente con etopósido y derivados.
- La **agrupación trimetoxifenilo** (anillo E), en disposición pseudoaxial en relación con el anillo C presente en el producto natural, es fundamental para la actividad antimitótica. Las modificaciones llevadas a cabo por nuestro grupo sobre este anillo mantuvieron la actividad citotóxica y algunos de ellos mostraron actividad antivírica.⁷³ La desmetilación en posición O-4' favorece la actividad inhibidora de la topoisomerasa II.
- La **γ -lactona** se había considerado esencial para la actividad de los ciclolignanos,⁷⁴ sin embargo, nuestro grupo de investigación ha llegado a la conclusión de que no es tan fundamental ni para la actividad ni para la selectividad citotóxica, como se deduce de los siguientes hechos:

⁷² Miguel del Corral, J M; Gordaliza, M.; Castro, M. A.; Morales, L. J.; Lopez, J. L.; San Feliciano, A. Methyl ethers of podophyllotoxin-related cyclolignans. *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 870-877.

⁷³ Castro, M. A.; Miguel del Corral, J. M; Gordaliza, M.; Grande, C.; Gómez-Zurita, A.; García-Grávalos, D.; San Feliciano, A. Synthesis and cytotoxicity of podophyllotoxin analogues modified in the A ring. *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, *38*, 65-74.

⁷⁴ Brewer, C. F.; Loike, J. D.; Horwitz, S. B.; Sternlicht, H.; Gensler, W. J. Conformational analysis of podophyllotoxin and its congeners. Structure-activity relationship in microtubule assembly. *Journal of Medicinal Chemistry.* **1979**, *22*, 215-221.

- ❖ La apertura de la γ -lactona y la formación de un heterociclo entre las posiciones C-7 y C-9 del ciclolignano dio lugar a compuestos poco citotóxicos, pero con interesante actividad inmunosupresora.⁷⁵

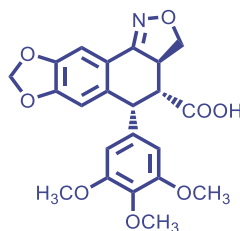


Figura 16: Derivado ciclolignánico con actividad inmunosupresora modificado en el anillo D.

- ❖ El diferente grado de oxidación de las posiciones C-9 y C-9' tras la apertura de la lactona^{76,77} influye significativamente en la actividad y selectividad citotóxica. En este sentido destaca el **aldehído podofílico**⁷⁸ que mostró un interesante índice de selectividad frente a líneas celulares de cáncer de mama y SNC, y que se ha convertido en el “cabeza de serie” de posteriores modificaciones.

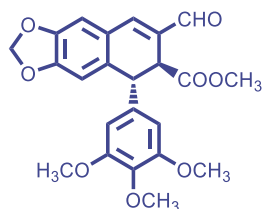


Figura 17: Aldehído podofílico.

⁷⁵ Gordaliza, M.; Faircloth, G. T.; Castro, M. A.; Miguel del Corral, J M; Lopez-Vazquez, M. L.; San Feliciano, A. Immunosuppressive cyclolignans. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 2865-2868.

⁷¹ Gordaliza, M.; Castro, M.A.; Miguel del Corral, J.M.; López-Vázquez, M.; San Feliciano, A.; Faircloth, G. T. In vivo immunosuppressive activity of some cyclolignans. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* **1997**, *7*, 2781-2786.

⁷⁶ Gordaliza, M.; Castro, M. A.; Miguel del Corral, José M; López-Vázquez, M. L.; A. García, P.; García-Grávalos, M. D.; San Feliciano, A. Synthesis and antineoplastic activity of cyclolignan aldehydes. *Eur. J. Med. Chem.* **2000**, *35*, 691-698.

⁷⁷ Castro, M. A.; Miguel del Corral, J M; Gordaliza, M.; Garcia, P. A.; Gomez-Zurita, M. A.; San Feliciano, A. Synthesis and cytotoxic evaluation of C-9 oxidized podophyllotoxin derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 1670-1678.

⁷⁸ Castro, M. A.; Miguel del Corral, J M; Gordaliza, M.; Garcia, P. A.; Gomez-Zurita, M. A.; Garcia-Grávalos, M. D.; de la Iglesia-Vicente, J.; Gajate, C.; An, F.; Mollinedo, F.; San Feliciano, A. Synthesis and biological evaluation of new selective cytotoxic cyclolignans derived from podophyllotoxin. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1214-1222.

Como se ha mencionado, a raíz del estudio de los diferentes derivados carentes de la agrupación γ -lactona se pudo deducir que ésta no es imprescindible para la citotoxicidad, siendo más importante el carácter electrofílico de la posición C-9 del ciclolignano. Con el fin de mejorar la selectividad y por tanto el índice terapéutico se sintetizaron diferentes derivados del aldehído podofílico. Un ejemplo de ello fue la preparación de derivados iminicos en la posición C-9 como el representado en la figura siguiente, con el que se consiguió mejorar el índice de selectividad respecto del cabeza de serie.^{79,78}

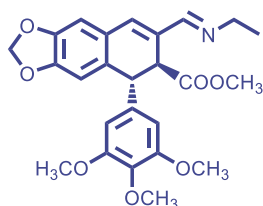


Figura 18: Derivado imínico del aldehído podofílico

A su vez, también se han introducido diferentes sustituyentes alquílicos y arílicos en la posición C-9', a través de funciones éster y amida, siendo más citotóxicos los que poseían la función éster.⁷⁹

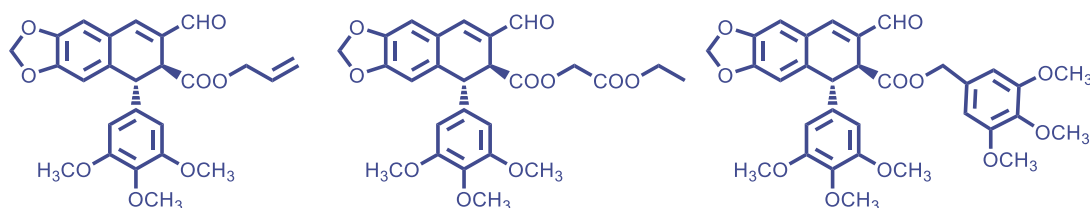


Figura 19: Ésteres en la posición C-9' derivados del aldehído podofílico

⁷⁹ Castro, M. A.; del Corral, J. M.; Garcia, P. A.; Rojo, M. V.; de la Iglesia-Vicente, J.; Mollinedo, F.; Cuevas, C.; San Feliciano, A. Synthesis and biological evaluation of new podophyllin aldehyde derivatives with cytotoxic and apoptosis-inducing activities. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 983-993.

⁷⁸ Castro, M. A.; Miguel del Corral, J. M.; Gordaliza, M.; Garcia, P. A.; Gomez-Zurita, M. A.; Garcia-Gravalos, M. D.; de la Iglesia-Vicente, J.; Gajate, C.; An, F.; Mollinedo, F.; San Feliciano, A. Synthesis and biological evaluation of new selective cytotoxic cyclolignans derived from podophyllotoxin. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 1214-1222.

La citotoxicidad mostrada por los compuestos con diferentes ésteres en la posición C-9' nos llevó a pensar que esta posición admitía sustituyentes más voluminosos de tal manera que se planteó la unión con otros compuestos de origen natural con actividad biológica.

De este modo, los últimos trabajos se han encaminado a la preparación y evaluación de híbridos del aldehído podofílico con otros compuestos como purinas que se han unido a la posición C-9' del ciclolignano mediante espaciadores alifáticos y aromáticos, y que han mantenido la agrupación aldehído α,β -insaturado, siendo por tanto análogos del aldehído podofílico. De esta manera, surgió una nueva familia de compuestos híbridos a la que se ha denominado “lignopurinas”,⁸⁰ que mantienen la citotoxicidad y la selectividad del cabeza de serie frente a varias líneas celulares tumorales. En el presente trabajo de Tesis Doctoral se plantea la obtención de nuevos híbridos del aldehído podofílico por combinación con otros sistemas con actividad citotóxica como son las quinonas.

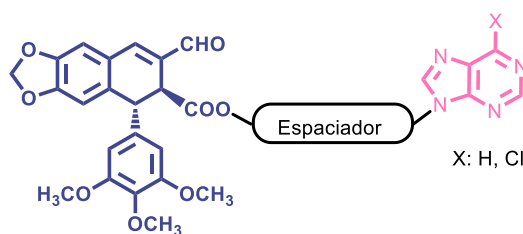


Figura 20: Estructura general de lignopurinas.

Desde hace varios años nuestro grupo también tiene abierta una línea de investigación en quinonas, agrupación muy extendida en la naturaleza y que es capaz de interactuar con diversas dianas biológicas gracias a su capacidad para formar enlaces covalentes o para transportar electrones en las reacciones de oxidoreducción.⁸¹ Aprovechando nuestra experiencia en el aislamiento y caracterización de terpenoides inactivos se han preparado diversas terpenilnaftoquinonas y terpenilnaftohidroquinonas

⁷⁹Castro, M. A.; Miguel del Corral, J. M.; García, P. A.; Rojo, M. V.; de la Iglesia-Vicente, J.; Mollinedo, F.; Cuevas, C.; San Feliciano, A. Synthesis and biological evaluation of new podophyllin aldehyde derivatives with cytotoxic and apoptosis-inducing activities. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 983-993.

⁸⁰ Castro, M. A.; Miguel Del Corral, J. M.; García, P. A.; Rojo, M. V.; Bento, A. C.; Mollinedo, F.; Francesch, A. M.; San Feliciano, A. Lignopurines: A new family of hybrids between cyclolignans and purines. Synthesis and biological evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *58*, 377-389.

⁸¹ Kumagai, Y.; Shinkai, Y.; Miura, T.; Cho, A. K. The chemical biology of naphthoquinones and its environmental implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2012**, *52*, 221-247.

citotóxicas, un ejemplo que ilustra la quimioinducción de bioactividad en compuestos inactivos. Estas quinonas/hidroquinonas se han obtenido por cicloadición de Diels-Alder entre terpenoides que contienen un dieno conjugado en su estructura, y que se encuentran en cantidad abundante en diferentes fuentes de nuestro entorno, y diversas 1,4-benzoquinonas como dienófilos. Además, se han obtenido numerosos derivados mediante modificaciones tanto del resto terpénico como del quinónico que han dado lugar a dos familias de compuestos en función del resto terpénico utilizado en su obtención:

- Diterpenilquinonas obtenidas a partir de diterpenoides naturales como el ácido mirceocomúnico abundante en las arcéstidas de varias especies de Cupressaceae.^{82,83,84}

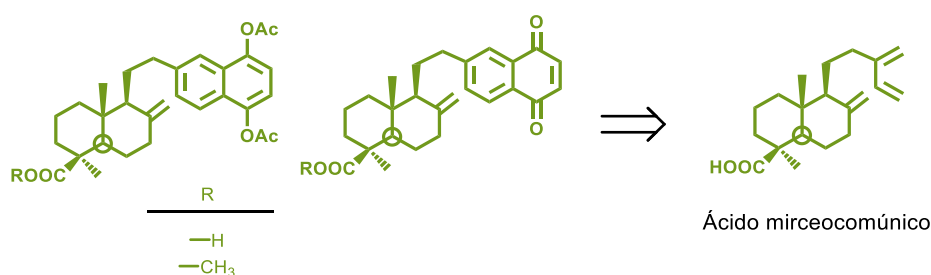


Figura 21: Diterpenilquinonas/hidroquinonas obtenidas por el grupo.

- Monoterpenilquinonas: Obtenidas a partir del monoterpeno β -mirceno, disponible comercialmente.^{85,86,87,88,89}

⁸² Miguel Del Corral, J M; Gordaliza, M.; Castro, M. A.; Mahiques, M. M.; Chamorro, P.; Molinari, A.; Garcia-Gravalos, M. D.; Broughton, H. B.; San Feliciano, A. New selective cytotoxic diterpenylquinones and diterpenylhydroquinones. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1257-1267.

⁸³ Miguel Del Corral, J M; Castro, M. A.; Rodríguez, M.L.; Chamorro, P.; Cuevas, C.; San Feliciano, A. New cytotoxic diterpenyl-naphthohydroquinone derivatives obtained from a natural diterpenoid. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 5760-5774.

⁸⁴ Castro, M. A.; Miguel del Corral, J. M.; Rodríguez, M. L.; Feliciano, A. S. An easy route to pentacyclic terpenylquinones. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 519-521.

⁸⁵ Miguel del Corral, J. M.; Gordaliza, M.; Castro, M. A.; Mahiques, M. M.; San Feliciano, A.; Garcia-Gravalos, M. D. Further antineoplastic terpenylquinones and terpenylhydroquinones. *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 31-41.

⁸⁶ Miguel del Corral, J. M.; Castro, M. A.; Gordaliza, M.; Martin, M. L.; Gualberto, S. A.; Gamito, A. M.; Cuevas, C.; San Feliciano, A. Synthesis and cytotoxicity of new aminoterpenylquinones. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 631-644.

⁸⁷ Miguel del Corral, J. M.; Castro, M. A.; Oliveira, A. B.; Gualberto, S. A.; Cuevas, C.; San Feliciano, A. New cytotoxic furoquinones obtained from terpenyl-1,4-naphthoquinones and 1,4-anthracenediones. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 7231-7240.

⁸⁸ Miguel del Corral, J. M.; Castro, M. A.; Gordaliza, M.; Martin, M. L.; Gamito, A. M.; Cuevas, C.; Feliciano, A. S. Synthesis and cytotoxicity of new heterocyclic terpenyl-naphthoquinones. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 2816-2827.

⁸⁹ Castro, M. A.; Gamito, A. M.; Tangarife-Castaño, V.; Zapata, B.; Miguel del Corral, J. M.; Mesa-Arango, A. C.; Betancur-Galvis, L.; San Feliciano, A. Synthesis and antifungal activity of terpenyl-1,4-naphthoquinone and 1,4-anthracenedione derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *67*, 19-27.

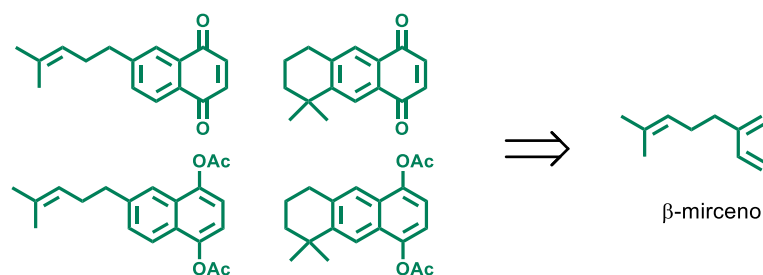


Figura 22: Monoterpenilquinonas/hidroquinonas obtenidas por el grupo.

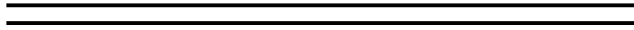
Todas estas terpenilnaftoquinonas, tanto en su forma quinónica como en la forma de hidroquinona acetilada, mostraron propiedades citotóxicas muy interesantes a nivel de μM o inferior, siendo los derivados diacetilados más estables químicamente y previsiblemente metabolizables *in vivo* a la forma hidroquinónica/quinónica.

Los buenos resultados de actividad obtenidos con estas terpenilnaftoquinonas también ponen de manifiesto la utilidad de la hibridación, no solo para la quimiomodulación de compuestos naturales bioactivos, sino también en la quimioinducción de bioactividad en compuestos naturales inactivos como los terpenoides de partida utilizados para la obtención de las terpenilquinonas mencionadas.

Como ha quedado reflejado en la introducción y en estos antecedentes, nuestro grupo ha trabajado extensamente con compuestos de origen natural. Tomando estos compuestos como punto de partida y empleando la hibridación como estrategia de síntesis, se han planteado los objetivos de esta Tesis Doctoral que se recogen en el siguiente apartado.



OBJETIVOS



Tanto ciclolignanos como quinonas han sido objetivo de hibridación con otros compuestos naturales y sintéticos, pero no se han encontrado descritos análogos que combinen ambas estructuras en una sola.

Este hecho y los buenos resultados de bioactividad obtenidos en trabajos precedentes con ciclolignanos y terpenilquinonas, nos han llevado a plantear como objetivo general de esta Tesis Doctoral la obtención de nuevos híbridos del aldehído podofílico por conjugación con otros derivados de productos naturales con contrastada actividad citotóxica, como son las terpenilquinonas y los propios ciclolignanos derivados de podofilotoxina, todo ello, con el fin de mejorar las propiedades biológicas de los precursores por separado.

Este objetivo general se puede concretar en los objetivos específicos siguientes:

1. Preparación de lignohidroquinonas, nueva familia de híbridos del aldehído podofílico y terpenilhidroquinonas, derivadas de diterpenoides y monoterpenoides, unidas a través de diferentes espaciadores a la posición C-9' del ciclolignano.
2. Preparación de 7 β ,9-bisciclolignanos, nuevos híbridos del aldehído podofílico con derivados de 4'-O-desmetilepipodofilotoxina unidos por diferentes espaciadores a la posición C-9 del aldehído podofílico.
3. Evaluación citotóxica y estudio del mecanismo de acción de los compuestos sintetizados frente a líneas celulares cancerosas.

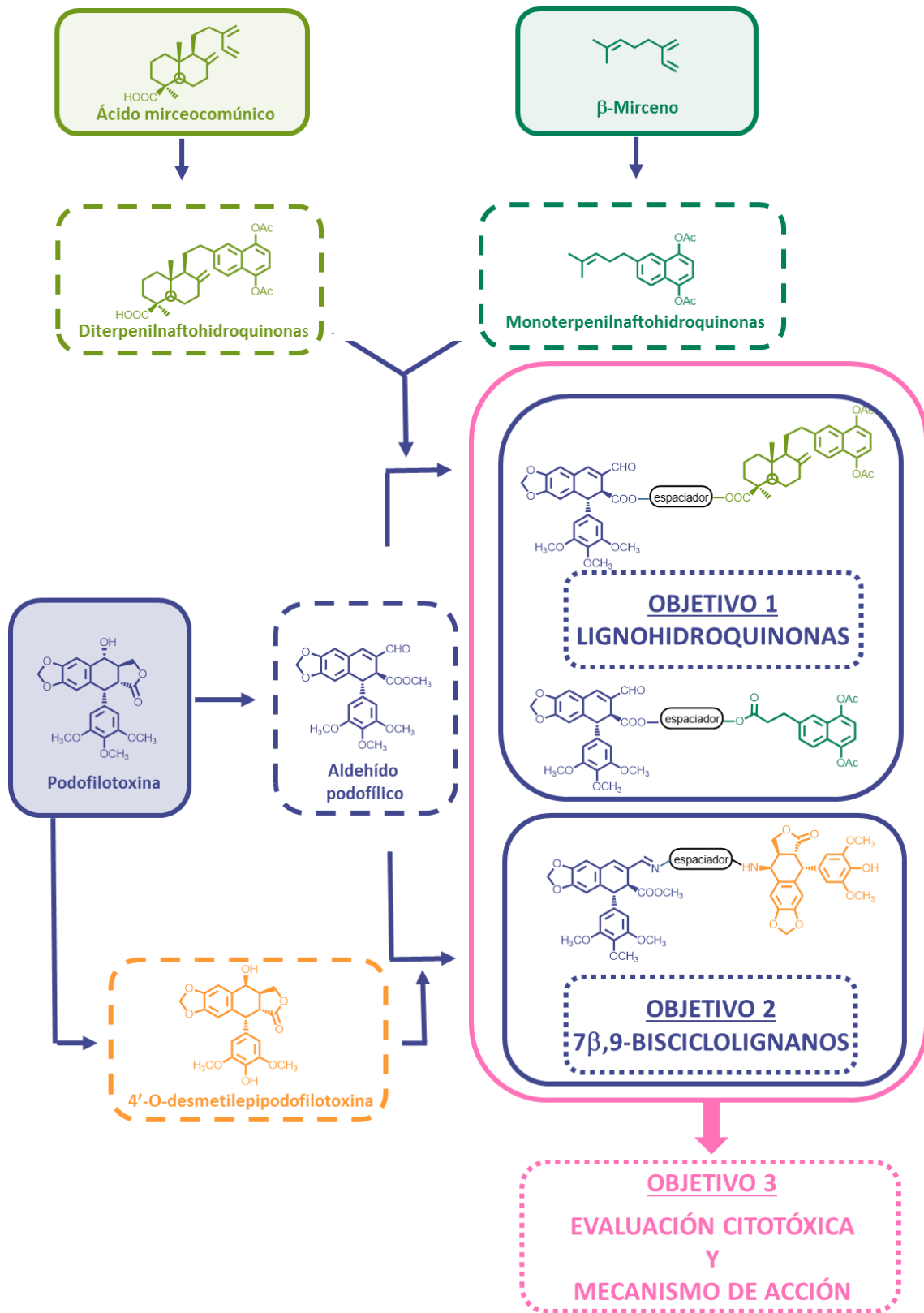


Figura 23: Representación esquemática de los objetivos



**RESULTADOS
Y
DISCUSIÓN**



Como ya se ha comentado anteriormente, la formación de híbridos es una estrategia muy utilizada en la búsqueda de nuevos fármacos. En este trabajo de Tesis Doctoral se ha planteado como objetivo la síntesis de compuestos híbridos empleando como cabeza de serie el aldehído podofílico, ciclolignano citotóxico selectivo que se puede obtener a partir del ciclolignano natural podofilotoxina. Las dos familias de híbridos del aldehído podofílico objetivo de este trabajo, lignohidroquinonas y bisciclolignanos, se formarán por hibridación del aldehído podofílico, bien con terpenilhidroquinonas o bien con otros ciclolignanos derivados de podofilotoxina.

En el caso de las lignohidroquinonas, se diferencian dos clases de híbridos en función del terpenoide utilizado en su preparación: híbridos de diterpenilhidroquinonas e híbridos de monoterpenilhidroquinonas. En ambas clases, las terpenilhidroquinonas correspondientes se unirán al aldehído podofílico a través de espaciadores alifáticos y aromáticos mediante enlaces tipo éster.

Para preparar lignohidroquinonas es necesario disponer de precursores, tanto lignánicos como terpenilhidroquinónicos con funciones ácido carboxílico por separado. Hay que tener en cuenta que los compuestos finales mantienen la función aldehído α,β -insaturado que, en principio, podría estar presente antes de la formación del correspondiente híbrido, sin embargo, la experiencia previa en la síntesis de lignopurinas⁸⁰ análogas, aconseja que dicha función se genere en el último paso de la síntesis para evitar reacciones secundarias de aromatización en el ciclolignano que conduce a una disminución de la actividad citotóxica.

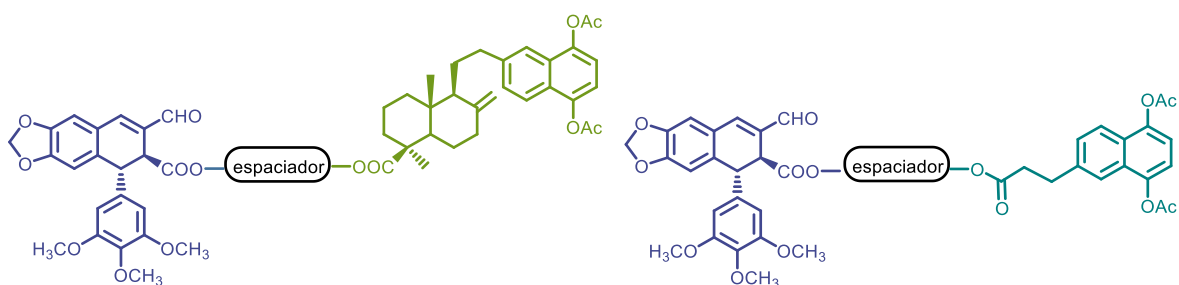


Figura 24: Estructura general de lignohidroquinonas.

⁸⁰ Castro, M. A.; Miguel Del Corral, J. M.; Garcia, P. A.; Rojo, M. V.; Bento, A. C.; Mollinedo, F.; Francesch, A. M.; San Feliciano, A. Lignopurines: A new family of hybrids between cyclolignans and purines. Synthesis and biological evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *58*, 377-389.

En el caso de los bisciclolignanos, la unión de los precursores se plantea a través de la función aldehído en C-9 del aldehído podofílico y la posición C-7 de 4'-desmetilepipodofilotoxina a partir de espaciadores diaminaados mediante enlaces imino-amino. Trabajos anteriores del grupo⁷⁹ pusieron de manifiesto que los derivados iminicos del aldehído podofílico mejoraban significativamente la selectividad frente a determinadas líneas celulares tumorales, manteniendo la inhibición de la polimerización de la tubulina. La hibridación con derivados de 4'-desmetilepipodofilotoxina, que generalmente actúan como inhibidores de la topoisomerasa II del DNA,⁴⁰ permite esperar compuestos con actividad citotóxica potenciada al combinarse en la misma molécula dos unidades ciclolignánicas de mecanismo de acción diferente. En este caso el propio aldehído podofílico es el precursor necesario para la formación del enlace imino.

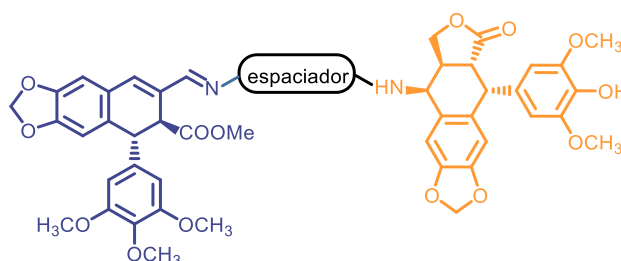


Figura 25: Estructura general de bisciclolignanos

De acuerdo con este planteamiento, en este apartado de Resultados y Discusión se presentará en primer lugar la obtención de los precursores ciclolignánicos comunes a las dos familias de híbridos y los precursores diterpenil- y monoterpenilhidroquinónicos necesarios para preparar las lignohidroquinonas, mientras que los derivados de 4'-desmetilepipodofilotoxina se discutirán en los apartados correspondientes a la formación de los bisciclolignanos.

⁷⁹ Castro, M. A.; Miguel del Corral, J. M.; García, P. A.; Rojo, M. V.; de la Iglesia-Vicente, J.; Mollinedo, F.; Cuevas, C.; San Feliciano, A. Synthesis and biological evaluation of new podophyllaldehyde derivatives with cytotoxic and apoptosis-inducing activities. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 983-993.

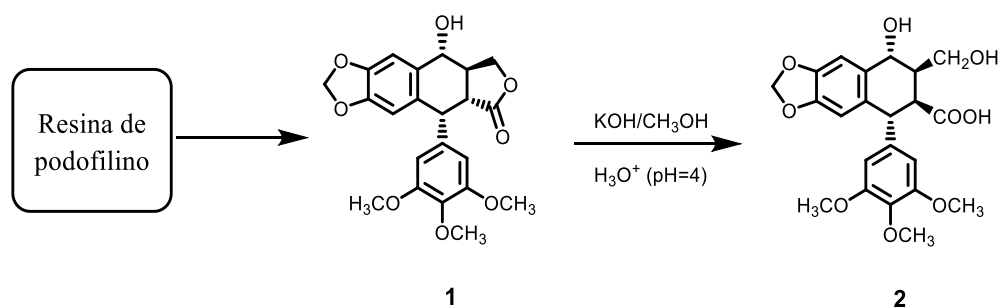
⁴⁰ Montecucco, A.; Zanetta, F.; Biamonti, G. Molecular mechanisms of etoposide. *EXCLI J.* **2015**, *14*, 95-108.

1. Obtención de precursores ciclolignánicos.

El primer paso para la formación de los compuestos híbridos que son objetivo de esta Tesis Doctoral es la obtención de los fragmentos ciclolignánicos que van a formar parte de las estructuras finales. Como ya se ha explicado, los compuestos finales serán análogos del aldehído podofílico, presentando en su estructura la agrupación aldehído α,β -insaturado que es importante para la actividad citotóxica selectiva y que se puede obtener por transformación del producto natural podofilotoxina.

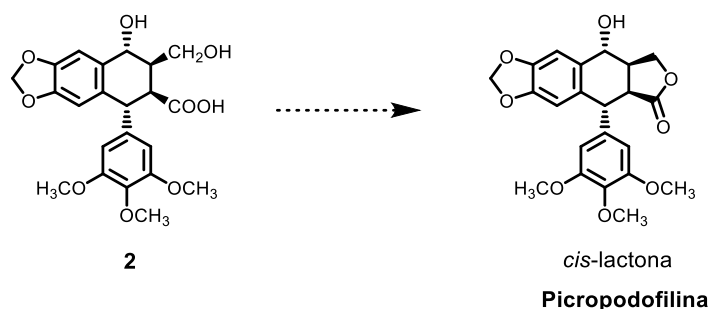
1.1. Obtención del acetónido ciclolignánico 3

Como se ha comentado anteriormente, la experiencia previa en la obtención de lignopurinas⁸⁰ nos lleva a dejar la formación del aldehído α,β -insaturado presente en las lignohidroquinonas finales para el último paso, evitando reacciones no deseadas de aromatización del anillo central del ciclolignano. Por este motivo, en este trabajo, lo primero que se plantea es la apertura del anillo de γ -lactona de podofilotoxina para disponer de la función ácido carboxílico en C-9' libre que posibilita la unión con el espaciador, unido o no al fragmento hidroquinónico, para en último término llevar a cabo la transformación del fragmento ciclolignánico. Así, siguiendo la metodología puesta a punto por nuestro grupo de investigación se aisló podofilotoxina, **1**, (40 %) a partir de la resina comercial de podofilino (*Podophyllum emodi* Wall., Berberidaceae). El siguiente paso fue la apertura de la γ -lactona por tratamiento con hidróxido potásico y posterior acidulación hasta pH=4, obteniendo el ácido picropodofílico, **2** (94 %), que como puede observarse ha producido la epimerización en C-8'.

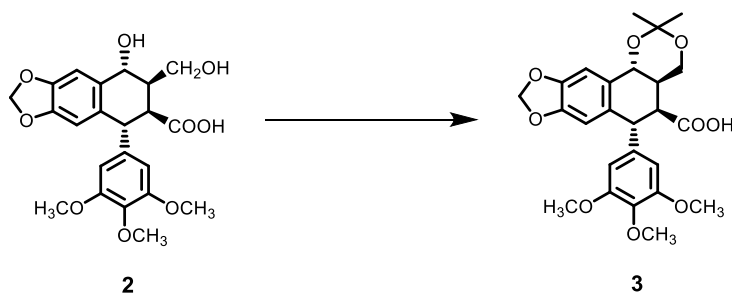


⁸⁰ Castro, M. A.; Miguel Del Corral, J. M.; Garcia, P. A.; Rojo, M. V.; Bento, A. C.; Mollinedo, F.; Francesch, A. M.; San Feliciano, A. Lignopurines: A new family of hybrids between cyclolignans and purines. Synthesis and biological evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *58*, 377-389.

En los trabajos anteriores⁸⁰ se ha comprobado que el dihidroxiácido **2** presenta una alta reactividad y fácilmente evoluciona hacia la formación de picropodofilina, con una *cis*-lactona mucho más estable que la *trans*-lactona y cuya apertura no es tan simple como la de la propia podofilotoxina, **1**.



Por ello, para evitar la relactonización durante la esterificación posterior con el espaciador, se decidió proteger el correspondiente 1,3-diol en forma de acetónido. Para preparar el acetónido **3** desde el dihidroxiácido **2**, se probaron diferentes condiciones de reacción que se resumen en la tabla 1.



Cuando se trató el dihidroxiácido **2** con 2,2-dimetoxipropano (2,2-DMP) en presencia de ácido *p*-toluensulfónico (TsOH)⁹⁰ o FeCl₃⁹¹ se obtuvieron mezclas complejas de reacción donde sólo fue posible identificar 7-*O*-metilpicropodofilina. Sin embargo, cuando se trató el dihidroxiácido **2** con 2,2-DMP y *p*-toluensulfonato de piridinio (PTS)⁹²

⁸⁰ Castro, M. A.; Miguel Del Corral, J. M.; Garcia, P. A.; Rojo, M. V.; Bento, A. C.; Mollinedo, F.; Francesch, A. M.; San Feliciano, A. Lignopurines: A new family of hybrids between cyclolignans and purines. Synthesis and biological evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *58*, 377-389.

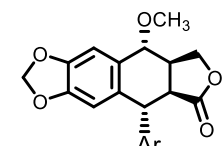
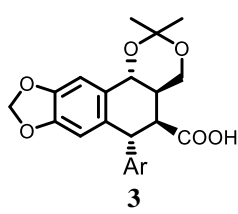
⁹⁰Rojo Manteca, M.V. Nuveos derivados del aldehído podofilico, ciclolignano citotóxico selectivo. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca. **2010**.

⁹¹ Karamé, I.; Alamé, M.; Kanj, A.; Baydoun, G. N.; Hazimeh, H.; el Masri, M.; Christ, L. Mild and efficient protection of diol and carbonyls as cyclic acetals catalysed by iron (III) chloride. *Comptes Rendus Chimie* **2011**, *14*, 525-529.

⁹² Prokhorevich, K. N.; Bekish, A. V. Preparation of Isopropylidene Acetals from Butane-1,2,4-Triol and its Cyclopropane Congeners *Tetrahedron Letters* **2010**, *51*, 4073-4075.

se obtuvo el acetónido **3** deseado con buen rendimiento (88 %). La formación del acetónido se puso de manifiesto por la presencia de dos señales singlete en el espectro de RMN de ^1H a 1,54 y 1,43 ppm asignables a un *gem*-dimetilo unido a oxígeno, así como al desapantallamiento de la señal asignable al protón geminal a una función oxigenada en C-7 desde 4,85 ppm hasta 4,92 ppm.

Tabla 1: condiciones de obtención del acetónido **3**

Reactivos	Disolventes	Producto
2,2-DMP, TsOH	2,2-DMP	
2,2-DMP, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Acetona	7-O-metilpicropodofilina
2,2-DMP, PTS	Acetona	

Ar: 3,4,5-trimetoxifenilo

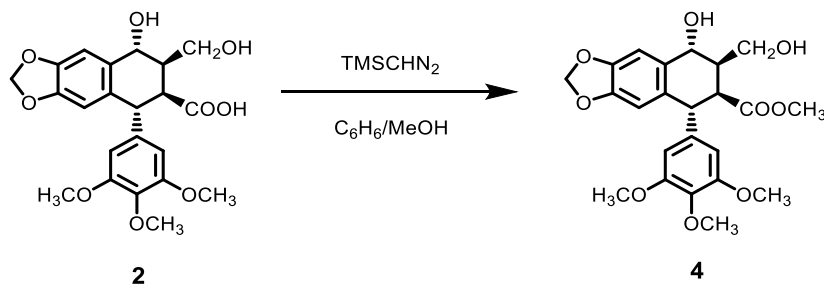
De esta forma se abre una vía de obtención del acetónido **3** sencilla para su uso como precursor ciclolignánico para la obtención de todas las lignohidroquinonas sintetizadas en este trabajo.

1.2. Obtención del aldehído podofílico

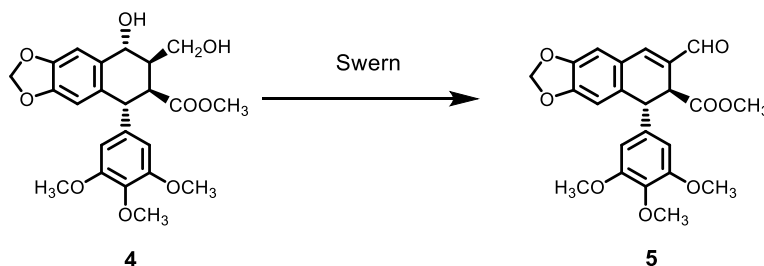
En el caso de los $7\beta,9$ -bisciclolignanos planteados como último objetivo sintético de este trabajo, es necesaria la obtención del propio aldehído podofílico que se condensará en último término con el otro fragmento ciclolignánico. En el caso de esta nueva familia de híbridos, el aldehído podofílico se va a unir por la posición C-9 y no por la posición C-9', aprovechando la experiencia previa, en la formación de enlaces de tipo imina.

Así, para obtener el aldehído podofílico, **5**, el primer paso es la obtención del éster metílico en la posición C-9' a partir del ácido picropodofílico, **2**, obtenido en el apartado anterior por apertura de la γ -lactona de podofilotoxina, **1**, para posteriormente realizar una

oxidación en condiciones de Swern.⁹³ Para la esterificación del dihidróxiácido **2**, éste se disolvió en una mezcla de benceno/MeOH (1/1) y se añadió una disolución de trimetilsilildiazometano (TMSCHN₂)⁹⁴ en exceso de este agente alquilante, obteniendo el dihidroxiéster **4** (80 %) junto con pequeñas cantidades de picropodofilina obtenida por relactonización del ácido picropodofílico, **2**.



La reacción de oxidación de Swern dio lugar a la transformación del alcohol primario hasta aldehído y a la eliminación del alcohol bencílico de la posición C-7, obteniéndose así el aldehído α,β -insaturado **5** (90 %) que se identifica en su espectro de RMN de ¹H por la presencia de una señal singlete a 9,57 ppm y una señal singlete a 7,34 ppm asignables a la agrupación aldehído α,β -insaturado.

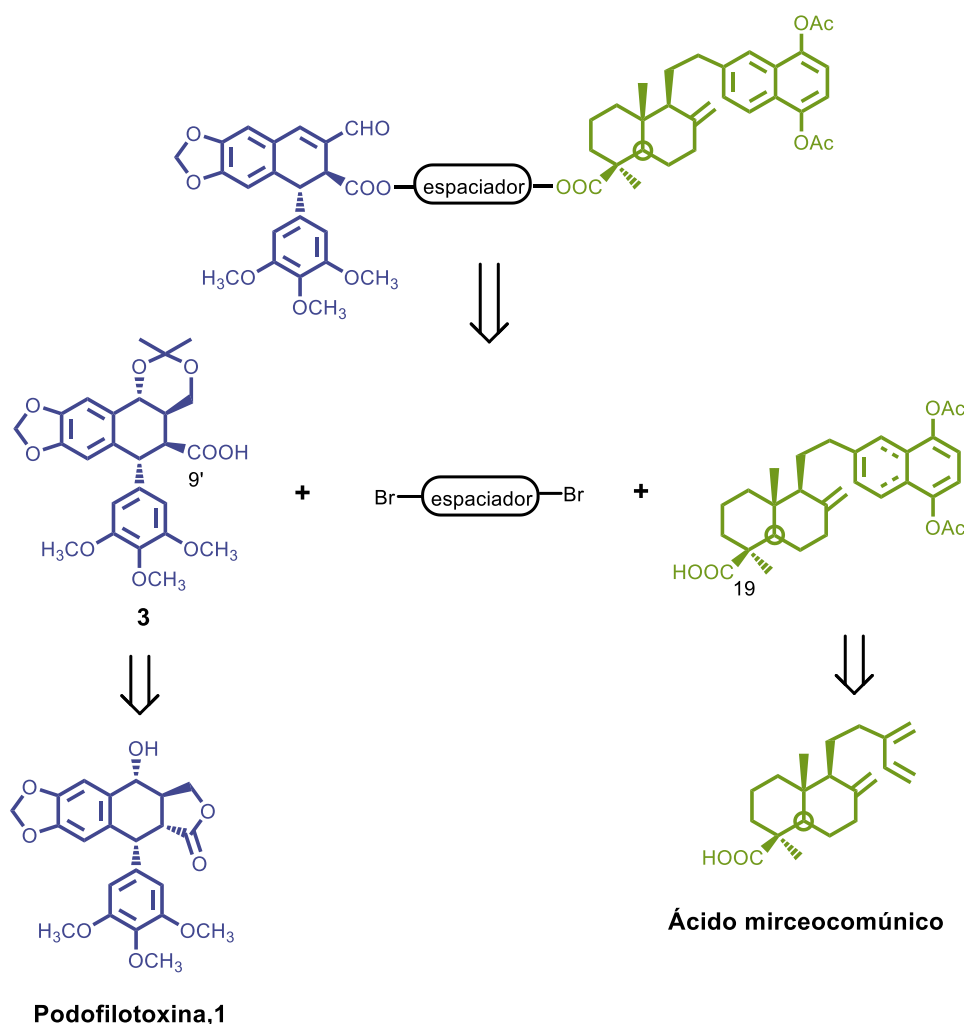


⁹³ López Vázquez; M.L. Nuevos derivados ciclolignánicos con actividad anticancerosa e inmunosupresiva. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca. **1996**

⁹⁴ Hashimoto, N.; Aoyawa, T.; Shioiri, T. New methods and reagents in organic synthesis. 14. A simple efficient preparation of methyl esters with trimethylsilyldiazomethane (TMSCHN₂) and its application to gas chromatographic analysis of fatty acids. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **1981**, 29, 1475-1478.

2. Lignohidroquinonas a partir de derivados diterpénicos.

El primer grupo de compuestos de la nueva familia de lignohidroquinonas se ha preparado por la hibridación del aldehído podofílico diterpenilnaftohidroquinonas, utilizando espaciadores alifáticos y aromáticos α,ω -dibromados. La estructura general de los híbridos, así como los precursores y los compuestos naturales de los que se obtienen, se representan en el esquema siguiente.



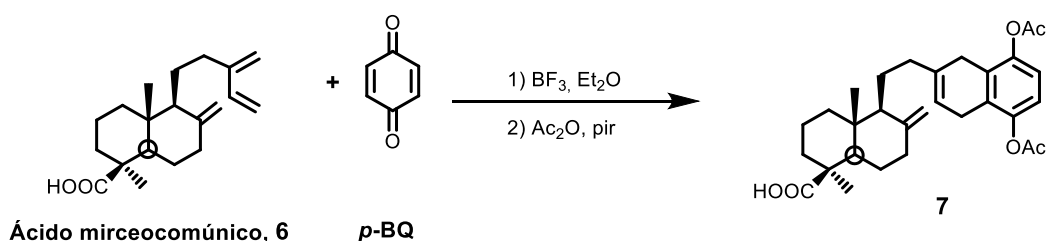
Los derivados diterpenilnaftohidroquinónicos empleados en la síntesis de esta familia de compuestos provienen de la quimioinducción de la bioactividad en el ácido mirceocomúnico, diterpenoide natural que ya contiene en su estructura una función ácido carboxílico adecuado para unir los espaciadores mediante un enlace de tipo éster.

Por otro lado, como ya se ha explicado en el apartado de obtención de precursores ciclolignánicos, podofilotoxina (1) es el producto natural que da lugar al acetónido 3

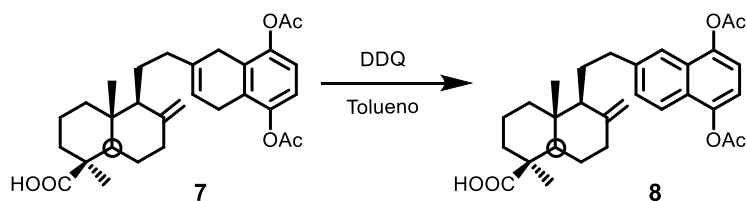
como intermedio que presenta en su posición C-9' un ácido carboxílico a través del cual se puede unir el espaciador de forma análoga. La formación de la agrupación aldehído α,β -insaturado en el último paso conduciría a las lignohidroquinonas derivadas del aldehído podofílico y diterpenoides.

2.1. Obtención de precursores diterpenilhidroquinónicos

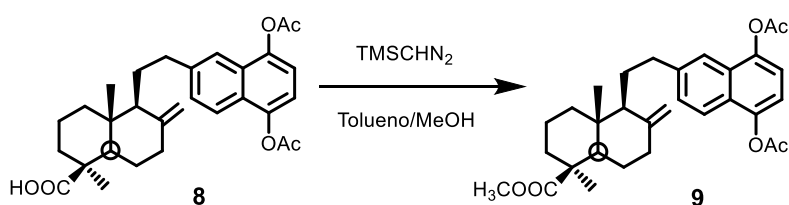
Para obtener los precursores diterpenilhidroquinónicos, el primer paso es el aislamiento del diterpenoide ácido mirceocomúnico a partir de su fuente natural. Así, a partir de la fracción ácida del extracto descerado de hexano de las arcéstidas de *Juniperus oxycedrus* L. (Cupressaceae), se aisló el ácido mirceocomúnico, **6**, (2,1 % del peso de las arcéstidas) que presenta un dieno conjugado en su estructura y que sirve de punto de partida para la síntesis de la diterpenilnaftohidroquinona **8**. La reacción de cicloadición de Diels-Alder entre el ácido mirceocomúnico y *p*-benzoquinona en presencia de un ácido de Lewis ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$), dando lugar a un cicloaducto que se acetiló rápidamente para evitar su oxidación, obteniéndose la diterpenilhidroquinona diacetilada **7** (82 %) que presenta en su espectro de RMN de ^1H dos señales correspondientes a los nuevos grupos acetilos (2,42 y 2,44 ppm) así como la ausencia de las señales características del dieno conjugado presente en el ácido mirceocomúnico de partida.



Su posterior oxidación con 5,6-diciano-2,3-dicloro-1,4-benzoquinona (DDQ), condujo a la correspondiente diterpenilnaftohidroquinona acetilada **8** (50 %) en cuyo espectro de RMN de ^1H se observa la presencia de las señales asignables a los protones aromáticos del resto naftohidroquinónico (7,37-7,48 ppm).



Una vez obtenido el compuesto **8**, se llevó a cabo la esterificación con TMSCHN₂ obteniendo la diterpenilnaftohidroquinona **9**, que servirá como modelo del fragmento diterpenilnaftohidroquinónico para los ensayos de actividad que se han planteado para este tipo de compuestos.

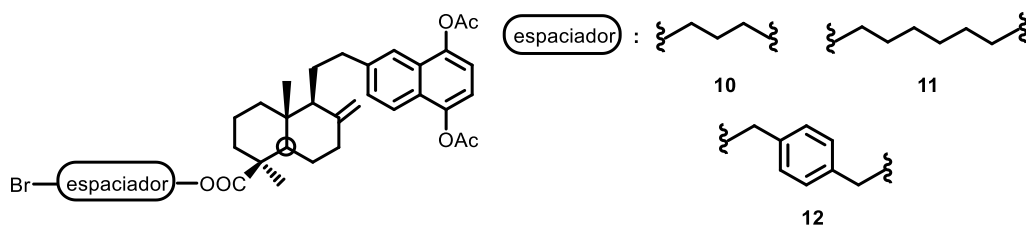


2.2. Obtención de las lignohidroquinonas 22-24

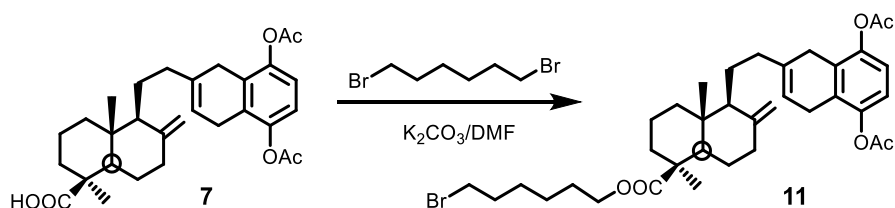
Para llevar a cabo la síntesis de las lignohidroquinonas es necesario unir los espaciadores a los fragmentos del híbrido. La experiencia previa en la síntesis de híbridos derivados de ciclolignanos ha motivado la unión de los espaciadores alifáticos y aromáticos en primer lugar al precursor diterpenilnaftohidroquinónico y, posteriormente, la unión del fragmento ciclolignánico.

2.2.1. Unión de los espaciadores a las diterpenilnaftohidroquinonas

Una vez sintetizada la diterpenilnaftohidroquinona **8** se procedió a su unión con los espaciadores alifáticos y aromáticos, obteniéndose las correspondientes diterpenilhidroquinonas alquiladas **10-12**.

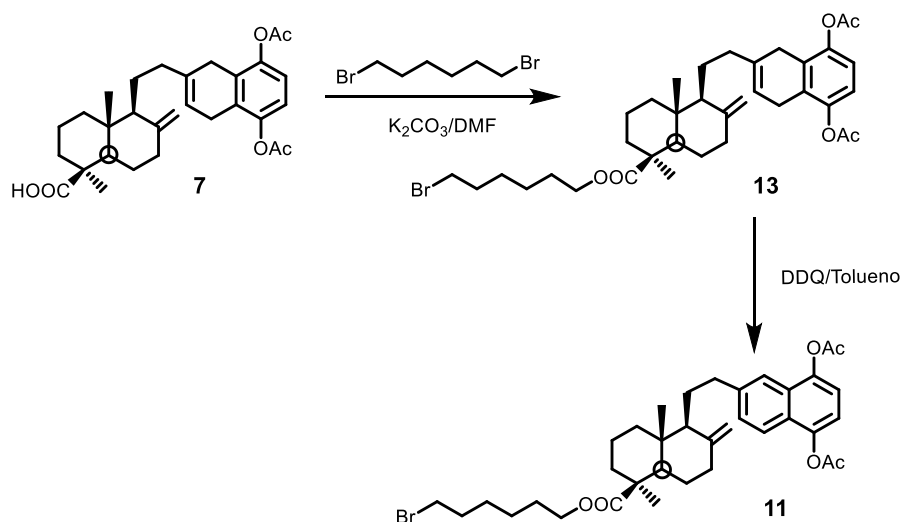


En primer lugar, se hizo reaccionar el compuesto **8** con 1,6-dibromohexano en DMF y en presencia de K_2CO_3 , obteniendo el éster **11** (21 % respecto del ácido mirceocomúnico de partida) como se puso de manifiesto en su espectro de RMN de 1H por la presencia de la señal triplete a 3,97 ppm, asignable a un metileno unido a carbono oxigenado, así como la presencia de un triplete a 3,28 ppm asignable a metileno unido a bromo.

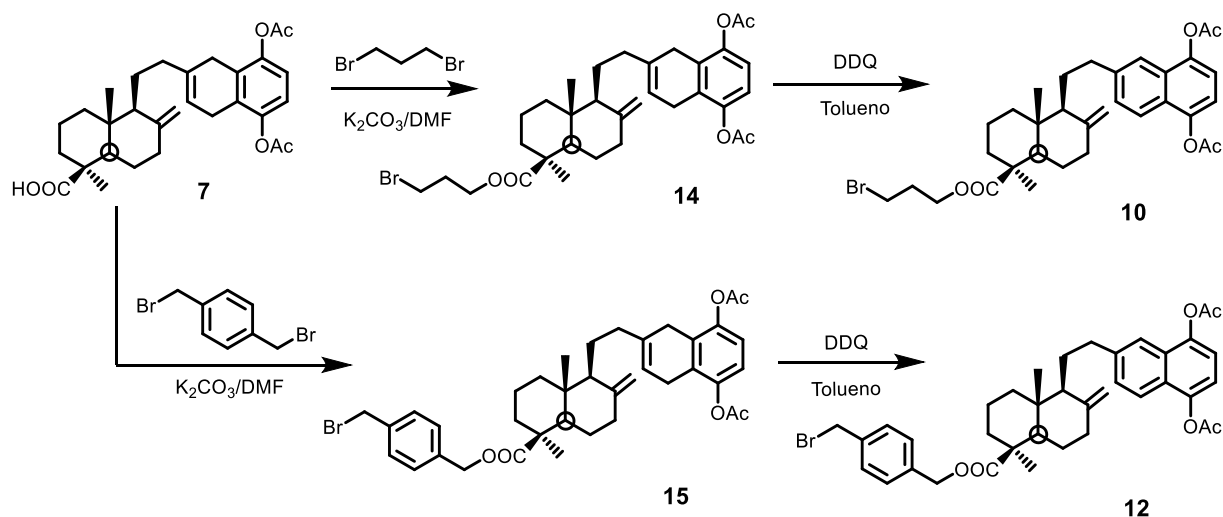


Con el fin de mejorar el rendimiento de la obtención del compuesto **11** se planteó una ruta sintética alternativa. Al llevar a cabo la reacción de obtención de la diterpenilnaftohidroquinona **8** se observó que el rendimiento disminuía durante la aromatización con DDQ debido a posibles interferencias entre el ácido carboxílico y el tratamiento posterior de la reacción. Por ello, se decidió incorporar primeramente el espaciador a **7** y realizar en último término el tratamiento con DDQ, evitando así la presencia de un ácido carboxílico libre en la molécula en el momento de realizar la aromatización.

Cuando se llevó a cabo la reacción de esterificación de **7** con 1,6-dibromohexano y la posterior aromatización del resto de naftaleno, se obtuvo **11** con mejor rendimiento (55 % desde **6**)

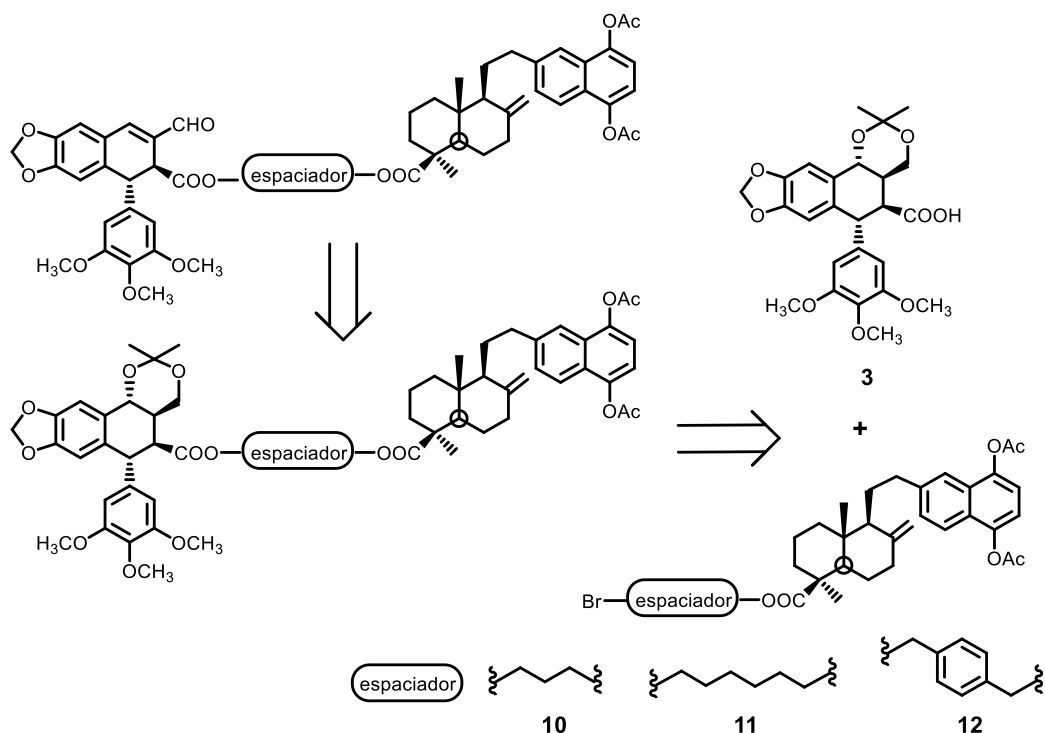


Seguindo esta última ruta sintética, utilizando como reactivos 1,3-dibromopropano y α,α' -dibromo-*p*-xileno se sintetizaron respectivamente las diterpenilnaftohidroquinonas **10** y **12** (61 % y 43 % desde **6**, respectivamente).

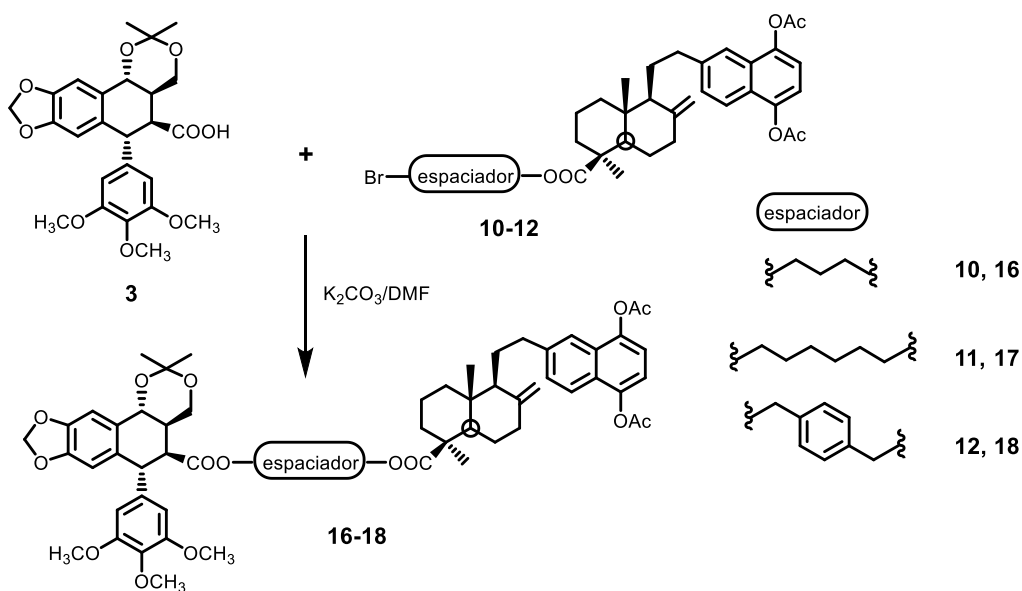


2.2.2. Obtención de los aldehídos híbridos

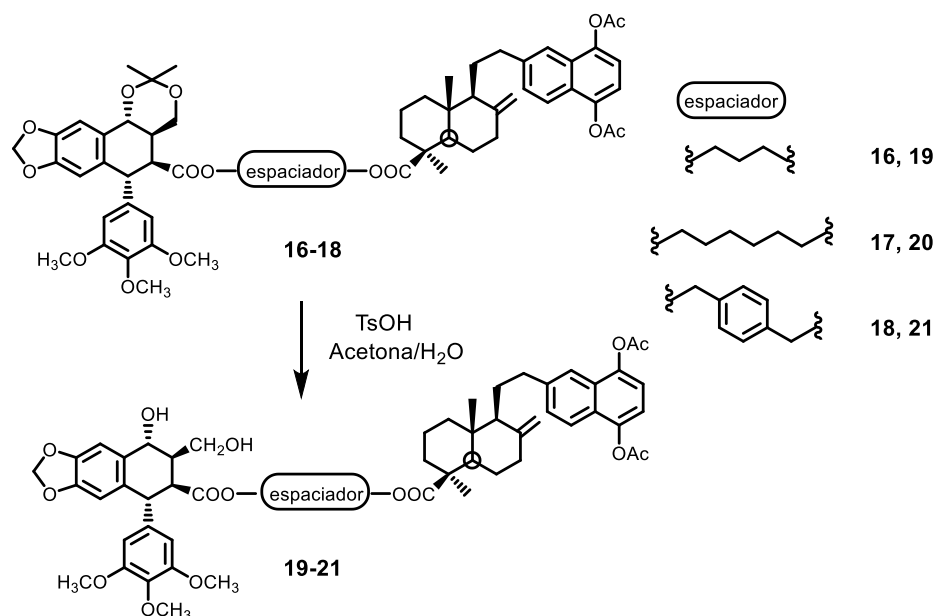
Los últimos pasos de la ruta sintética para la obtención de las lignohidroquinonas derivadas del aldehído podofílico y diterpenoides son la esterificación del precursor ciclolignánico **3** con las diterpenilnaftohidroquinonas **10-12** y la posterior transformación del híbrido obtenido en el correspondiente aldehído α,β -insaturado, según se muestra en el siguiente esquema retrosintético:



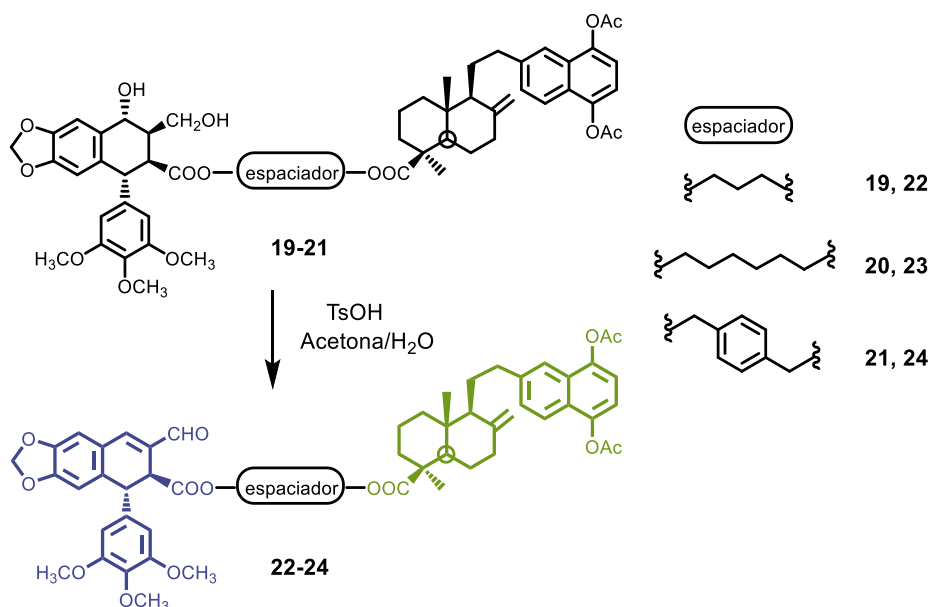
Para obtener las lignohidroquinonas planteadas como objetivo, en primer lugar se hizo reaccionar el ácido ciclolignánico **3** con K_2CO_3 y, posteriormente, con las diferentes diterpenilnaftohidroquinonas alquiladas **10-12**, obteniéndose las lignoquinonas **16-18** en cuyos espectros de RMN de 1H se observa la ausencia de las señales asociadas a los protones de los metilenos halogenados presentes en las diterpenilnaftohidroquinonas de partida y la presencia de una nueva señal más desapantallada (4,02-5,09 ppm) que se corresponde con los protones de los metilenos unidos a la función éster de la posición C-9' del resto ciclolignánico de cada uno de los híbridos preparados.



Una vez obtenidas las lignoquinonas **16-18** se procedió a la desprotección del acetónido con ácido *p*-toluensulfónico (TsOH) en una mezcla de acetona/agua obteniendo los dihidroxiésteres **19-21** correspondientes, en cuyos espectros de RMN de ^1H no se observan las señales singlete asignables a los grupos metilo geminales de los acetónidos.



Los dioles **19-21** fueron oxidados en las condiciones de Swern obteniendo las lignohidroquinonas **22-24** análogas del aldehído podofílico, que presentan en sus espectros de RMN de ^1H las señales típicas asignables al aldehído α,β -insaturado (singletes a $\sim 9,60$ y $\sim 7,33$ ppm).



2.3. Evaluación biológica

Los compuestos híbridos finales obtenidos, así como algunos intermedios y precursores, han sido evaluados por la autora de esta Tesis Doctoral en el Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca en el grupo del Dr. Manuel Fuentes García.

El estudio de la actividad biológica se ha llevado a cabo sobre las siguientes líneas celulares de cáncer humanas:

- MCF-7: cáncer de mama
- MG-63: osteosarcoma
- HT-29: carcinoma de colón

Con el fin de determinar la actividad biológica se han realizados los siguientes ensayos:

- Ensayos de citotoxicidad: determinación del valor de GI_{50} , concentración del compuesto que inhibe el 50 % del crecimiento celular a las 72 h de incubación.
- Evaluación del ciclo celular por citometría de flujo: determinación del efecto de los compuestos sobre el crecimiento celular, así como su efecto concreto sobre el proceso de apoptosis y las fases del ciclo celular.

2.3.1. Ensayos de citotoxicidad

Para determinar la viabilidad celular se ha empleado el método del MTT, un ensayo colorimétrico basado en la reducción del bromuro de 2,5-difenil-3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-tetrazol (MTT) por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, la cual transforma el MTT, un compuesto amarillo hidrofílico, en un compuesto violeta hidrofóbico cristalino, el formazán.

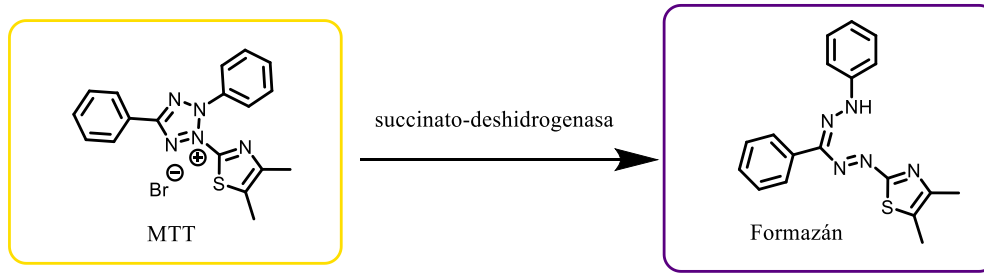


Figura 26: Transformación enzimática del MTT (2,5-difenil-3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-tetrazol) a formazán por la succinato-deshidrogenasa.

La cantidad de formazán producido constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular, por este motivo, se considera proporcional a la cantidad de células vivas. Este método permite medir tanto la supervivencia y proliferación celular, como la citotoxicidad de los compuestos ensayados. Para cuantificar la cantidad de formazán producido por las células se añade un detergente, el dodecilsulfato sódico (SDS), que rompe la membrana y libera el contenido celular.⁹⁵ Los cristales de formazán se disuelven en dimetilsulfóxido y se mide su absorbancia a 570 nm de forma que cuanto mayor sea la absorbancia, mayor será el número de células vivas. La absorbancia obtenida para el control (células sin tratar) se toma como referencia (100 % de viabilidad celular). Los compuestos se ensayaron por triplicado en concentraciones desde 10 μM hasta 0,01 μM , incubando durante 72 h y comparando la absorbancia obtenida en las células tratadas con los compuestos frente a la absorbancia del control. Tras representar los datos de viabilidad celular respecto al logaritmo de la concentración, se obtuvo el valor GI_{50} de los compuestos ensayados.

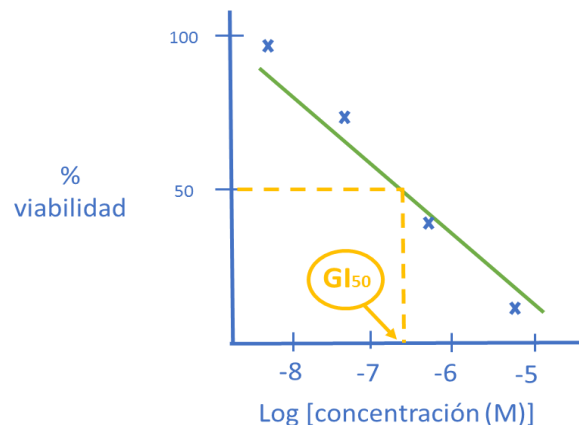
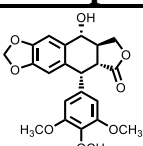
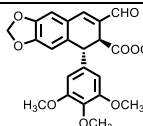
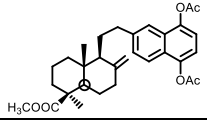
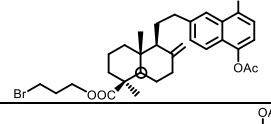
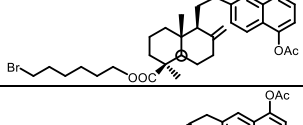
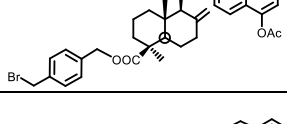
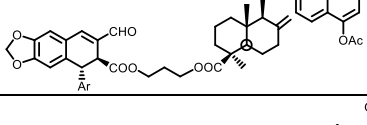
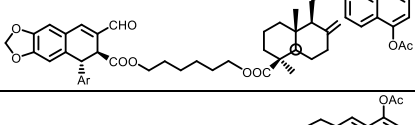
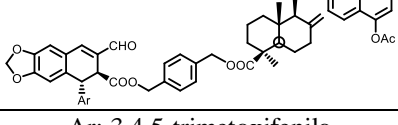


Figura 27: Representación esquemática del cálculo de valores de GI_{50}

⁹⁵ M. Ferrari, M.C. Fornasiero, A.M. Isetta, MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro, *J. Immunol. Methods.* **1990**, 131 165-172.

En el caso de la familia de lignohidroquinonas derivadas de diterpenoides sintetizadas hasta el momento, se han ensayado mediante este método tanto las lignohidroquinonas finales (**22-24**) como sus precursores diterpenilnaftohidroquinónicos (**9-12**) y los ciclolignánicos podofilotoxina (**1**) y aldehído podofílico (**5**).

Tabla 2: Citotoxicidad (GI_{50} , $\mu M \pm D.E.$) de las lignohidroquinonas derivadas de diterpenoides y sus precursores evaluados con MTT tras 72 h de incubación.

Compuesto	MCF-7	MG-63	HT-29	
	1	$0,028 \pm 0,003$	$0,007 \pm 0,005$	$0,066 \pm 0,002$
	5	$0,48 \pm 0,03$	$0,06 \pm 0,02$	$0,029 \pm 0,006$
	9	$0,015 \pm 0,001$	-	$0,02 \pm 0,002$
	10	$0,36 \pm 0,01$	$38,9 \pm 1,9$	>100
	11	$1,37 \pm 0,01$	$13,9 \pm 0,8$	$53,9 \pm 0,6$
	12	$1,79 \pm 0,55$	$23,5 \pm 8,9$	$16,0 \pm 2,7$
	22	$2,21 \pm 0,05$	$2,23 \pm 0,40$	$1,51 \pm 0,43$
	23	$1,00 \pm 0,06$	$2,06 \pm 0,72$	$1,91 \pm 0,95$
	24	$1,03 \pm 0,14$	$0,15 \pm 0,01$	$1,44 \pm 0,30$

Ar: 3,4,5-trimetoxifenilo

Como puede observarse en los valores obtenidos, prácticamente todos los compuestos son citotóxicos en las líneas celulares ensayadas, encontrándose diferencias significativas entre las líneas celulares y las series de compuestos, lo cual nos lleva a deducir algunas conclusiones interesantes de relación estructura-actividad.

Los precursores ciclolignánicos, podofilotoxina (**1**) y aldehído podofílico (**5**), han resultado muy citotóxicos, alcanzando incluso valores en el rango de nM, lo que coincide con los resultados obtenidos previamente por el grupo en este tipo de compuestos.⁷⁹ Del mismo modo ocurre con el precursor diterpenilnaftohidroquinónico **9** que ha presentado valores muy interesantes de citotoxicidad en las líneas ensayadas, también en concordancia con los resultados anteriores del grupo^{82,83}.

Respecto a las diterpenilnaftohidroquinonas **10-12**, existen diferencias en sus valores de GI₅₀. Dependiendo de la línea celular considerada, la línea celular menos sensible a este grupo de compuestos es HT-29, obteniéndose incluso un valor de GI₅₀ mayor de 100 µM para el compuesto **10** que presenta en su estructura el espaciador alifático de cadena más corta. En la línea MG-63 se observa una citotoxicidad moderada con pequeñas diferencias entre las tres diterpenilnaftohidroquinonas alquiladas. En cambio, la línea donde se alcanzan mejores valores de citotoxicidad es la línea MCF-7 donde se obtienen valores por debajo de µM, en el caso del compuesto **10** (GI₅₀ = 0,36 µM) y valores de GI₅₀ del orden de µM para las otras naftohidroquinonas **11** y **12** sin diferencias destacables (GI₅₀ = 1,37 µM y GI₅₀ = 1,79 µM respectivamente).

Por último, todas las lignohidroquinonas de esta familia han resultado citotóxicas en el rango de µM, obteniendo resultados que reflejan la importancia del espaciador usado en la síntesis de los híbridos. Las lignohidroquinonas con espaciadores alifáticos en su estructura (**22** y **23**) presentan resultados de GI₅₀ sin grandes diferencias entre las tres

⁷⁹ Castro, M. A.; del Corral, J. M.; Garcia, P. A.; Rojo, M. V.; de la Iglesia-Vicente, J.; Mollinedo, F.; Cuevas, C.; San Feliciano, A. Synthesis and biological evaluation of new podophyllic aldehyde derivatives with cytotoxic and apoptosis-inducing activities. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 983-993.

⁸² Miguel Del Corral, J M; Gordaliza, M.; Castro, M. A.; Mahiques, M. M.; Chamorro, P.; Molinari, A.; Garcia-Gravalos, M. D.; Broughton, H. B.; San Feliciano, A. New selective cytotoxic diterpenylquinones and diterpenylhydroquinones. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1257-1267.

⁸³ Miguel Del Corral, J M; Castro, M. A.; Lucena Rodri Guez, M.; Chamorro, P.; Cuevas, C.; San Feliciano, A. New cytotoxic diterpenylnaphthohydroquinone derivatives obtained from a natural diterpenoid. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 5760-5774.

líneas celulares ensayadas. Por el contrario, la lignohidroquinona **24** que contiene el espaciador aromático, presenta una cierta selectividad en la línea MG-63 con un valor de GI_{50} por debajo de μM ($GI_{50} = 0,15 \mu\text{M}$), siendo entre 7 y 10 veces más potente en esta línea que en las líneas MCF-7 y HT-29 ($GI_{50} = 1,03 \mu\text{M}$ y $1,44 \mu\text{M}$, respectivamente).

Con el fin de conocer más acerca del mecanismo de acción de las lignohidroquinonas, se han llevado a cabo otros estudios que se presentan a continuación sobre el ciclo celular.

2.3.2. Evaluación del ciclo celular por citometría de flujo

La citometría es una técnica basada en la utilización de una luz láser que permite el conteo y clasificación de las células en función de sus características físicas o químicas.⁹⁶ En la citometría de flujo esas medidas se llevan a cabo a partir de una suspensión de las células o partículas en un fluido isotónico que se hace pasar a través de un tubo muy fino y transparente sobre el que se hace incidir la luz láser. La luz transmitida y dispersada es recogida por un detector que permite el análisis de cada partícula individual, que se puede relacionar con el tamaño y la granularidad celular.⁹⁷

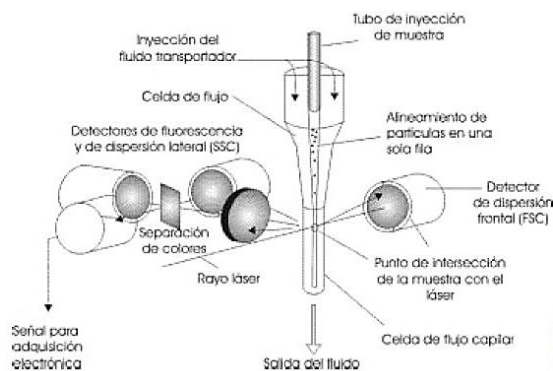


Figura 28: Representación de un citómetro de flujo [Imagen tomada de referencia 97]

La fluorescencia natural (autofluorescencia) o la conjugación con marcadores fluorescentes amplía las posibilidades de esta técnica, permitiendo el estudio de densidad

⁹⁶ Shapiro, H. M. *Practical flow cytometry*; Wiley-Liss: Hoboken, NJ, **2005**;

⁹⁷ Barrera, L. M.; Drago, M. E.; Pérez, J.; Zamaora, A. C.; Gómez, F.; Sainz, T.; Mendoza, F. Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias* **2004**, *17*, 44-55.

y distribución de determinados receptores de la superficie o del interior de las células, haciendo posible la identificación de subpoblaciones celulares.

Esta técnica aporta una gran sensibilidad, objetividad, rapidez y versatilidad analítica al estudio de la célula, lo que permite su aplicación en clínica para la detección y cuantificación de células tumorales en el estudio de las poblaciones linfocitarias aplicado al seguimiento del VIH a la determinación del fenotipo de leucemias y linfomas⁹⁸. También es posible emplear la citometría de flujo para analizar mecanismos de acción de fármacos en investigación básica, y con este fin se ha aplicado en esta de Tesis Doctoral⁹⁹.

En nuestro caso, se han analizado algunas características físicas de las células tratadas con nuestros compuestos, como por ejemplo el tamaño y la forma, lo que está relacionado con la fase del ciclo celular en la que se encuentra o con la cantidad de ADN contenido en el núcleo de las mismas. Para ello, se han empleado dos tipos de marcaje:

- Anexina V: es una proteína que se encuentra de forma natural en las células. Su papel dentro de la cascada de la coagulación no está del todo claro, aunque, a partir de experimentos *in vitro* se ha propuesto su participación en la inhibición de la coagulación por competición con la protrombina por los sitios de unión a la fosfatidilserina. Lo que sí está demostrado es su utilidad *in vitro* para detectar la apoptosis (muerte celular programada) en las células¹⁰⁰. Cuando una célula entra en el proceso de apoptosis, la fosfatidilserina, que únicamente esté presente en la cara interna de la membrana en las células sanas, modifica su distribución en la membrana lipídica, quedando expuesta hacia el exterior. Este hecho funciona como marcador de apoptosis y sirve como señal para la fagocitosis. En este caso, la gran afinidad de la anexina V por la fosfatidilserina sirve para cuantificar la apoptosis al relacionar el número de células marcadas con anexina con el número de células que se

⁹⁸ Orfao A, Ortuno F, De Santiago M, Lopez A, San Miguel J. Immunophenotyping of acute leukemias and myelodysplastic syndromes. *Cytometry*. **2004**; 58:62-71.

⁹⁹ Prasad, P. N. Introduction to biophotonics; Wiley-Interscience: Hoboken, NJ, **2003**.

¹⁰⁰ Michiru Ida; Ayano Satoh; Isamu Matsumoto, 他 Human Annexin V Binds to Sulfatide: Contribution to Regulation of Blood Coagulation. *Journal of Biochemistry* **2004**, 135, 583-588.

encuentra en el proceso de apoptosis¹⁰¹. Para este ensayo se emplea anexina V conjugada con el fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC), de forma que cuanto más fluorescencia se observe por parte de este marcaje, mayor será el número de células que están en apoptosis (anexina +).

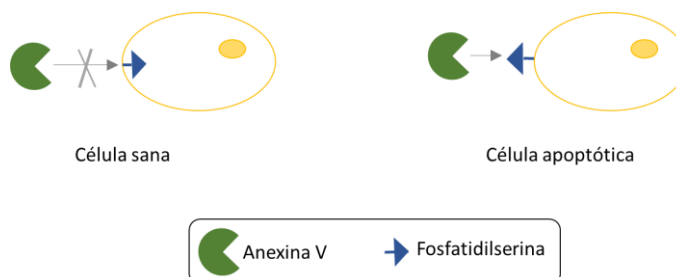


Figura 29: Anexina V y unión con célula apoptótica

- Ioduro de propidio (IP): es un agente fluorescente intercalante del ADN que se emplea para la determinación de la viabilidad celular y la cuantificación del contenido de ADN. Es una molécula que posee carga en su estructura, por lo que no es capaz de atravesar la membrana celular ni nuclear en condiciones normales, pero sí que es capaz de acceder hasta el núcleo celular cuando la célula muere y las membranas se desestructuran. Cuando el IP llega a intercalarse entre las bases del ADN, es señal de muerte celular e, igual que el caso anterior, cuanto mayor sea la fluorescencia observada, mayor será el número de células muertas (IP+)^{96,99}.

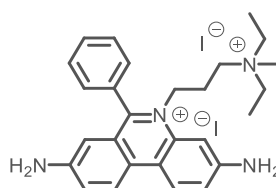


Figura 30: Ioduro de propidio

Como ya se ha comentado anteriormente en este trabajo, podofilotoxina (**1**), aldehído podofílico (**5**) y otros ciclolignanos sintetizados por el grupo anteriormente, actúan inhibiendo la polimerización de la tubulina. Este efecto puede empezar a detectarse

¹⁰¹ Koopman, G.; Reutelingsperger, C. P.; Kuijten, G. A.; Keehnen, R. M.; Pals, S. T.; van Oers, M. H. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* **1994**, *84*, 1415.

⁹⁶ Shapiro, H. M. *Practical flow cytometry*; Wiley-Liss: Hoboken, NJ, **2005**;

⁹⁹ Prasad, P. N. *Introduction to biophotonics*; Wiley-Interscience: Hoboken, NJ, **2003**.

a tiempos cortos de incubación (24 h), mientras que a tiempos más largos (48-72 h), estos compuestos son capaces de inducir una apoptosis mediada por la activación de la enzima caspasa-3⁷⁸ causando finalmente la muerte celular. Respecto a las diterpenilnaftohidroquinonas, se ha confirmado su citotoxicidad en varios trabajos^{82,83} y parece que presentan un mecanismo de acción inespecífico, diferente del que presentan los ciclolignanos, pero que puede resultar complementario y que es posible también detectar a tiempos cortos de incubación.

Estas propiedades diferentes de las familias de precursores de los híbridos nos han llevado a estudiar el efecto de nuestros compuestos sobre células mediante citometría de flujo a tiempos más cortos de incubación. Con el objetivo de conocer si los nuevos híbridos mantienen o incluso mejoran las propiedades y/o la potencia de sus precursores se han realizado los siguientes ensayos:

- Efecto de los compuestos sobre la viabilidad celular a tiempos cortos de incubación
- Determinación de apoptosis
- Análisis del ciclo celular

⁷⁸Castro, M. A.; Miguel del Corral, J M; Gordaliza, M.; Garcia, P. A.; Gomez-Zurita, M. A.; Garcia-Gravalos, M. D.; de la Iglesia-Vicente, J.; Gajate, C.; An, F.; Mollinedo, F.; San Feliciano, A. Synthesis and biological evaluation of new selective cytotoxic cyclolignans derived from podophyllotoxin. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1214-1222.

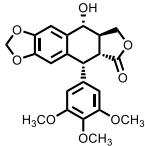
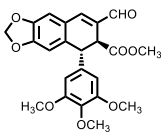
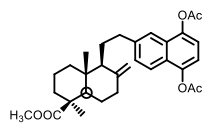
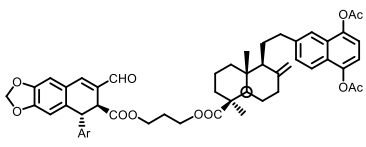
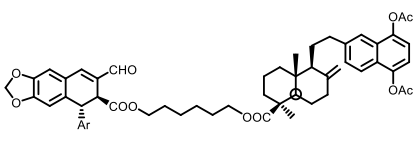
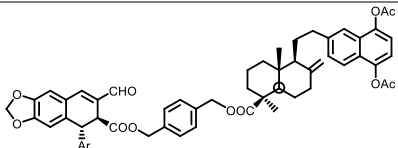
⁸²Miguel Del Corral, J M; Gordaliza, M.; Castro, M. A.; Mahiques, M. M.; Chamorro, P.; Molinari, A.; Garcia-Gravalos, M. D.; Broughton, H. B.; San Feliciano, A. New selective cytotoxic diterpenylquinones and diterpenylhydroquinones. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1257-1267.

⁸³Miguel Del Corral, J M; Castro, M. A.; Lucena Rodri Guez, M.; Chamorro, P.; Cuevas, C.; San Feliciano, A. New cytotoxic diterpenylnaphthohydroquinone derivatives obtained from a natural diterpenoid. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 5760-5774.

2.3.2.1. Efecto de los compuestos sobre la viabilidad celular a tiempos cortos de incubación

Las lignohidroquinonas finales (**22**, **23** y **24**) junto con los precursores ciclolignánicos **1** y **5**, y la diterpenilnaftohidroquinona **9**, se incubaron en las mismas líneas celulares utilizadas anteriormente: MCF-7, MG-63 y HT-29, determinando mediante citometría de flujo la citotoxicidad a las 24 h. En la tabla 3 se recogen los resultados expresados en GI₅₀ a ese tiempo de incubación.

Tabla 3: Citotoxicidad (GI₅₀, μM ±D.E.) de los compuestos evaluados por citometría de flujo a las 24 h de incubación

Compuesto	MCF-7	MG-63	HT-29	
	1	>100	18,3 ± 1,4	>100
	5	>100	1,23 ± 0,06	>100
	9	29,9 ± 0,7	1,16 ± 0,47	5,65 ± 0,07
	22	>100	58,2 ± 1,0	>100
	23	>100	44,6 ± 0,2	57,6 ± 0,1
	24	>100	0,50 ± 0,29	>100

Ar: 3,4,5-trimetoxifenilo

Como puede observarse en los resultados recogidos en la tabla 3 anterior, y a diferencia de lo observado en los ensayos con MTT (tabla 2), a tiempos cortos de incubación apenas pueden observarse los efectos citotóxicos de la mayoría de nuestros compuestos; solo la diterpenilnaftohidroquinona **9** mostró cierta citotoxicidad en todas

las líneas celulares, como cabía esperar por tratarse de una diterpenilnaftohidroquinona que no posee el fragmento ciclolignánico.

Las líneas MCF-7 y HT-29 no se vieron afectados a este tiempo de incubación ni por los precursores ciclolignánicos **1** y **5** ni por las lignohidroquinonas **22** y **24**, y sólo **23** resultó ligeramente citotóxica en HT-29 ($GI_{50} = 57,6 \mu\text{M}$). La línea MG-63 fue la más sensible a todos los compuestos ensayados. En este caso, el aldehído podofílico **5** ha resultado casi 15 veces más potente que el producto natural podofilotoxina **1** ($GI_{50} = 1,23 \mu\text{M}$ y $18,3 \mu\text{M}$, respectivamente). En cuanto a los híbridos **22** y **23** que presentan espaciadores alifáticos flexibles han resultado moderadamente citotóxicas ($GI_{50} = 58,2 \mu\text{M}$ y $44,6 \mu\text{M}$, respectivamente) mientras que llama la atención el valor obtenido en esta línea para la lignohidroquinona **24** que posee el espaciador aromático más rígido y ha resultado la más potente y selectiva frente a esta línea obteniendo un valor de GI_{50} por debajo del rango de μM ($GI_{50} = 0,50 \mu\text{M}$).

La mayor sensibilidad de MG-63 frente a nuestros compuestos también se puede apreciar al representar la viabilidad celular (%) de cada línea frente a las concentraciones ensayadas de las lignohidroquinonas (de $0,1 \mu\text{M}$ a $100 \mu\text{M}$) (Figura 31). Las curvas de la línea MG-63 destacan por el descenso de la viabilidad respecto de las otras, efecto especialmente marcado para la de la lignohidroquinona **24**.

Estos resultados ponen de manifiesto la importancia del espaciador usado para unir los dos fragmentos del híbrido y que la hibridación efectivamente puede mejorar las propiedades farmacológicas de un compuesto respecto de sus precursores como ocurre con la lignohidroquinona **24** que mejora la citotoxicidad en comparación con **5** y **9** en la línea tumoral MG-63.

Por otro lado, y aunque los ensayos a 72 h y a 24 h no son totalmente comparables, estos resultados pueden ser indicativos de que el tiempo necesario para que un compuesto empiece a mostrar sus efectos puede variar significativamente entre las líneas celulares ensayadas y justificaría la necesaria realización de ensayos a diferentes tiempos de incubación.

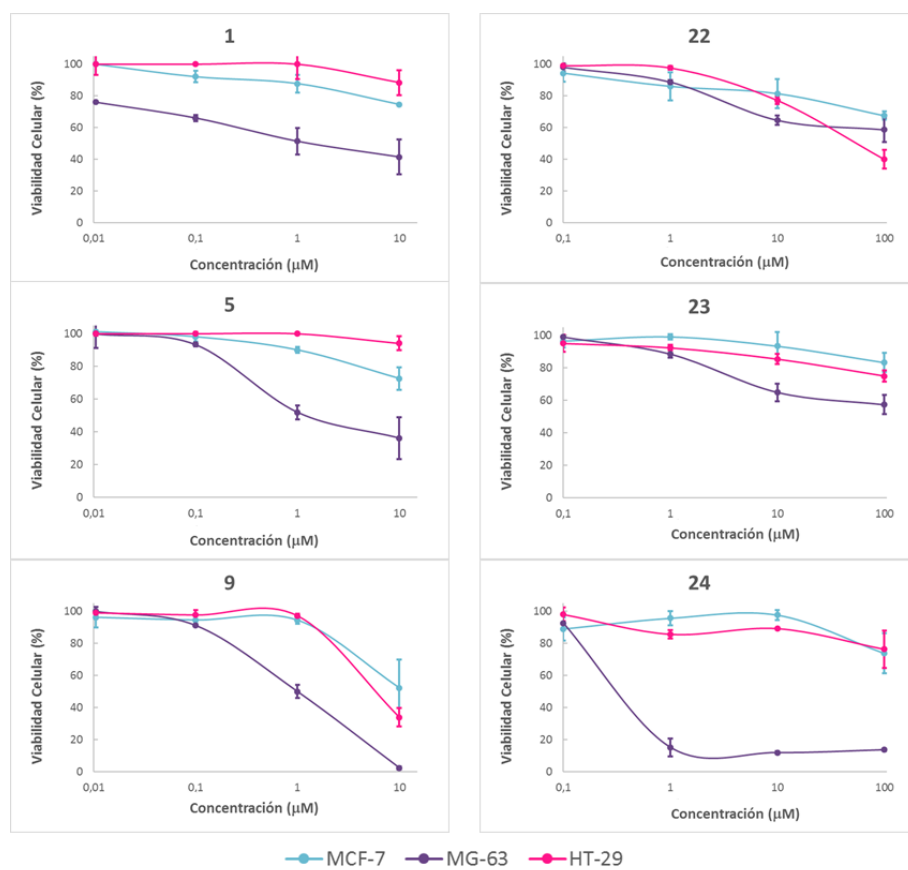


Figura 31: Efecto sobre la viabilidad celular de los precursores ciclolignánicos (**1** y **5**), del precursor monoterpenilhidroquinónico **9** y de las lignohidroquinonas (**22-24**) durante 24 h.

2.3.2.2. Análisis de la apoptosis

Como se ha mencionado antes, los ciclolignanos como el aldehído podofílico (**5**) poseen un mecanismo de acción basado en la inhibición de la polimerización de tubulina que se manifiesta con un efecto de apoptosis,⁷⁹ a diferencia de las diterpenilnaftohidroquinonas que poseen un efecto de tipo necrotizante⁹² sin activar los mecanismos de los ciclolignanos y que conducen a la muerte celular sin activar vías apoptóticas.

Para conocer más acerca del mecanismo de acción de las lignohidroquinonas sintetizadas, se han evaluado los híbridos **22-24** junto con podofilotoxina **1** y ambos fragmentos precursores, aldehído podofílico **5** y diterpenilnaftohidroquinona **9** a una concentración de 1 μ M durante 24 h en un ensayo que permite el análisis diferencial de las células apoptóticas, es decir aquellas que han iniciado el proceso de muerte celular y por ello, presentan un marcaje con anexina V (anexina +), y las células que permanecen aún viables tras el tratamiento con los compuestos ensayados y que, por tanto, no presentan dicho marcaje (Anexina -).

A su vez, el empleo del marcaje de IP junto con el marcaje de anexina permite diferenciar entre los diferentes estadios de la apoptosis. Cuando las células están iniciando el proceso apoptótico, lo que se conoce como apoptosis temprana, presentan únicamente el marcaje de anexina ya que aún el IP no es capaz de alcanzar el núcleo celular e intercalarse con las bases (Anexina+/IP-). Sin embargo, cuando el proceso de apoptosis ya está más avanzado, es decir, en apoptosis tardía, o bien ya se ha producido por completo la muerte celular, la célula mantendrá el marcaje de anexina y además sí presentará el marcaje de IP y (Anexina+/IP+).

Las figuras 32-34 recogen gráficamente los resultados obtenidos en cada línea celular con indicación del porcentaje de células que se encuentran en cada situación (viables y apoptóticas), observándose diferencias destacables en función de las líneas celulares y los compuestos evaluados.

⁷⁹ Castro, M. A.; Miguel del Corral, J. M.; García, P. A.; Rojo, M. V.; de la Iglesia-Vicente, J.; Mollinedo, F.; Cuevas, C.; San Feliciano, A. Synthesis and biological evaluation of new podophyllic aldehyde derivatives with cytotoxic and apoptosis-inducing activities. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 983-993.

⁹² Lu, J. J.; Bao, J. L.; Wu, G. S.; Xu, W. S.; Huang, M. Q.; Chen, X. P.; Wang, Y. T. Quinones derived from plant secondary metabolites as anti-cancer agents. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2013**, *13*, 456-463.

Cuando se incubaron las células de MCF-7 con los compuestos indicados, no se obtuvo una respuesta apoptótica elevada (Anexina +) respecto del control lo cual era esperable, dados los resultados obtenidos en la viabilidad celular a las 24 h (tabla 3). Solamente los precursores ciclolignánicos **1** y **5** y la lignohidroquinona **22** mostraron una ligera respuesta apoptótica al pasar la población de células en apoptosis de 16,50 % en el control a 24,64 %, 21,46 % y 25,87 % respectivamente en los compuestos mencionados

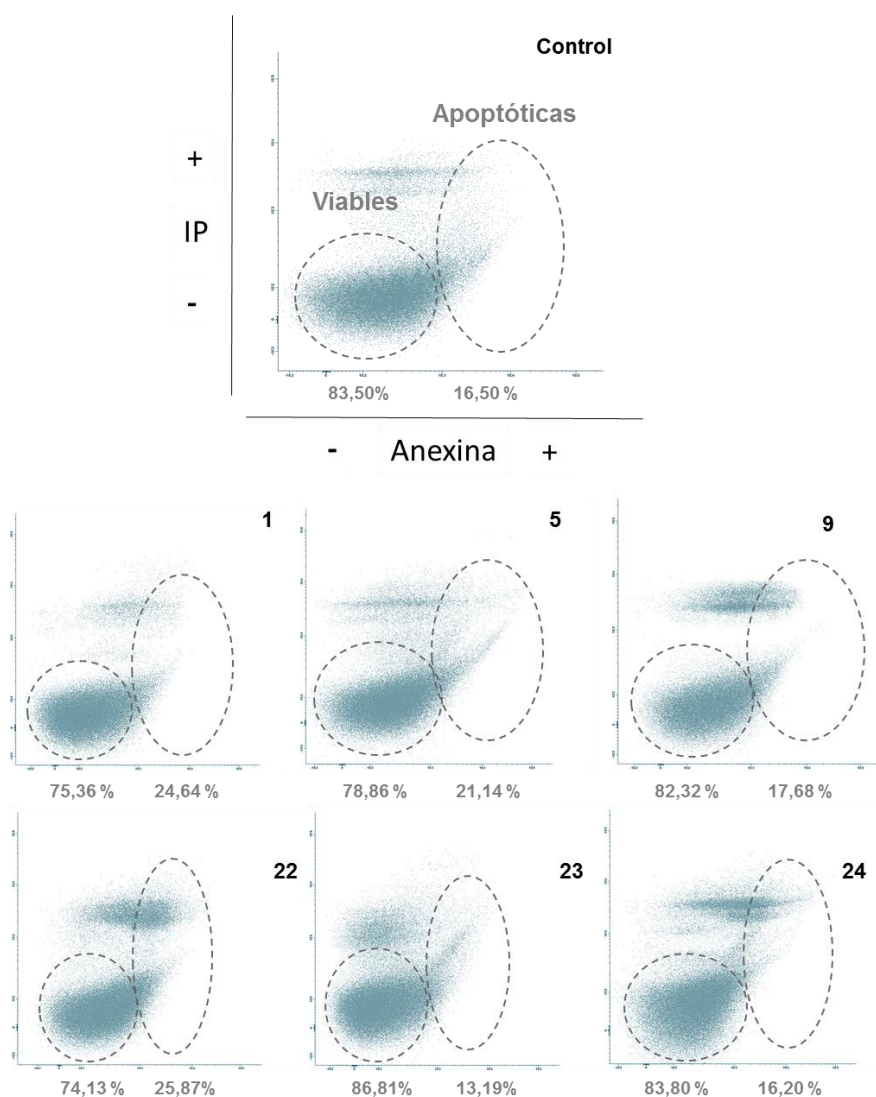


Figura 32: Efecto de los precursores ciclolignánicos (**1** y **5**), del precursor diterpenilhidroquinónico **9** y de los híbridos finales (**22-24**) en una concentración de 1 μ M sobre la línea celular MCF-7 durante 24 h.

El tratamiento de las células de MG-63 dio resultados más interesantes, remarcando la selectividad de los compuestos ensayados en esta línea celular. La respuesta apoptótica de los precursores **1**, **5** y **9** fue similar y mayor que en la línea anterior (48,56 % para **1**, 48,08 % para **5** y 66,90 % para **9**). Las lignohidroquinonas con espaciador alifático mostraron un valor bajo para la apoptosis total, siendo de nuevo la lignohidroquinona **22** con el espaciador alifático más corto la que presentó mayor respuesta (25,03 % en **22** frente a 11,24 % en **23**). El valor más interesante fue el obtenido por la lignohidroquinona **24** con un 89,96 % de apoptosis total y que concuerda con los resultados de citotoxicidad obtenidos hasta el momento.

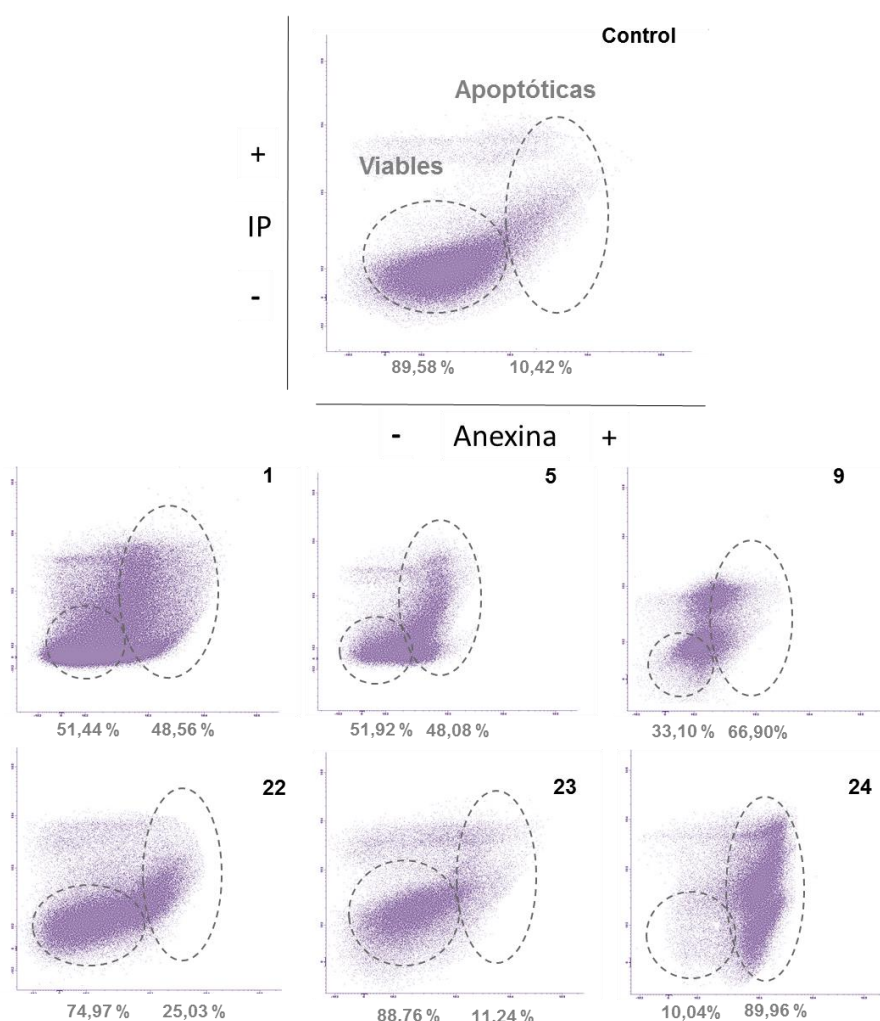


Figura 33 Efecto de los precursores ciclolignánicos (**1** y **5**), del precursor diterpenilhidroquinónico **9** y de los híbridos finales (**22-24**) en una concentración de 1 μ M sobre la línea celular MG-63 durante 24 h.

Los resultados para HT-29 fueron similares entre todos los compuestos. En este caso, en el control solo aparece un 5,30 % de células apoptóticas y en los compuestos ensayados los valores obtenidos están comprendidos entre 6,80 % y 20,70 %, lo que representa un efecto apoptótico débil. El comportamiento de los compuestos es similar a lo que ocurría en MCF-7, siendo la lignohidroquinona **23** la que muestra un efecto más marcado en HT-29 (20,70 %).

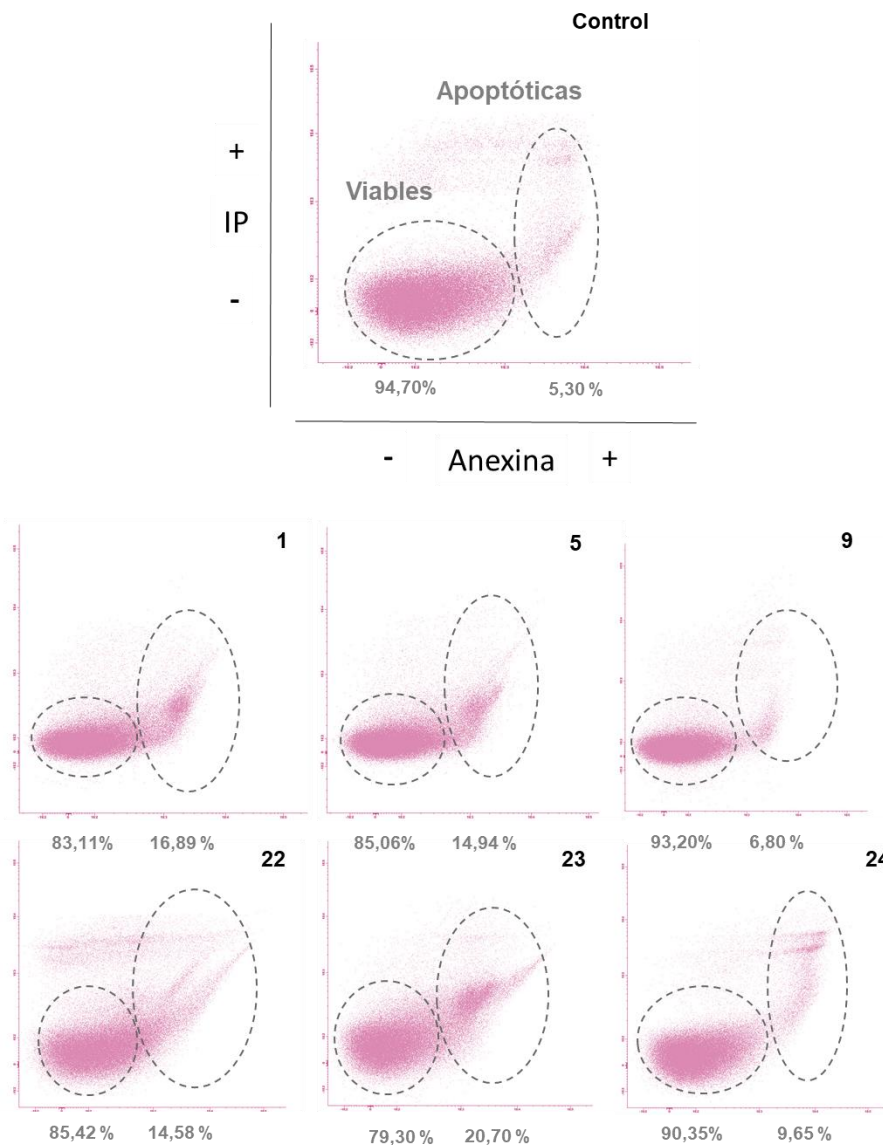


Figura 34: Efecto de los precursores ciclolignánicos (**1** y **5**), del precursor diterpenilhidroquinónico **9** y de los híbridos finales (**22-24**) en una concentración de 1 μ M sobre la línea celular HT-29 durante 24 h.

La relación de las células apoptóticas (anexina+) que se encuentran en apoptosis temprana (IP-) y en apoptosis tardía (IP+) se determina por la relación IP-/IP+. Una mayor proporción de IP- es característica de los ciclolignanós, ya que la inhibición de la polimerización de tubulina se manifiesta como una apoptosis temprana, efecto que no se asocia a la familia de las diterpenilnaftohidroquinonas cuyo efecto necrotizante da una mayor proporción de IP+ desde el principio. En las siguientes gráficas se recogen estas proporciones de IP-/IP+ representadas junto al valor de células apoptóticas totales mostradas dentro de un recuadro para cada compuesto en las diferentes líneas celulares.

En la línea MCF-7, los resultados de los dos tipos de precursores concuerdan con lo esperado, con un efecto de apoptosis temprana (IP-) muy marcado en los ciclolignanós (**1** y **5**) así como un patrón de apoptosis tardía con una mayor proporción de IP+ para la diterpenilnaftohidroquinona **9**. Respecto a los nuevos híbridos sintetizados, no mostraron tanta diferencia entre la proporción de IP-/IP+ como los precursores, lo que se podría entender como que ambos fragmentos contribuyen al efecto citotóxico del híbrido con predominio del efecto ciclolignánico únicamente en el híbrido **22**.

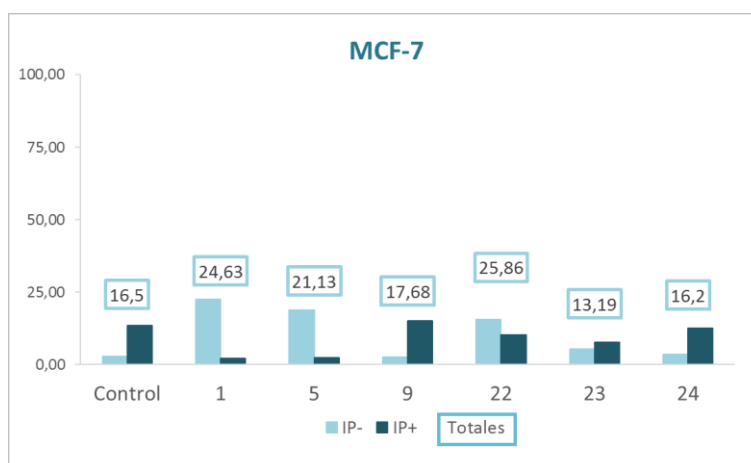


Figura 35: Representación en barras de los de IP-/IP+ de los compuestos **1**, **5**, **9** y **22-24** h respecto de los valores totales de apoptosis (valor situado encima de las barras) a una concentración de 1 μ M en MCF-7 durante 24.

En la línea MG-63, la que había resultado más sensible en este estudio, se mantiene el efecto esperado para el aldehído podofílico (**5**) aunque no es tan marcado en el caso de la podofilotoxina (**1**) como en la línea MCF-7. Así mismo, llama la atención la proporción IP-/IP+ que presentó el precursor diterpenilnaftohidroquinónico **9** con ligero predominio de células en IP-, al contrario de lo que ocurría en la línea analizada

anteriormente. Las lignohidroquinonas mantienen la proporción IP-/IP+ análoga a los precursores ciclolignánicos, aunque en esta línea celular el efecto que puede ejercer el fragmento quinónico iría también en el mismo sentido, es decir, hacía una mayor proporción de IP-.

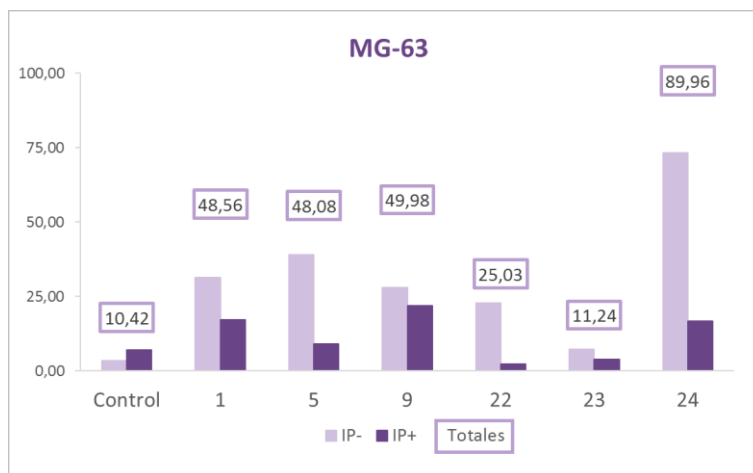


Figura 36: Representación en barrar de los de IP-/IP+ de los compuestos **1**, **5**, **9** y **22-24** h respecto de los valores totales de apoptosis (valor situado encima de las barras) a una concentración de 1 μ M en MG-63 durante 24.

Por último, en la línea HT-29, a pesar de haber obtenido el menor porcentaje total de apoptosis a las 24 h, es posible observar cómo se mantiene el predominio de la apoptosis temprana en los ciclolignanos precursores (**1** y **5**) y en todos los nuevos híbridos sintetizados, conservándose una mayor proporción de IP+ para el precursor diterpenilnaftohidroquinónico **9**.

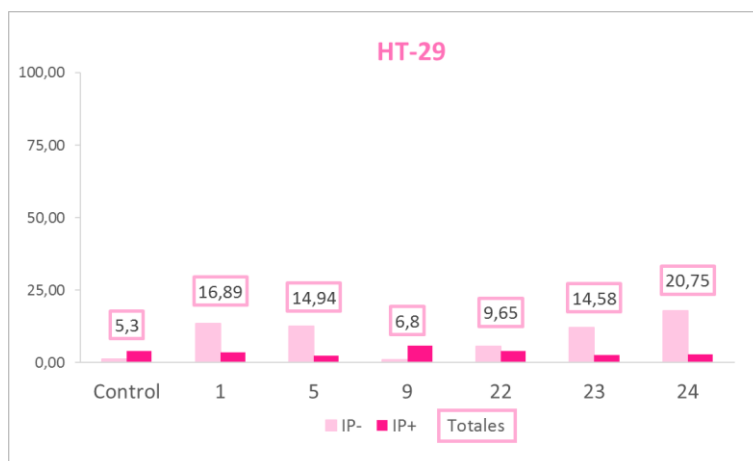


Figura 37: Representación en barrar de los de IP-/IP+ de los compuestos **1**, **5**, **9** y **22-24** h respecto de los valores totales de apoptosis (valor situado encima de las barras) a una concentración de 1 μ M en HT-29 durante 24.

De este estudio de apoptosis se puede decir que los ciclolignanos, a diferencia de las diterpenilnaftohidroquinonas, inducen una apoptosis temprana en las tres líneas celulares ensayadas que se mantiene en los híbridos finales y que es mucho más intensa en la línea celular MG-63 que resultó la más sensible en este ensayo.

Es de destacar el efecto del híbrido **24** en la línea celular MG-63 que además de ser el más citotóxico de todos a las 72 h ($GI_{50} = 0,50 \mu M$) fue el que más inducción de apoptosis manifestó con casi un 90 % de células en apoptosis a las 24 h de incubación.

2.3.2.3. Análisis del ciclo celular

La citometría de flujo también permite realizar ensayos para cuantificar el contenido de ADN y de esta manera conocer si los fármacos o compuestos evaluados alteran la distribución de la población celular con distinto contenido cromosómico a lo largo del ciclo. Para llevar a cabo este ensayo, se empleó nuevamente el yoduro de propidio (IP) que, como se ha comentado previamente, es capaz de intercalarse estequiométricamente en el ADN de doble cadena, junto con una RNasa, que evita interferencias con el ARN de doble cadena, y una solución de detergente, que permeabiliza la membrana y permite el paso del IP hasta el núcleo celular.

En el ciclo celular, las células en fase G0 y G1 contienen dos copias de ADN (2n cantidad de ADN). Durante la fase S, el material genético se está duplicando para generar el ADN necesario para las dos células hijas que se formarán en la fase de mitosis.

En la fase G2, cuando la síntesis de ADN ha finalizado, y en la fase M, donde las células se encuentran mitosis, los núcleos contienen el doble de ADN (4n). Las células en fase S están en proceso de síntesis, por lo tanto, su contenido de ADN estará distribuido entre 2n y 4n. En la siguiente figura se muestra de manera esquemática un histograma de fluorescencia de IP para una célula control

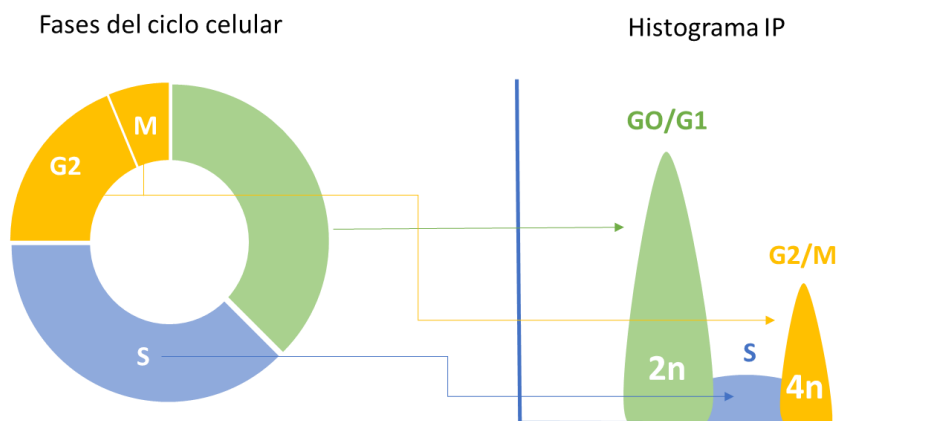


Figura 38: Representación gráfica de las fases del ciclo celular y el resultado obtenido en un histograma de IP por citometría de flujo.

La inhibición de la polimerización de la tubulina, característica de los ciclolignanos como podofilotoxina (**1**) y aldehído podofílico (**5**), se traduce en un bloqueo en la fase G2/M que se puede observar a tiempos cortos de incubación (24 h) y es fácilmente detectable mediante citometría de flujo por un aumento de las células en las fases G2/M, reflejándose en el histograma de fluorescencia como una acumulación parcial o total de las células 4n, como se representa en la siguiente figura.

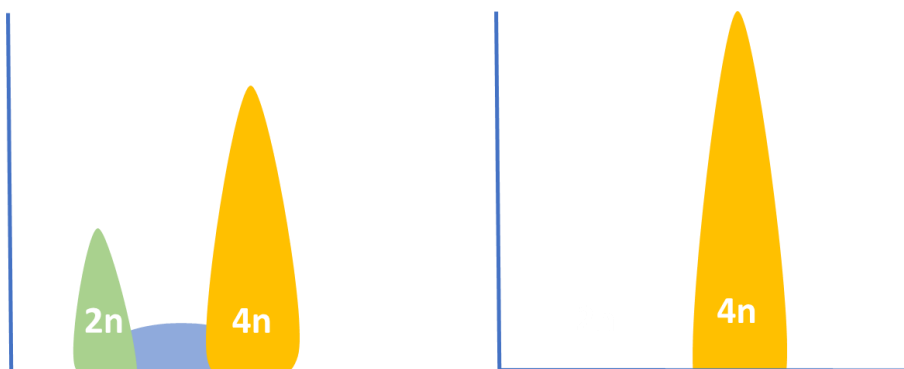


Figura 39: Representación de un histograma de IP por citometría de flujo donde se observa un bloqueo parcial (izq.) y un bloqueo total (dcha.) en las fases G2/M del ciclo celular.

Para determinar cómo afectan las nuevas lignohidroquinonas (**22-24**) a la progresión del ciclo celular, se han ensayado éstas a una concentración de 1 μM en las tres líneas celulares antes señaladas junto con los precursores ciclolignánicos y la diterpenilnaftohidroquinona **9**. El ensayo muestra diferencias entre los compuestos en función de la línea celular frente a la que actúan, detallándose a continuación los resultados.

El tratamiento de la línea MCF-7 con el aldehído podofílico **5** dio lugar a un bloqueo casi total (94,63 %) de las células en G2/M, valor esperable para este tipo de compuestos. Para la diterpenilnaftohidroquinona **9** similar al del control, si acaso con un ligero aumento de la población en G0/G1 lo que coincide con el mecanismo asignado a este tipo de compuestos que no poseen actividad de inhibición de la tubulina. En las lignohidroquinonas se aprecian diferencias significativas en cuanto a su comportamiento en esta línea. La lignohidroquinona **22**, con el espaciador alifático de cadena más corta, no presenta bloqueo en las fases G2/M en el tiempo de incubación del ensayo. En el caso de la lignohidroquinona **23**, solamente se aprecia un ligero bloqueo, pero no tan significativo como la lignohidroquinona **24** donde se alcanza el 63,04 % de las células en las fases G2/M. Sin embargo, la lignohidroquinona **24** no alcanza el bloqueo que posee el ciclolignano precursor **5** en esta línea.

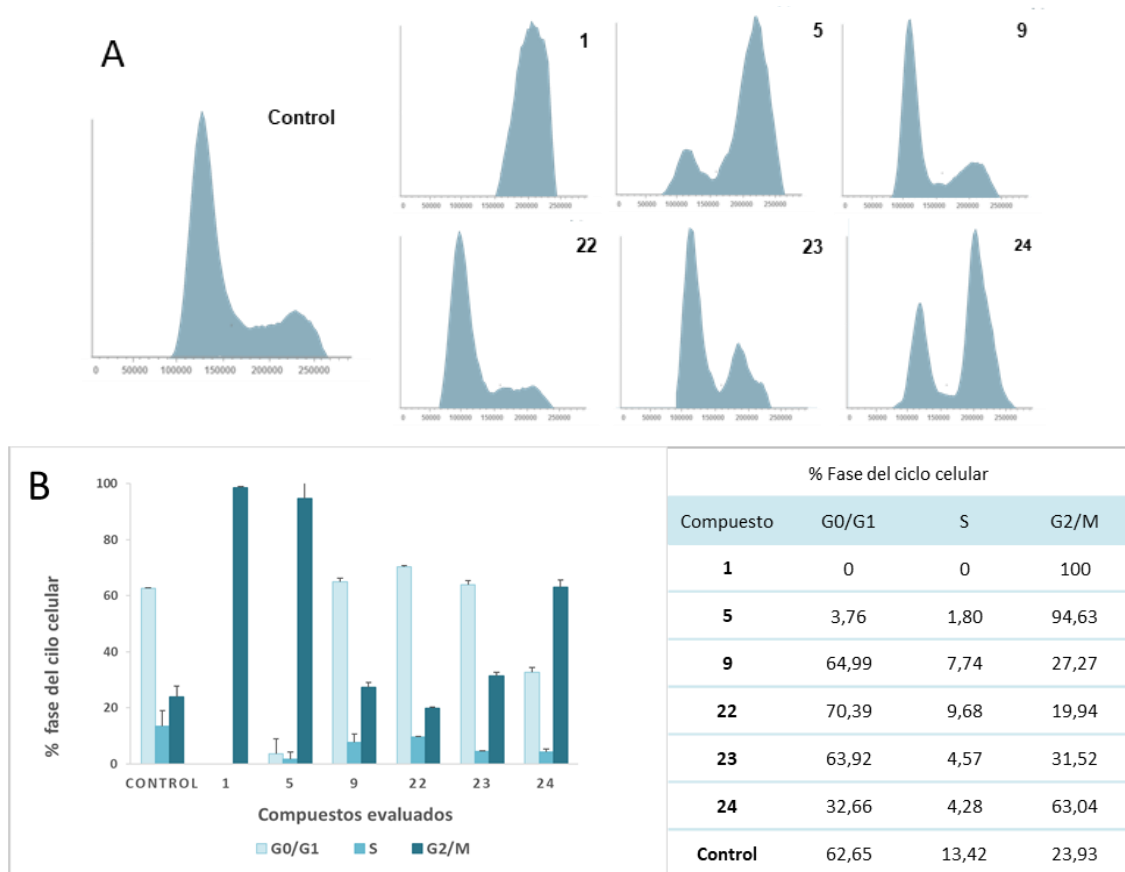


Figura 40: Efecto de los precursores ciclolignánicos (**1** y **5**), el precursor diterpenilhidroquinónico **9** y los híbridos finales (**22-24**) sobre el ciclo celular determinado por citometría de flujo en la línea MCF-7. Las células se incubaron con una concentración de los compuestos señalados de 1 μ M. (A): contenido de ADN por cada célula analizado por citometría de flujo. (B): porcentaje de células en cada fase del ciclo celular (G0/G, S y G2/M)

En la línea MG-63 se produjo un bloqueo total en G2/M por parte de los ciclolignanos precursores **1** y **5**, así como un aumento del número de células en esa fase en la diterpenilnaftohidroquinona **9** y en la lignohidroquinona **22** (40,96 % y 38,70 % respectivamente), que habían sido prácticamente inactivas en MCF-7. En este caso, la lignohidroquinona **23** obtuvo un perfil similar al de control, mientras que la lignohidroquinona que presenta en su estructura el espaciador aromático (**24**) resultó la más activa en esta línea, alcanzando el 100 % de bloqueo en las fases G2/M, lo que denota la influencia del resto ciclolignánico en la actividad de esta molécula híbrida.

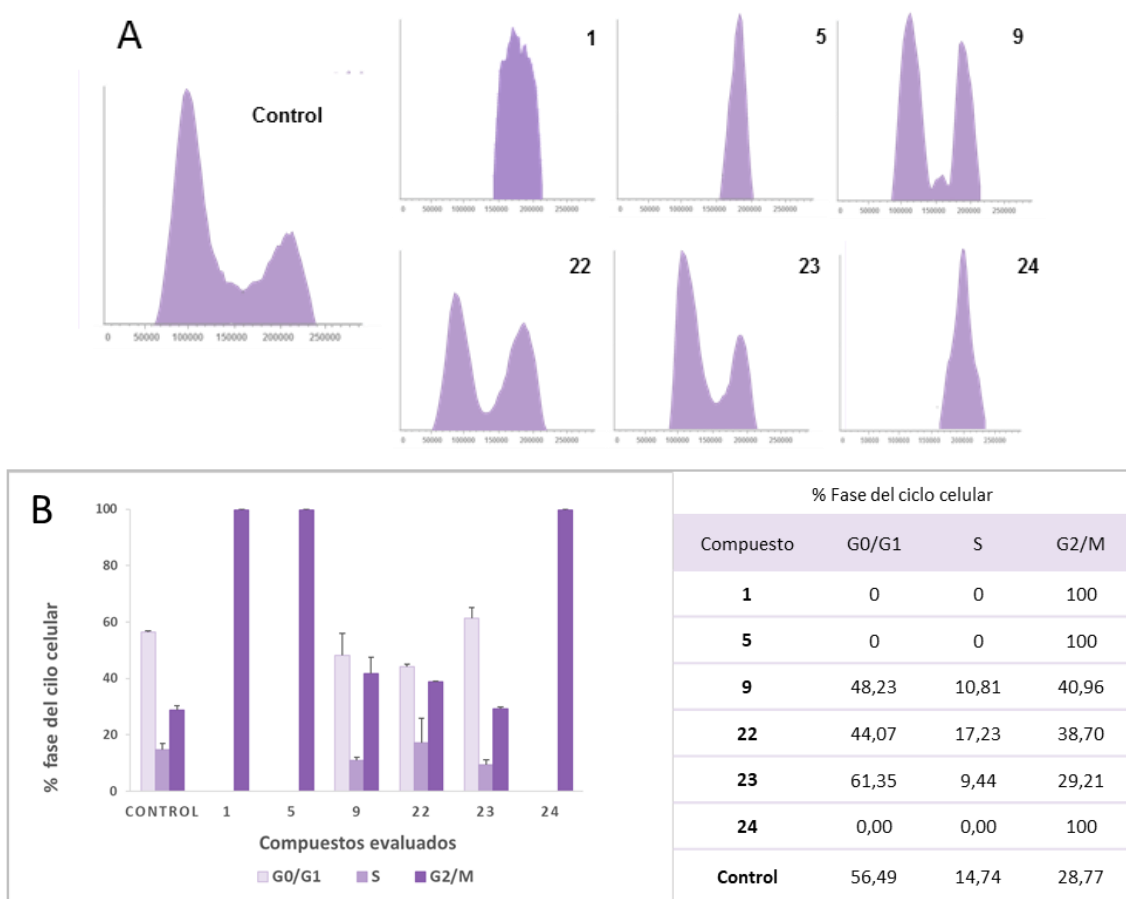


Figura 41: Efecto de los precursores ciclolignánicos (**1** y **5**), el precursor diterpenilhidroquinónico **9** y los híbridos finales (**22-24**) sobre el ciclo celular determinado por citometría de flujo en la línea MG-63. Las células se incubaron con una concentración de los compuestos señalados de 1 μ M. (A): contenido de ADN por cada célula analizado por citometría de flujo. (B): porcentaje de células en cada fase del ciclo celular (G0/G, S y G2/M)

En el caso de las células HT-29, se obtuvo un bloqueo total en G2/M por parte de podofilotoxina (**1**) y aldehído podofílico (**5**) lo que concuerda con los resultados obtenidos hasta el momento. Nuevamente, la diterpenilnaftohidroquinona **9** no mostró ninguna variación en el ciclo celular salvo un ligero aumento en G0/G1, así como la lignohidroquinona **22** con un valor muy similar al control en el porcentaje de células en G2/M (25,03 % para el control y 31,32 % para **22**). En la lignohidroquinona **23** sí se aprecia un bloqueo significativo de las células de HT-29 (77,08 %) y de nuevo en esta línea, es la lignohidroquinona **24** la que presenta mayor bloqueo (91,09 %).

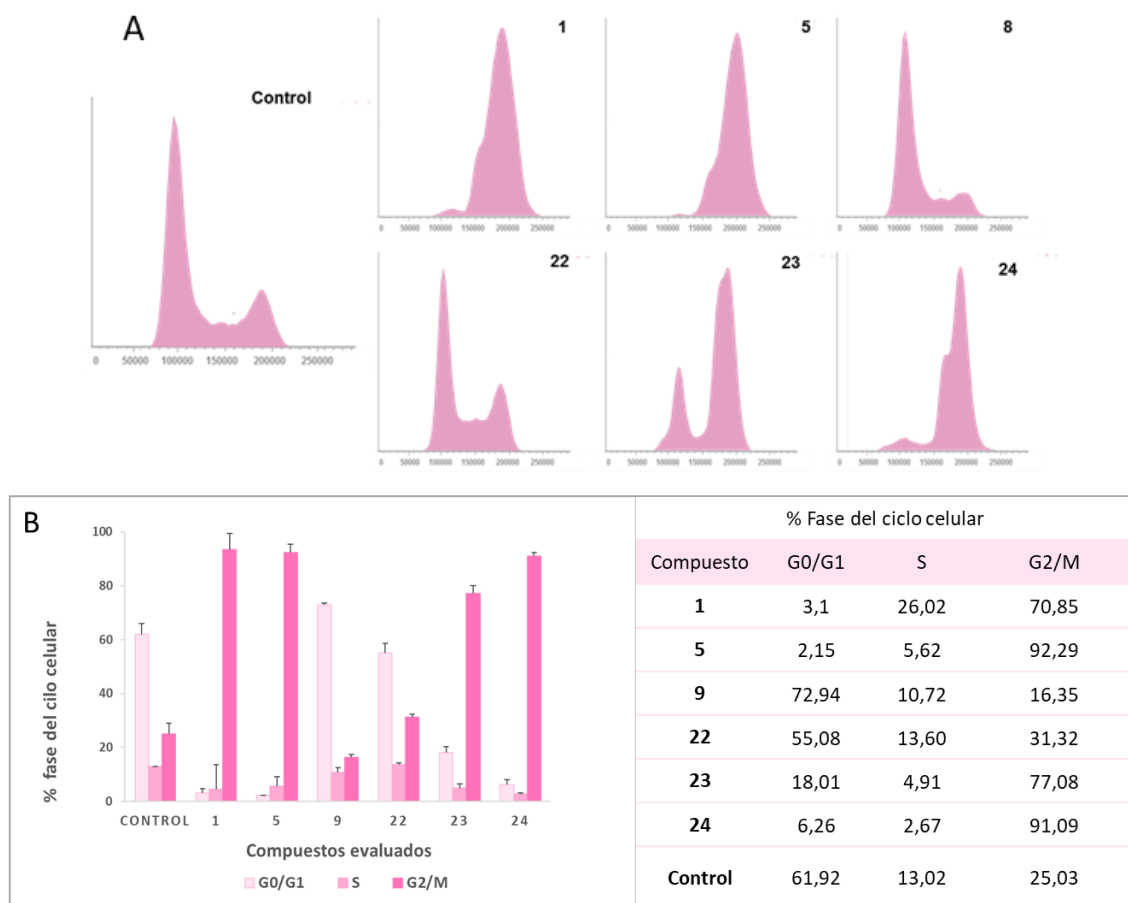


Figura 42: Efecto de los precursores ciclolignánicos (**1** y **5**), el precursor diterpenilhidroquinónico **9** y los híbridos finales (**22-24**) sobre el ciclo celular determinado por citometría de flujo en la línea HT-29. Las células se incubaron con una concentración de los compuestos señalados de 1 μ M. (A): contenido de ADN por cada célula analizado por citometría de flujo. (B): porcentaje de células en cada fase del ciclo celular (G0/G, S y G2/M)

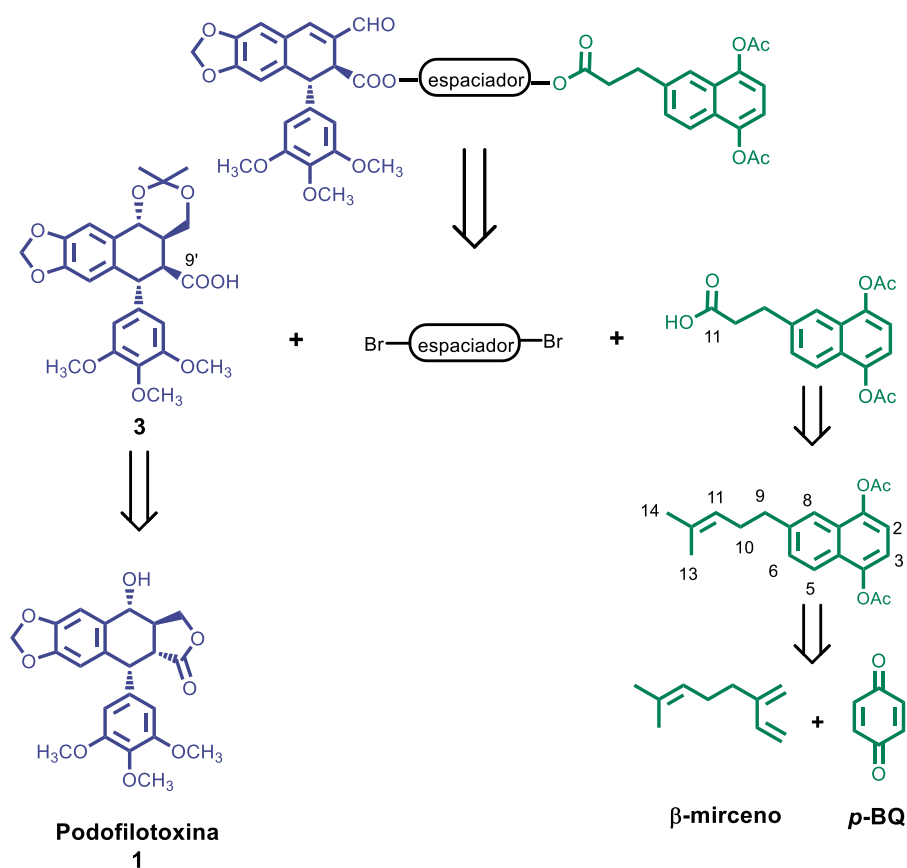
A la vista de los resultados presentados hasta ahora y a modo de resumen, se puede decir que el comportamiento de los precursores ciclolignánicos (**1** y **5**) está de acuerdo con lo esperado para esta familia de compuestos que se caracterizan por inhibir la polimerización de la tubulina y que se traduce en estos ensayos por una activación de apoptosis temprana y un bloqueo en las fases G2/M del ciclo celular. Por otro lado, el precursor diterpenilnaftohidroquinónico **9**, que carece de dicho mecanismo de acción, ha presentado unos valores más característicos de su efecto necrotizante.

Respecto a las lignohidroquinonas **22-24**, se han podido observar diferencias entre ellas en las diferentes líneas celulares ensayadas, poniendo de manifiesto la importancia del espaciador empleado en su síntesis para unir los fragmentos de ambas familias que forman el híbrido. En términos de citotoxicidad, ha destacado la lignohidroquinona **24** en la línea MG-63 con un valor de GI₅₀ por debajo de μM , siendo casi 15 veces más potente en esa línea que las otras dos lignohidroquinonas y presentando una selectividad entre 7 y 9 veces mayor en esta línea que en las otras dos ensayadas.

Además, los ensayos de apoptosis de este nuevo híbrido mostraron un % alto de células apoptóticas de en la línea MG-63, con un perfil IP-/IP+ análogo a los precursores ciclolignánicos, por lo que parece que mantiene probablemente el mecanismo de acción de éstos y lleva a las células a un proceso de apoptosis temprana (IP-). Por último, la lignohidroquinona **24** es capaz también de producir un bloqueo en las fases G2/M del ciclo celular al nivel que lo hacen el compuesto natural podofilotoxina (**1**) y el cabeza de serie aldehído podofílico (**5**).

3. Lignohidroquinonas a partir de derivados monoterpénicos.

Dentro de las muchas estrategias que existen en la búsqueda de nuevos fármacos, una de ellas es la simplificación de la estructura original del fármaco con el fin de localizar el farmacóforo, es decir, los elementos estructurales necesarios para que los compuestos mantengan la actividad farmacológica. Así se podría optimizar la actividad sintetizando nuevos agentes cuyas estructuras incluyan esa agrupación farmacofórica. En el caso de las diterpenilhidroquinonas precursoras, es la parte quinónica la que parece responsable de la actividad⁷. De este modo, se va a explorar la importancia del tamaño del resto terpenico en la actividad de esta familia de híbridos planteando la síntesis un nuevo tipo de lignohidroquinonas que incluye una monoterpenilhidroquinona. La estructura general de estos híbridos, así como sus precursores se representan en el siguiente esquema retrosintético.



⁷ Guo, Z. The modification of natural products for medical use. *Acta Pharma. Sin. B.* **2017**, 7, 119-136.

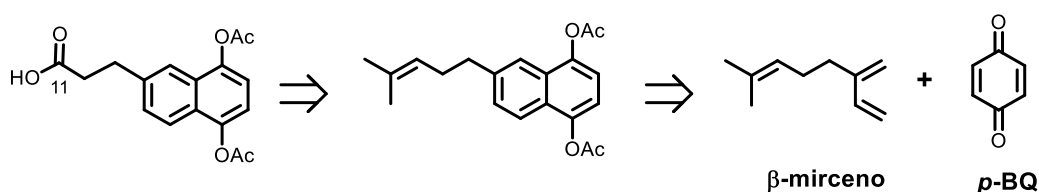
La experiencia previa en la síntesis de estos compuestos, así como los interesantes resultados de citotoxicidad obtenidos para este tipo de moléculas ha motivado la incorporación de este tipo de fragmento dentro de la nueva familia de híbridos. En esta familia de lignohidroquinonas, el precursor monoterpenilhidroquinónico se puede obtener a partir de un monoterpenoide de origen natural, el β -mirceno,^{102,87} que está disponible comercialmente.

De la misma manera que se planteó para las lignohidroquinonas derivadas de diterpenilhidroquinonas, también aquí se van a emplear los mismos espaciadores alifáticos y aromáticos con el fin de analizar más claramente la influencia que el tamaño del precursor terpénico tiene en la bioactividad de esta familia.

3.1. Obtención de precursores monoterpenilhidroquinónicos.

El precursor elegido para la obtención de esta familia de lignohidroquinonas es el compuesto que presenta un ácido carboxílico en la posición C-11 adecuado para la incorporación del espaciador.

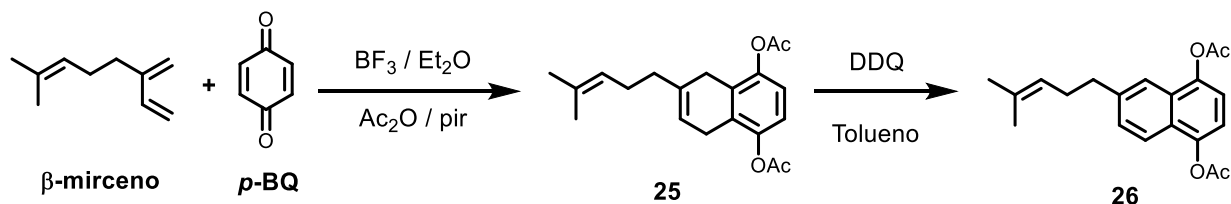
A diferencia de lo que ocurría con las diterpenilhidroquinonas, en la monoterpenilhidroquinona que se obtiene por la cicloadición de Diels-Alder entre el β -mirceno y la *p*-BQ no existe un ácido carboxílico en la estructura, aunque la presencia del doble enlace trisustituido en la cadena lateral facilita su preparación mediante reacciones de degradación, tal y como se recoge en el esquema retrosintético siguiente.



¹⁰² Behr, A.; Johnen, L. Myrcene as a natural base chemical in sustainable chemistry: a critical review. *ChemSusChem* **2009**, 2, 1072-1095.

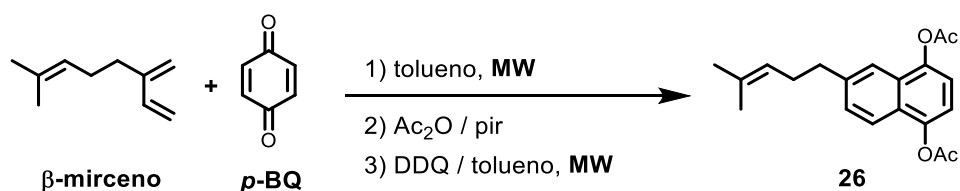
⁸⁷ Miguel del Corral, J. M.; Castro, M. A.; Oliveira, A. B.; Gualberto, S. A.; Cuevas, C.; San Feliciano, A. New cytotoxic furoquinones obtained from terpenyl-1,4-naphthoquinones and 1,4-anthracenediones. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 7231-7240.

Así, cuando se hicieron reaccionar el dieno (β -mirceno) y el dienófilo (*p*-benzoquinona) en presencia de un ácido de Lewis ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$), se obtuvo un producto de cicloadición que se acetiló con anhídrido acético para obtener **25**, que posteriormente, se aromatizó con DDQ, obteniéndose la naftohidroquinona diacetilada **26**.



Las señales más significativas que se observaron en el espectro de RMN de ^1H de la monoterpenilhidroquinona **26** fueron el sistema AB a 7,18 ppm ($J=1,6$ Hz) asignables a los dos hidrógenos aromáticos del anillo hidroquinónico acetilado, así como dos singletes a 2,47 y 2,48 asignables a los grupos acetilo. Además, aparecieron una serie de señales entre 7,42 y 7,79 ppm características de un anillo aromático 1,2,4-trisustituido. En cuanto a la cadena lateral, se observan dos señales singlete a 1,57 y 1,70 ppm asignables a los dos grupos metilos sobre doble enlace, y una señal a 5,19 ppm correspondiente a un hidrógeno olefínico.

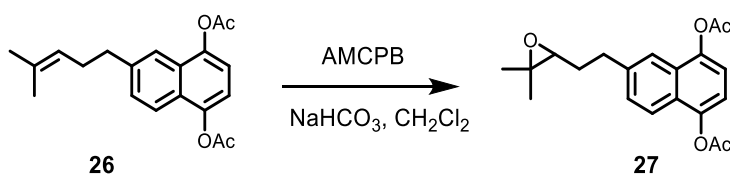
Con el fin de optimizar la obtención de la monoterpenilnaftohidroquinona **26** se ha realizado la reacción irradiando con microondas. Con esta metodología (disolviendo dieno y dienófilo en tolueno e irradiándolos a una temperatura de 80 °C y potencia de 500 W) se ha conseguido optimizar el tiempo de reacción de la cicloadición de Diel-Alder pasando de 24 h en el procedimiento habitual a 45 min. También utilizando las mismas condiciones de temperatura, potencia de irradiación en un aparato de microondas y disolvente, también se redujo el tiempo de la reacción de aromatización, pasando de 1,5 h a 15 min.



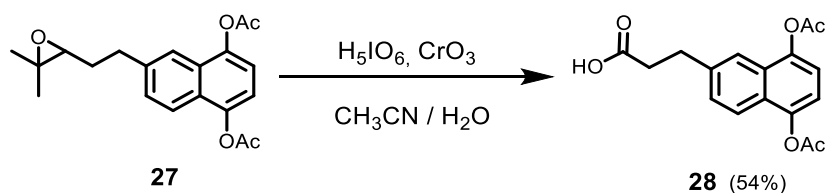
Como se ha comentado, para obtener el precursor monoterpenilhidroquinónico adecuado que permita la unión del espaciador es necesario transformar la cadena lateral

del compuesto **26**. En trabajos anteriores⁹³ se han realizado transformaciones en esa parte de la molécula que dieron lugar a derivados con diferente grado de oxidación en C-11 a través de la epoxidación del doble enlace trisustituido.

Así, cuando se trató la naftohidroquinona **26** con ácido *m*-cloroperbenzoico (AMCPB) en presencia de NaHCO₃ y utilizando CH₂Cl₂ como disolvente,¹⁰³ se obtuvo el epóxido **27** (90 %). La formación del epóxido se confirmó a partir de los datos espectroscópicos de RMN de ¹H, al observar la ausencia del triplete a 5,19 ppm asignable al protón olefínico presente en el compuesto **26**, así como un apantallamiento significativo en las señales del *gem*-dimetilo que resuenan a 1,28 y 1,16 ppm, desplazamiento característico de metilos sobre carbono oxigenado.



El tratamiento del epóxido **27** con ácido periódico y óxido de cromo (VI)¹⁰⁴ en acetonitrilo condujo al ácido carboxílico **28** con un rendimiento moderado (54 %). La obtención de este ácido se confirmó mediante su espectro de RMN de ¹H donde se observa la ausencia de las señales asignables al *gem*-dimetilo C-13 y C-14 y el apantallamiento de la señal asignables al metileno C-10 hasta 3,14 ppm.



Junto con el ácido **28**, se obtuvo un producto secundario de reacción de naturaleza neutra que no correspondía con el epóxido de partida, cuyo espectro de RMN de ¹H mostraba las señales típicas del sistema naftohidroquinónico diacetilado,

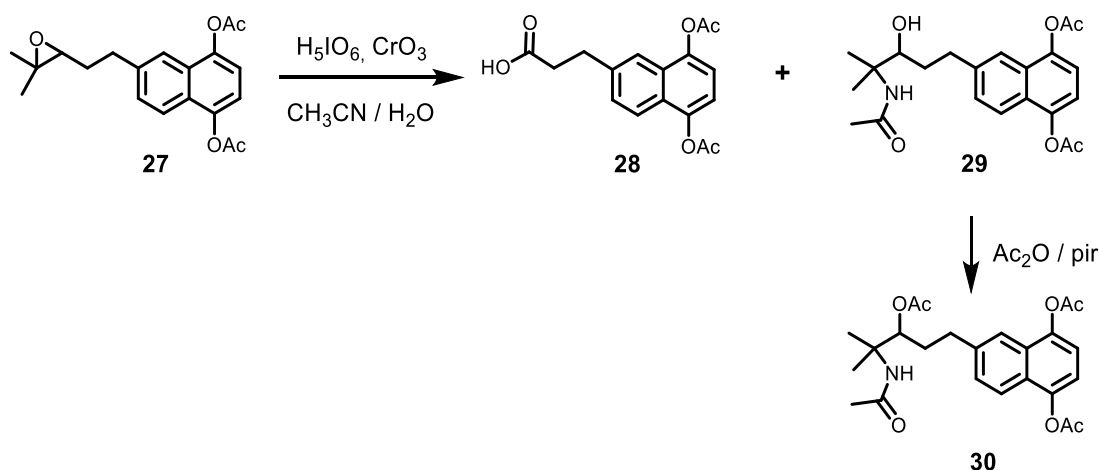
⁹³ Miguel del Corral, J M; Gordaliza, M.; Castro, M. A.; Mahiques, M. M.; San Feliciano, A.; Garcia-Gravalos, M. D. Further antineoplastic terpenylquinones and terpenylhydroquinones. *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 31-41.

¹⁰³ Martín Martín, M. L. Síntesis y evaluación citotóxica de nuevas terpenil-1,4-naftoquinonas. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca. **2002**.

¹⁰⁴ Zhao, M.; Li, J.; Song, Z.; Desmond, R.; Tschäen, D. M.; Grabowski, E. J. J.; Reider, P. J. A novel chromium trioxide catalyzed oxidation of primary alcohols to the carboxylic acids. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5323-5326.

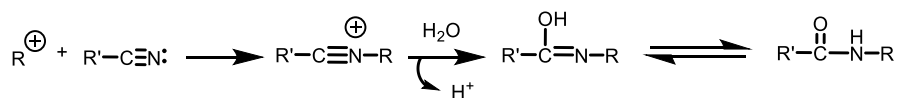
observándose además una señal a triplete 3,14 ppm asignable a un protón geminal a un grupo hidroxilo y una nueva señal singlete a 1,94 ppm característica a un nuevo metilo de grupo acetilo, lo que nos llevó a pensar que podía tratarse de un producto secundario derivado de la apertura del epóxido, por lo que se sometió de nuevo a las condiciones de ruptura oxidativa recuperándose el mismo compuesto inalterado.

Con el fin de facilitar la identificación del compuesto y puesto que la señal a 3,14 ppm indicaba la presencia de grupo hidroxilo en la molécula, se procedió a su acetilación, obteniendo un producto de reacción en cuyo espectro de RMN de ^1H se observaba un desplazamiento de dicha señal multiplete hasta 5,27 ppm, lo que junto con una nueva señal singlete a 2,03 ppm característica de un nuevo grupo acetilo, confirmaba la presencia del grupo hidroxilo secundario acetilado que lógicamente se situaba en posición C-11 de la cadena alquílica. Además, el espectro de RMN de ^1H presentaba otra señal asignable a un metilo a 1,90 ppm de grupo acetilo que ya se encontraba en la molécula de partida antes de realizar la reacción de acetilación. Esto llevó a pensar que este primer grupo acetilo observado solo puede provenir de la reacción del grupo epóxido con el acetonitrilo usado como disolvente. De esta manera, se propusieron para el compuesto secundario y su producto de acetilación las estructuras **29** y **30** representadas en el esquema siguiente.

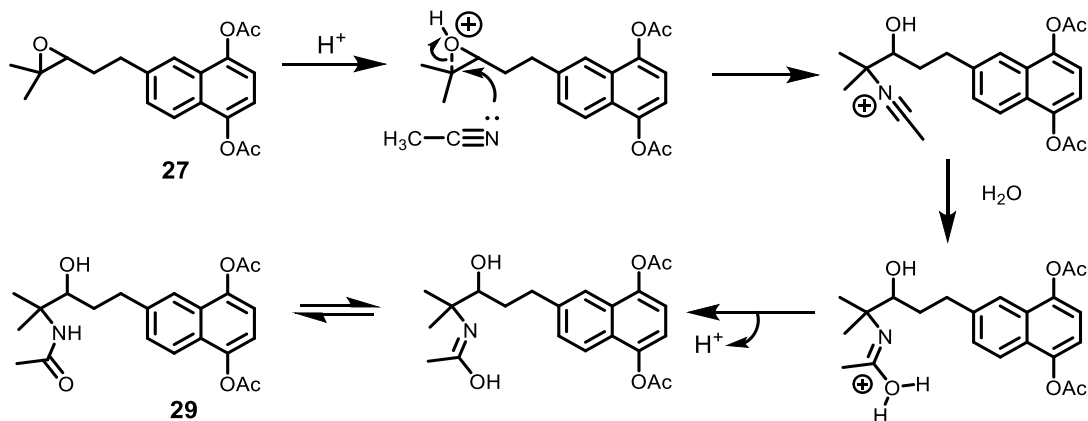


En la bibliografía está descrito que los nitrilos pueden experimentar la reacción de Ritter consistente en la adición de un carbocatión secundario o terciario al nitrógeno de un nitrilo, que en presencia de agua conduce a la formación de amidas¹⁰⁵.

¹⁰⁵Smith, M. B.; March, J. *March's advanced organic chemistry: reactions, mechanisms, and structure*; Wiley-Interscience: Hoboken, **2007**; pp 2357.

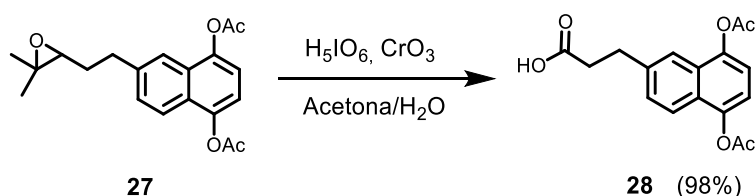


En nuestro caso es posible la formación de un carbocatión terciario a partir de la apertura del epóxido en el medio ácido de reacción que posteriormente reaccionaría con el disolvente acetonitrilo generando un grupo acetamida en la molécula, tal y como se recoge en el esquema siguiente.



Con el fin de evitar esta reacción secundaria que restaba rendimiento en la obtención de la naftohidroquinona buscada se cambió el disolvente de reacción durante la ruptura oxidativa de la cadena lateral, sustituyendo el acetonitrilo por acetona¹⁰⁶.

Así, cuando la naftohidroquinona **27** disuelta en acetona se trató con una disolución acuosa de H_5IO_6 y CrO_3 se obtuvo la naftohidroquinona **28** con excelente rendimiento (98 %).



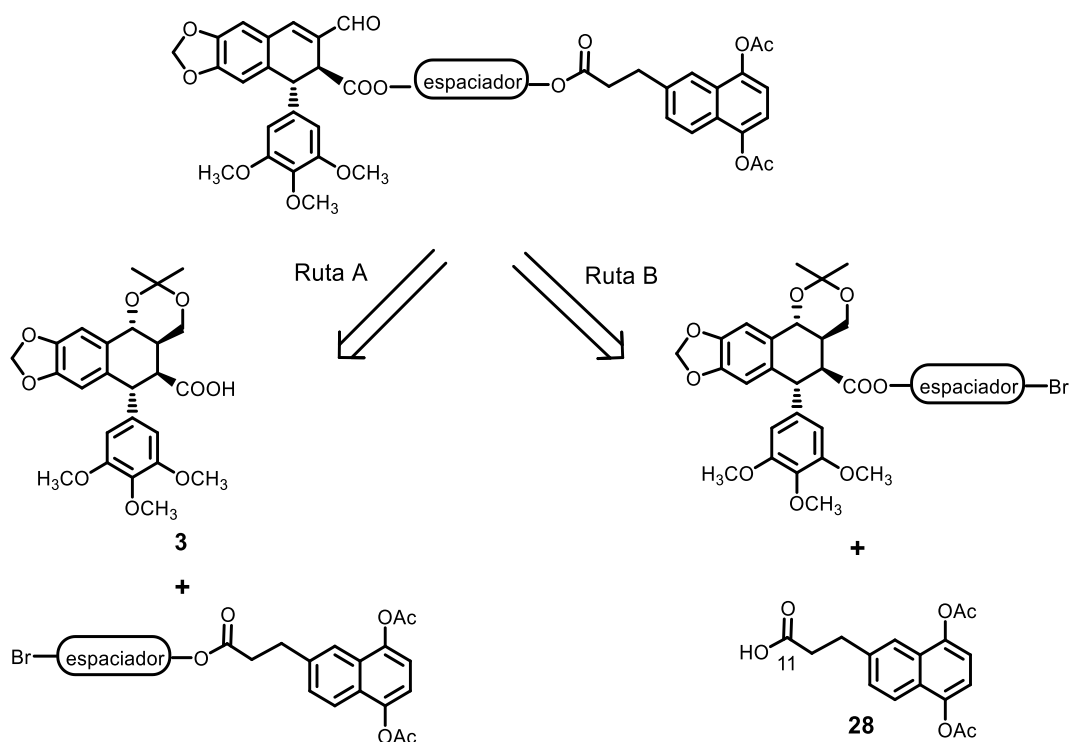
¹⁰⁶ Khatri, N.A.; Schmitthenner, H.F.; Shiringarpure, J; Weinreb, S.M. Synthesis of indolizidine alkaloids via intramolecular imino Diels-Alder reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6387-6393

3.2. Obtención de las lignohidroquinonas 42-44

3.2.1. Unión de los espaciadores a los precursores

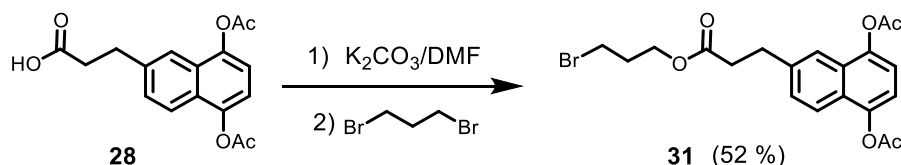
A partir del ciclolignano **3** y de la monoterpenilhidroquinona **28** ya se pueden obtener las lignohidroquinonas planteadas en los objetivos del trabajo. En este caso, en el que ambos precursores se han obtenido con buenos rendimientos (88 y 98 % respectivamente) se han planteado dos rutas sintéticas para la obtención de las lignohidroquinonas derivadas del aldehído podofílico dependiendo de que los espaciadores se unan primero a un precursor o al otro. Los espaciadores son los mismos que se utilizaron en la síntesis del grupo de lignohidroquinonas precedentes y las posibilidades son:

- Ruta A: Unión del espaciador al resto monoterpenilhidroquinónico y posterior condensación con el derivado ciclolignánico.
- Ruta B: Unión del espaciador al ciclolignano y, a continuación, condensación con el derivado monoterpenilhidroquinónico.

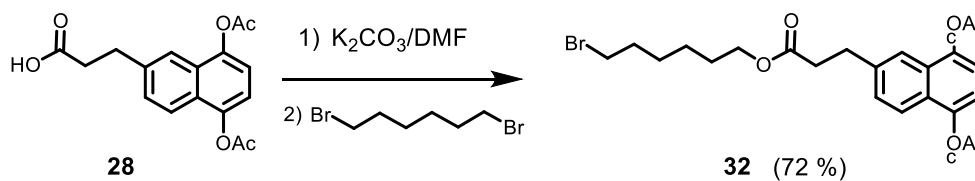


3.2.1.1. Ruta A: unión del espaciador al precursor monoterpenilhidroquinónico

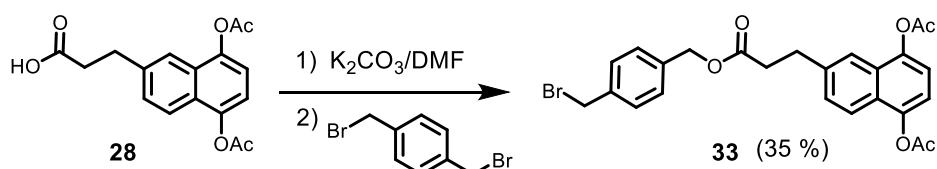
Para la obtención de las lignohidroquinonas por esta vía, se comenzó con la reacción de esterificación entre los espaciadores α,ω -dibromados y la naftohidroquinona **28** y, posteriormente, se realizó la condensación con el ciclolignano **3**. Por lo tanto y, en primer lugar, la naftohidroquinona **28** se hizo reaccionar en DMF con K_2CO_3 y 1,3-dibromopropano obteniendo el derivado bromado **31** (52 %).



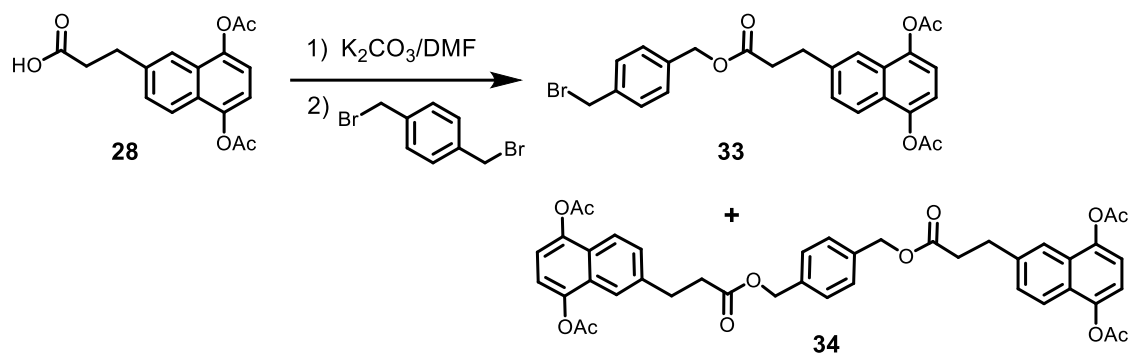
El tratamiento de la naftohidroquinona **28** con K_2CO_3 y 1,6-dibromohexano condujo al compuesto **32**, con buen rendimiento (76 %).



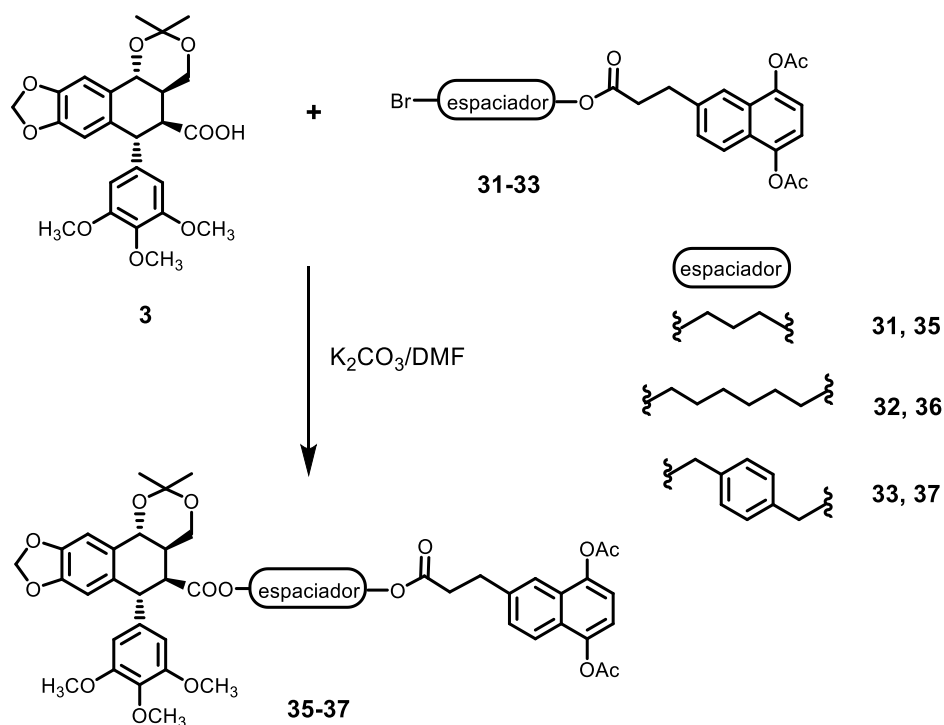
Para la obtención de compuesto **33**, se trató la naftohidroquinona **28** con K_2CO_3 en DMF con el derivado dibromado α,α' -dibromo-*p*-xileno obteniendo el derivado monoterpenilhidroquinónico deseado (35 %).



Con el fin de optimizar el rendimiento de la reacción, se modificaron el tiempo y la temperatura de reacción, no de manera significativa los rendimientos obteniendo en todos los casos una cierta cantidad de compuesto dimérico **34** formado por dos moléculas de la monoterpenilnaftohidroquinona **28** unidas por el espaciador que restaba rendimiento a la reacción principal.

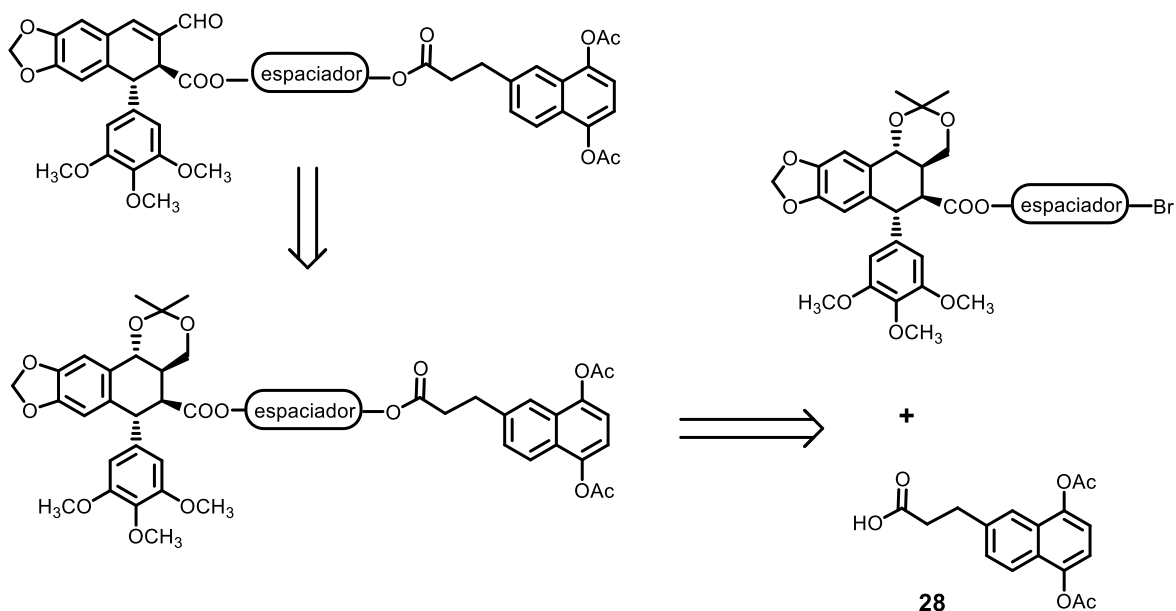


Una vez obtenidas las bromoalquil monoterpenilnaftohidroquinonas **31-33**, se hicieron reaccionar estos compuestos en las condiciones de esterificación utilizadas anteriormente con el derivado ciclolignánico **3**, obteniendo las lignoquinonas **35-37** con rendimientos variables (41-70 %).

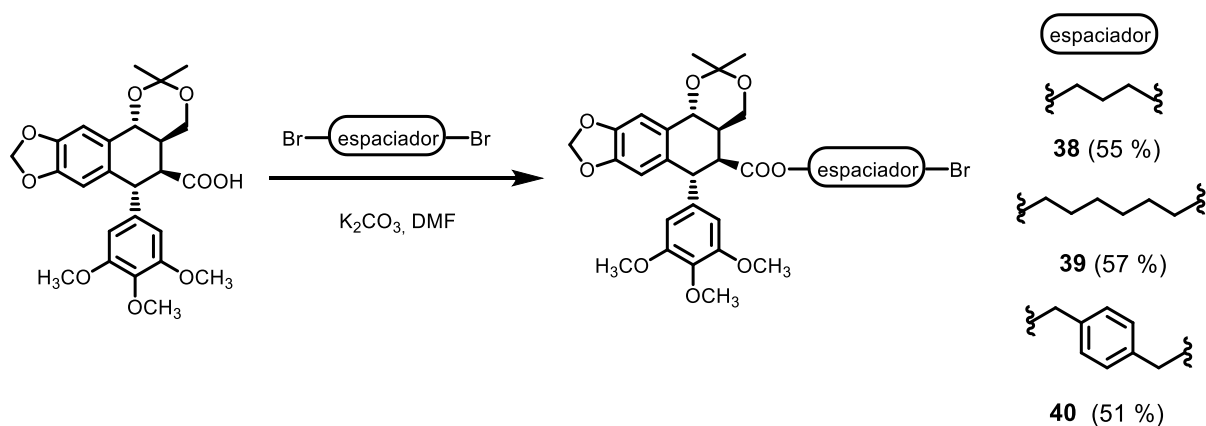


3.2.1.2. Ruta B: unión del espaciador al precursor ciclolignánico

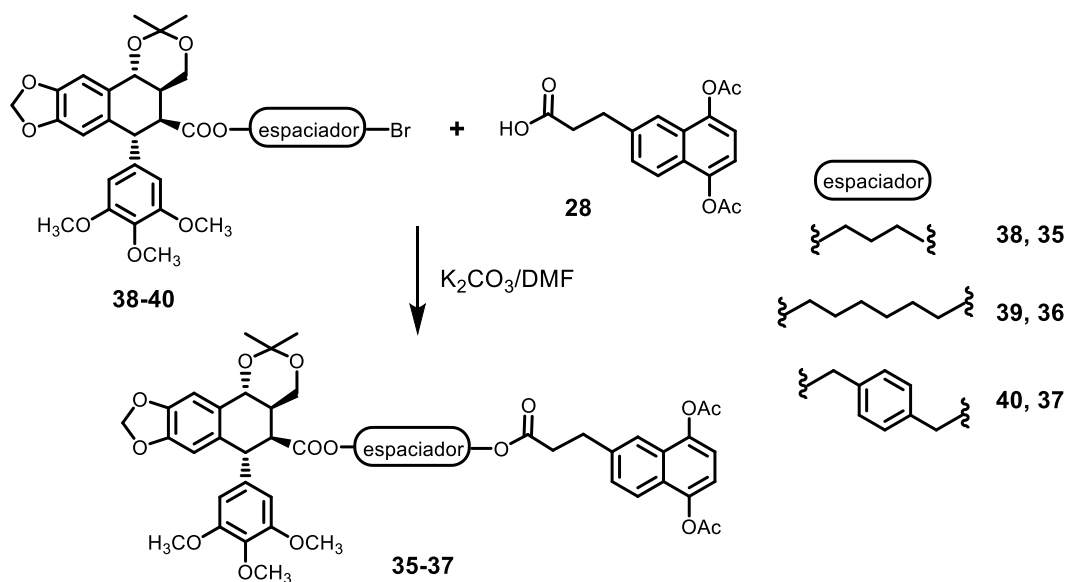
En este caso, se llevó a cabo en primer lugar la esterificación de los espaciadores dibromados con el derivado ciclolignánico **3**, y posteriormente se obtuvieron las lignohidroquinonas **35-37** por condensación con la naftohidroquinona **28**.



Así, cuando se hizo reaccionar el precursor ciclolignánico **3** en DMF y presencia de K_2CO_3 con los espaciadores utilizados hasta el momento, se obtuvieron los dihidroxiésteres **38-40** (51-57 %)

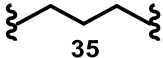
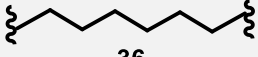
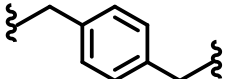


Cuando se hicieron reaccionar estos dihidroxiésteres con la monoterpenilhidroquinona **28** en las condiciones habituales de esterificación, se obtuvieron las lignohidroquinonas **35-37** (54-62 %) que coincidían espectroscópicamente con las obtenidas por la ruta A.



En la tabla siguiente se resumen los rendimientos totales desde el precursor monoterpenilhidroquinónico **28** en el caso de la ruta A y desde el precursor ciclolignánico **3** en la ruta B. Se pueden observar diferencias en función del espaciador utilizado, siendo mejor el resultado para la obtención de la lignohidroquinona **36** la ruta A y obteniéndose mejores resultados por la ruta B para las lignohidroquinona **35** y **37**.

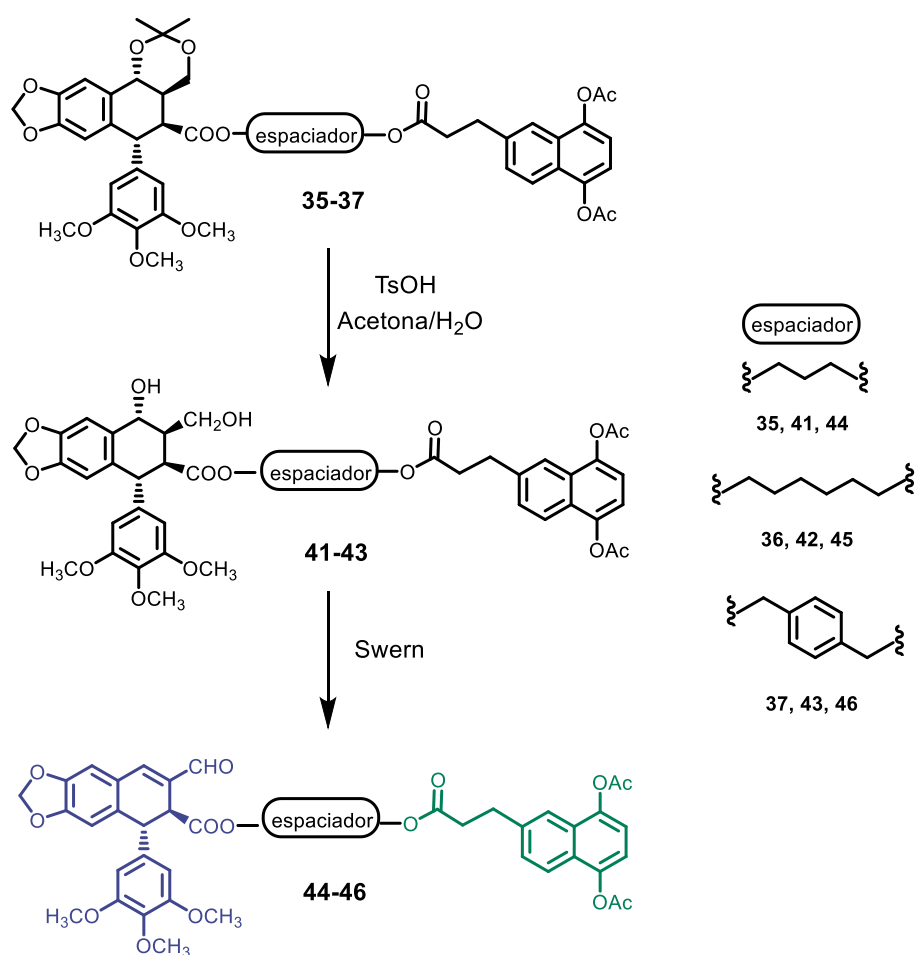
Tabla 4: Rendimientos de obtención de la lignohidroquinonas **35-37** mediante las dos rutas sintéticas planteadas.

Lignohidroquinona	Rendimiento ruta A	Rendimiento ruta B
 35	23 %	34 %
 36	50 %	27 %
 37	15 %	28 %

3.2.2. Obtención de los aldehídos híbridos.

Para finalizar con la obtención de esta nueva familia de híbridos, las lignohidroquinonas **35-37** se hicieron reaccionar con TsOH en una mezcla de acetona:H₂O, obteniéndose los dihidroxiésteres **41-43** correspondientes.

Por último, se obtuvieron las lignohidroquinonas **44-46** tras hacer reaccionar los dihidroxiésteres **41-43** en las condiciones de oxidación de Swern, observándose en los espectros de RMN de ¹H de los productos de reacción, como en los casos anteriores, las señales características de la agrupación aldehído α,β-insaturado.



3.3. Evaluación biológica

Este nuevo grupo de lignohidroquinonas, sintetizadas a partir de terpenilhidroquinonas derivadas de un monoterpenoide, también ha sido evaluada biológicamente con el fin de establecer relaciones de estructura-actividad en relación a los fragmentos que conforman el híbrido y los espaciadores usados para la síntesis.

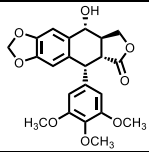
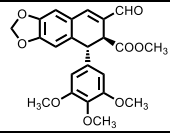
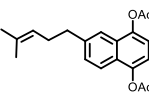
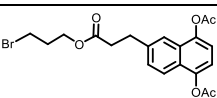
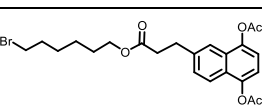
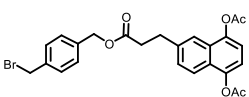
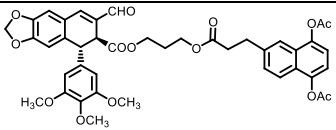
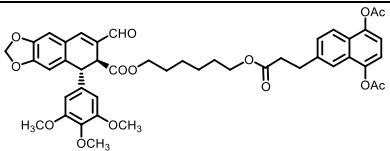
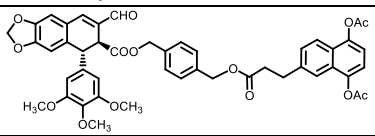
Como precursores ciclolignánicos se han mantenido los ensayos en el capítulo anterior, el ciclolignano natural podofilotoxina (**1**) y el aldehído podofílico (**5**), elegido como ciclolignano cabeza de serie para la síntesis de las lignohidroquinonas. En esta familia, la referencia para el fragmento monoterpenilhidroquinónico ha sido el compuesto **28**. De igual modo, se han realizado estudios de citotoxicidad sobre los compuestos intermedios y finales, así como ensayos de citometría de flujo.

3.3.1. Ensayos de citotoxicidad

Se han evaluado las lignohidroquinonas finales (**44-46**) junto con los compuestos intermedios (**31-33**), la monoterpenilnaftohidroquinona **26** mediante el ensayo del MTT, teniendo de referencia los valores ya obtenidos para los precursores ciclolignánicos **1** y **5**. Para ello, se prepararon diluciones de los compuestos desde 10 μM hasta 0,01 μM y se incubaron durante 72 h en las líneas MCF-7, MG-63 y HT-29.

En la tabla 5 se puede observar que todos los compuestos de esta familia de lignohidroquinonas derivadas de monoterpenos han resultado citotóxicos, en el rango de μM o inferior. El precursor monoterpenilhidroquinónico **26** ha resultado citotóxico en las dos líneas en las que ha sido ensayado, MCF-7 y HT-29, con valores de GI_{50} muy similares en ambas ($\text{GI}_{50} = 4,93 \mu\text{M}$ y $4,33 \mu\text{M}$ respectivamente).

Tabla 5: Citotoxicidad (GI_{50} , $\mu\text{M} \pm \text{D.E.}$) de las lignohidroquinonas derivadas de monoterpenos y sus precursores evaluados con MTT tras 72 h de incubación.

Compuesto	MCF-7	MG-63	HT-29
	1 0,028 \pm 0,003	0,007 \pm 0,005	0,066 \pm 0,002
	5 0,48 \pm 0,03	0,06 \pm 0,02	0,028 \pm 0,006
	26 4,93 \pm 0,76	-	4,33 \pm 1,73
	31 1,82 \pm 0,18	-	0,26 \pm 0,07
	32 0,55 \pm 0,35	0,87 \pm 0,13	0,88 \pm 0,41
	33 4,45 \pm 3,68	-	2,90 \pm 0,84
	44 2,33 \pm 0,78	2,26 \pm 0,88	0,83 \pm 0,25
	45 2,34 \pm 0,25	0,26 \pm 0,08	0,65 \pm 0,02
	46 1,78 \pm 0,20	0,29 \pm 0,17	0,041 \pm 0,005

En cuanto a los intermedios bromados **31-33**, el compuesto **32** presentó valores de citotoxicidad similares en el rango de sub- μM para las tres líneas ensayadas, sin mostrar selectividad en ninguna de ellas. Por otro lado, los compuestos **31** y **33** fueron algo más potentes en la línea HT-29 que en la línea MCF-7.

En cuanto a los nuevos híbridos lignohidroquinónicos **44-46** se han podido sacar algunas conclusiones más interesantes. Se puede decir que la línea MCF-7 fue la menos

sensible a los híbridos de las tres que fueron ensayadas. Como se puede ver en la tabla 5, los valores de GI_{50} frente a MCF-7, similares para los tres compuestos ($GI_{50} = 1,78 - 2,34 \mu M$), fueron superiores a los obtenidos para cada compuesto en las otras líneas. La línea MG-63 resultó más sensible a estas lignohidroquinonas, en particular a los híbridos **45** y **46**, que fueron 10 veces más potentes que el híbrido **44** que presenta el espaciador más corto (0,26 y 0,29 vs 2,26 μM). Aún más sensible se puede considerar la línea HT-29. Si bien las lignohidroquinonas con espaciadores alifáticos **44** y **45** presentaron valores de GI_{50} por debajo de μM ($GI_{50} = 0,83 \mu M$ y $0,65 \mu M$ respectivamente) con una ligera selectividad frente a esta línea, es con el híbrido **46**, que presenta el espaciador aromático, con el que se obtienen los resultados más interesantes. El valor de GI_{50} de **46** frente a HT-29 fue mucho mejor que el obtenido para la lignohidroquinona **26** y del mismo orden que el obtenido por el precursor ciclolignánico aldehído podofílico **5**, pero con una selectividad mayor frente a las otras líneas ensayadas.

Por lo tanto, se puede decir que el compuesto **46** no solo mantiene la citotoxicidad frente a HT-29 sino que mejora su selectividad frente a esta línea, característica que no se observó en los híbridos derivados de diterpenoides.

3.3.2. Evaluación del ciclo celular por citometría de flujo

Esta nueva familia de lignohidroquinonas también ha sido ensayada mediante citometría de flujo con el fin de obtener más información sobre el mecanismo de acción de los nuevos híbridos sintetizados. Las monoterpenilhidroquinonas por sí solas también han sido objeto de estudio por el grupo en numerosos trabajos en los que se ha demostrado su citotoxicidad.^{85,86,87,88}

Con estos ensayos de evaluación del ciclo celular se va a poder conocer algo más acerca del comportamiento de las monoterpenilhidroquinonas y observar su influencia en los nuevos híbridos sintetizados como se ha visto en las lignohidroquinonas derivadas de diterpenoides.

3.3.2.1. Efecto de los compuestos sobre la viabilidad celular

Las lignohidroquinonas derivadas de monoterpenos **44-46** junto con la monoterpenilhidroquinona **26** se incubaron en las mismas líneas MCF-7, MG-63 y HT-29, determinando mediante citometría de flujo la citotoxicidad a las 24 h. Los resultados también se compararon con los precursores ciclolignánicos **1** y **5** previamente ensayados como referencia. En la tabla siguiente se recogen los resultados expresados en GI₅₀ a las 24 h.

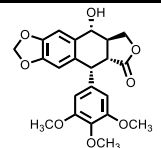
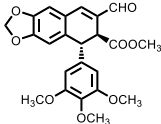
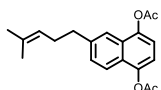
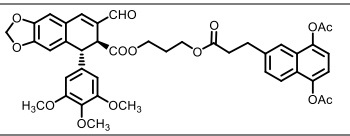
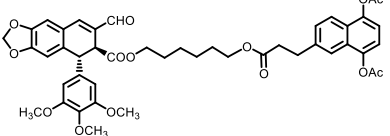
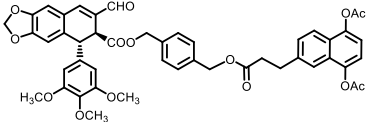
⁸⁵ Miguel del Corral, J. M.; Gordaliza, M.; Castro, M. A.; Mahiques, M. M.; San Feliciano, A.; Garcia-Gravalos, M. D. Further antineoplastic terpenylquinones and terpenylhydroquinones. *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 31-41.

⁸⁶ Miguel del Corral, J. M.; Castro, M. A.; Gordaliza, M.; Martin, M. L.; Gualberto, S. A.; Gamito, A. M.; Cuevas, C.; San Feliciano, A. Synthesis and cytotoxicity of new aminoterpenylquinones. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 631-644.

⁸⁷ Miguel del Corral, J. M.; Castro, M. A.; Oliveira, A. B.; Gualberto, S. A.; Cuevas, C.; San Feliciano, A. New cytotoxic furoquinones obtained from terpenyl-1,4-naphthoquinones and 1,4-anthracenediones. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 7231-7240.

⁸⁸ Miguel del Corral, J. M.; Castro, M. A.; Gordaliza, M.; Martin, M. L.; Gamito, A. M.; Cuevas, C.; Feliciano, A. S. Synthesis and cytotoxicity of new heterocyclic terpenyl-naphthoquinones. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 2816-2827.

Tabla 6: Citotoxicidad de los compuestos evaluados a las 24 h de incubación (GI_{50} , $\mu M \pm D.E.$).

Compuesto	MCF-7	MG-63	HT-29	
	1	>100	18,3 \pm 1,4	>100
	5	>100	1,23 \pm 0,06	>100
	26	8,23 \pm 0,05	1,11 \pm 0,18	8,51 \pm 0,01
	44	1,38 \pm 0,14	2,8 \pm 0,06	4,77 \pm 0,20
	45	8,81 \pm 0,21	2,7 \pm 0,04	4,16 \pm 0,15
	46	13,09 \pm 0,04	0,75 \pm 0,12	4,12 \pm 0,05

De los resultados recogidos en la tabla se puede deducir que la mayoría de los compuestos híbridos de esta familia son más activos que sus precursores en el tiempo de incubación del ensayo. La monoterpenilhidroquinona **26** ensayada como referencia ha obtenido unos valores del orden de μM ($GI_{50} = 1,11 - 8,51 \mu M$), similares a los obtenidos a las 72 h de incubación, poniendo de manifiesto el mecanismo citotóxico temprano de este tipo de compuestos y dando una idea del papel que pueden jugar en los híbridos finales sintetizados.

Si bien los precursores habían resultado inactivos a ese tiempo de incubación en las líneas MCF-7 y HT-29, se han llegado a alcanzar valores de μM en la mayoría de las lignohidroquinonas de este grupo, presentando incluso valores por debajo de este orden en la lignohidroquinona **46** frente a la línea MG-63 ($GI_{50} = 0,75 \mu M$), la más sensible a este tiempo de incubación.

A diferencia de lo que ocurría con la familia de híbridos derivados de diterpenilnaftohidroquinonas, a tiempos cortos de incubación sí se manifiesta el efecto citotóxico en las tres líneas ensayadas con valores de GI_{50} dentro de un rango similar. A diferencia de lo que ocurría anteriormente, al realizar la representación de la viabilidad celular (%) frente a las concentraciones ensayadas (0,01 μ M - 10 μ M), las lignohidroquinonas de esta familia presentan un comportamiento bastante similar entre sí a las 24 h, aunque de nuevo se puede comprobar cómo la línea MG-63 ha resultado la más sensible, hecho que también ocurría en los ciclolignanos **1** y **5**, y en la monoterpenilnaftohidroquinona **26**, precursores de esta familia de lignohidroquinonas.

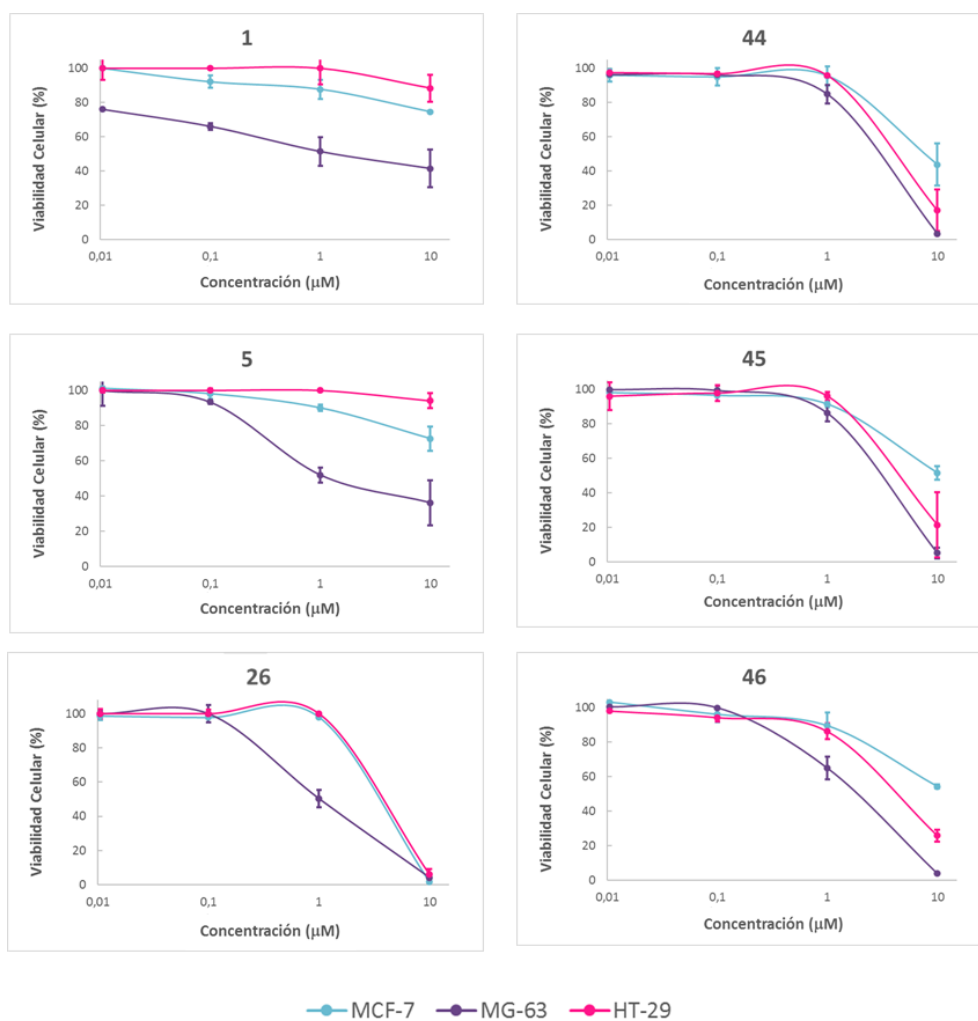


Figura 43: Efecto sobre la viabilidad celular de los precursores ciclolignánicos **1** y **5**, del precursor monoterpenilhidroquinónico **26** y de las lignohidroquinonas **44-46** a las 24 h.

3.3.3.2. Análisis de apoptosis

Se ha evaluado la capacidad para inducir apoptosis de las tres lignohidroquinonas **44-46** junto con su precursor monoterpenilhidroquinónico **26** y con los precursores ciclolignánicos **1** y **5**. De los resultados obtenidos del estudio de las células viables (anexina -) y las apoptóticas (anexina +) se han obtenido las siguientes conclusiones en función de la línea celular tratada con los compuestos.

En la línea MCF-7, las nuevas lignohidroquinonas duda lugar a valores para la respuesta apoptótica similares al control y al precursor monoterpenilhidroquinónico **26**, no llegando a alcanzar ni siquiera los valores obtenidos por los ciclolignanos **1** y **5**.

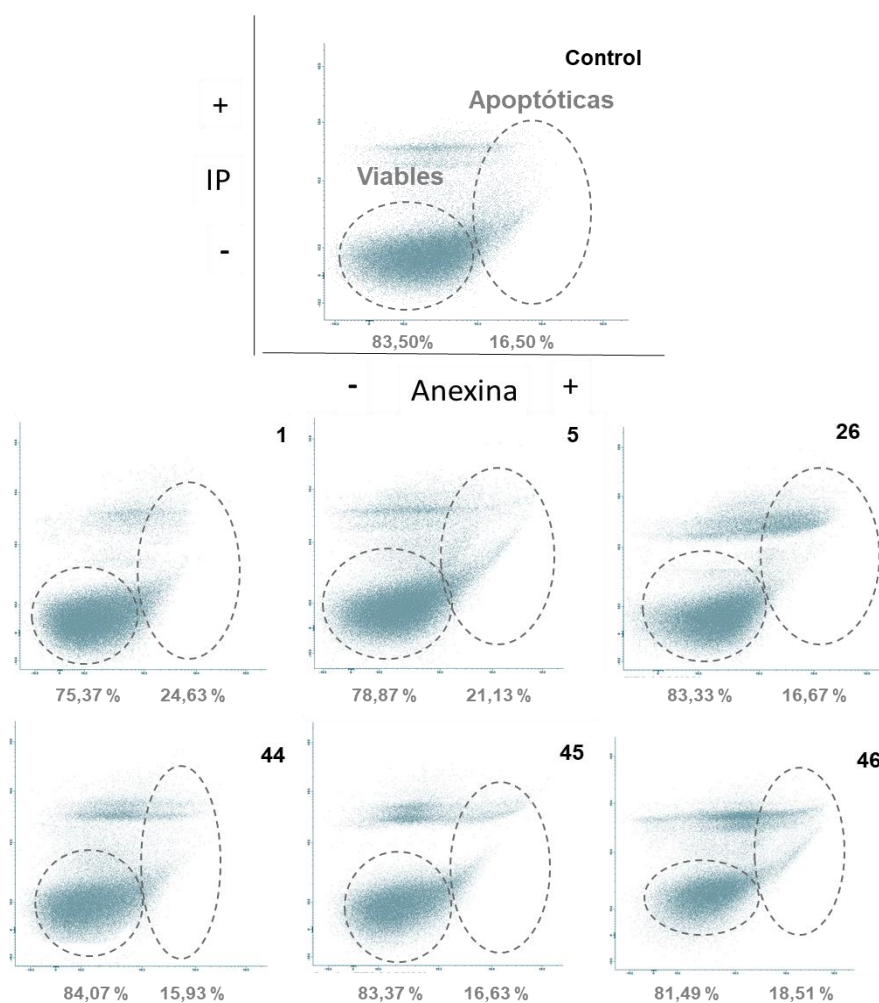


Figura 44. Efecto de los precursores ciclolignánicos **1** y **5**, del precursor monoterpenilhidroquinónico **26** y de los híbridos finales **44-46** a una concentración de 1 μ M durante 24 h en la apoptosis de la línea celular MCF-7.

En el caso de la línea MG-63, se repite el comportamiento de las lignohidroquinonas **44-46**, obteniendo en este caso una respuesta apoptótica mayor a la del control, pero sin alcanzar los valores de los precursores ciclolignánicos. En este caso llaman la atención los valores mostrados por el precursor monoterpenilhidroquinónico **26**, siendo este compuesto el que mejor resultado se ha obtenido en estos ensayos.

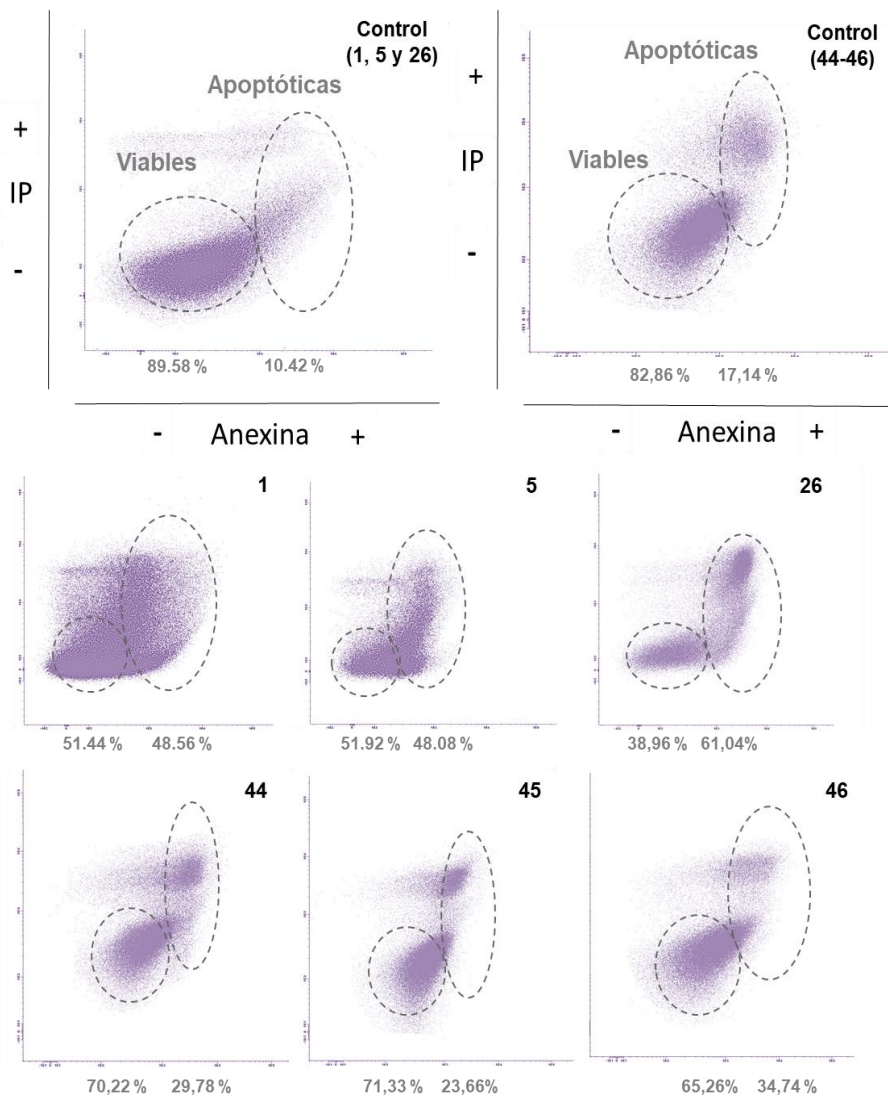


Figura 45. Efecto de los precursores ciclolignánicos (**1** y **5**), el precursor monoterpenilhidroquinónico **26** y los híbridos finales (**44-46**) en la apoptosis de la línea celular MG-63 tras el tratamiento con los compuestos en una concentración de 1 μ M durante 24 h.

Por último, el tratamiento de la línea HT-29 dio lugar a resultados muy interesantes. Siguiendo con la tendencia de esta familia de híbridos, los niveles alcanzados de células apoptóticas por el precursor monoterpilquinónico **26** y por las lignohidroquinonas **44-46** no fueron muy elevados, siendo más bajos que los precursores ciclolignánicos en los compuestos **44** y **45** y algo más altos para la lignohidroquinona **46**. Si bien estos valores ni son altos, sí que suponen un aumento de la apoptosis en comparación con las células control (5,30 %) de la misma forma que se había observado en las lignohidroquinonas derivadas de diterpenoides.

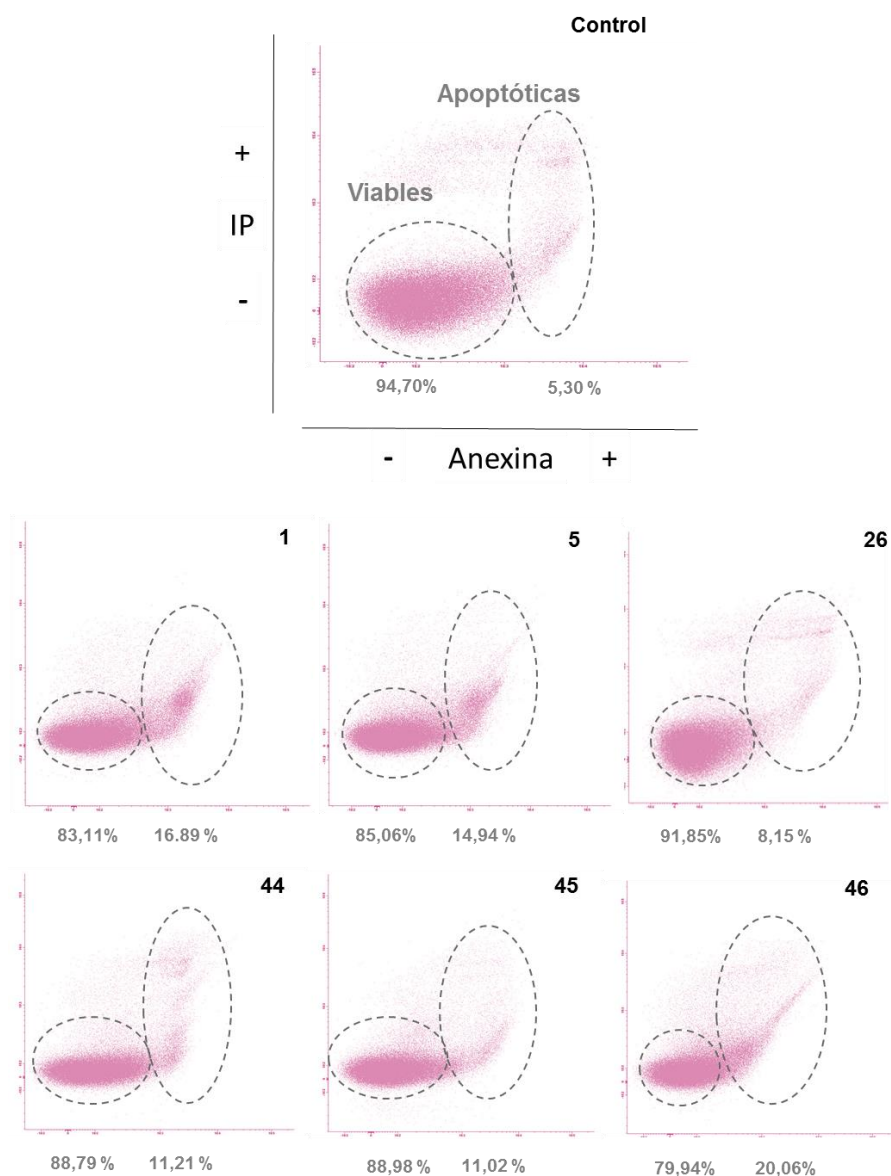


Figura 46. Efecto de los precursores ciclolignánicos (**1** y **5**), el precursor monoterpilhidroquinónico **26** y los híbridos finales (**44-46**) en la apoptosis de la línea celular HT-29 tras el tratamiento con los compuestos en una concentración de 1 μ M durante 24 h.

En las siguientes figuras (47-49) se recogen los valores de apoptosis temprana (IP-) y de apoptosis tardía (IP+) representados en función de las células apoptóticas totales. Del análisis de las proporciones de IP-/IP+ se ha podido llegar a conclusiones muy interesantes sobre el comportamiento de esta familia de lignohidroquinonas teniendo de referencia los precursores ciclolignánicos **1** y **5** ya descritos antes en este trabajo, donde la proporción de IP-/IP+ está más favorecida hacia el IP- como se puso de manifiesto en el apartado anterior de evaluación biológica.

En la línea MCF-7, se puede observar el marcado efecto del precursor monoterpenilquinónico **26**, lo que concuerda con el perfil que se espera con este tipo de compuestos, como ya ocurría con el precursor diterpenilhidroquinónico de la familia anterior. En este caso, donde la respuesta apoptótica de las lignohidroquinonas **44-46** no ha sido muy elevada, se puede observar que presentan una proporción IP-/IP+ que se encuentra alrededor del 1:1 lo que indica que el efecto del fragmento ciclolignánico no influye tanto en estos compuestos.

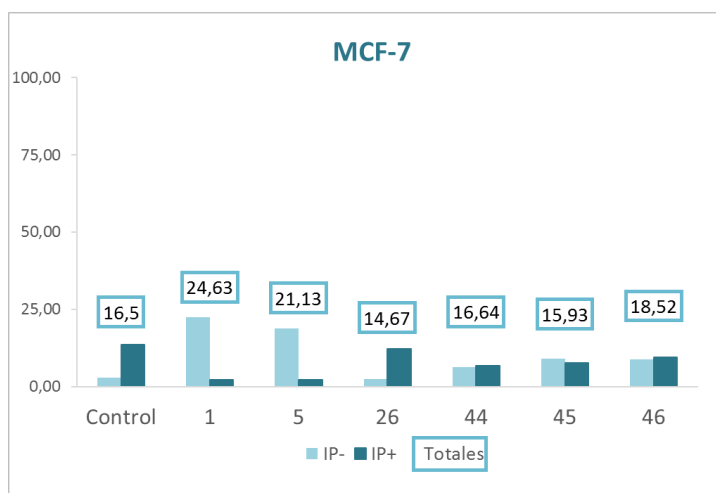


Figura 47: Porcentaje de IP total (en recuadro) y proporciones de IP-/IP+ obtenidas por citometría de flujo en las células MCF-7 tras el tratamiento con los compuestos **1**, **5**, **26** y **44-46** a una concentración de 1 μM durante 24 h.

Por su parte, la línea MG-63 que había presentado los resultados más altos de células apoptóticas a las 24 h de incubación, ha mostrado diferente comportamiento frente a los compuestos ensayados. De nuevo, el precursor **26** mantiene la proporción IP-/IP+ que concuerda con su efecto necrotizante, con una mayor proporción de apoptosis tardía (IP+). Al observar las lignohidroquinonas sintetizadas, se puede ver cómo aquellas que llevan espaciadores alifáticos (**44** y **45**) han mostrado una mayor proporción de IP-, siendo

mucho más destacado en la lignohidroquinona **44** con el espaciador alifático más corto. Por otro lado, la lignohidroquinona **46**, que había presentado el mayor % de células apoptóticas en esta línea celular, muestra un patrón de IP-/IP+ que se asemeja más al efecto del precursor monoterpenilhidroquinónico, por lo que parece que su actividad citotóxica puede venir mediada más por ese fragmento del híbrido que por el fragmento ciclolignánico.

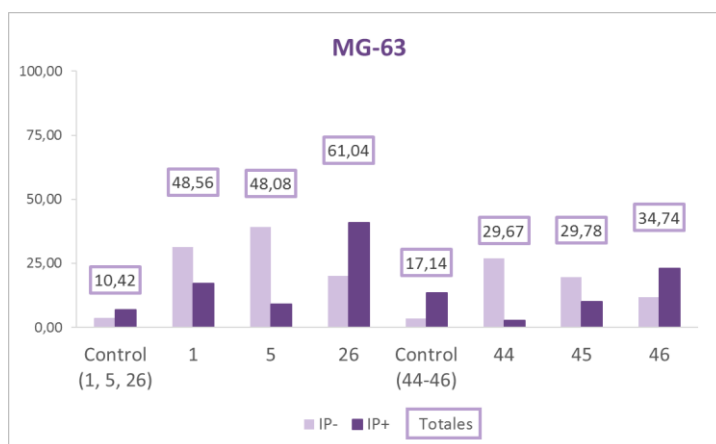


Figura 48: Porcentaje de IP total (en recuadro) y proporciones de IP-/IP+ obtenidas por citometría de flujo en las células MG-63 tras el tratamiento con los compuestos **1**, **5**, **26** y **44-46** a una concentración de 1 μM durante 24 h.

El tratamiento de la línea HT-29 con los nuevos compuestos también dejó conclusiones interesantes sobre el comportamiento de esta familia, observándose que en todos los híbridos predomina el efecto del ciclolignano con una mayor proporción de IP.

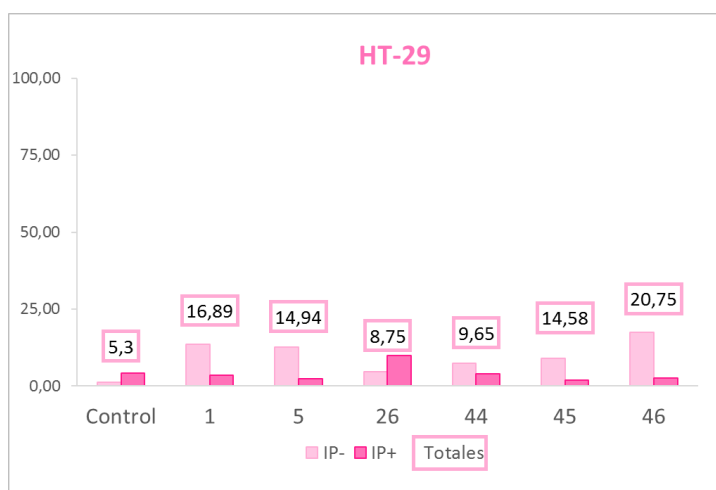


Figura 49: Porcentaje de IP total (en recuadro) y proporciones de IP-/IP+ obtenidas por citometría de flujo en las células HT-29 tras el tratamiento con los compuestos **1**, **5**, **26** y **44-46** a una concentración de 1 μM durante 24 h.

3.3.2.3. Análisis del ciclo celular.

Una vez analizados los porcentajes de células apoptóticas, se estudió el comportamiento de las lignohidroquinonas **44-46** junto con el precursor monoterpilhidroquinónico **26** en una concentración de 1 μ M en el ensayo que permite observar cómo afectan estos compuestos al funcionamiento del ciclo celular, cuantificando la cantidad de ADN presente en las células mediante citometría de flujo. Como referencia se han tenido en cuenta los resultados analizados de los precursores **1** y **5**.

Cuando se ensayaron los compuestos de esta familia en la línea MCF-7, solo se obtuvo actividad de bloqueo en G2/M, indicativo de la inhibición de la polimerización de tubulina en la lignohidroquinona **46** que presenta en su estructura el espaciador aromático.

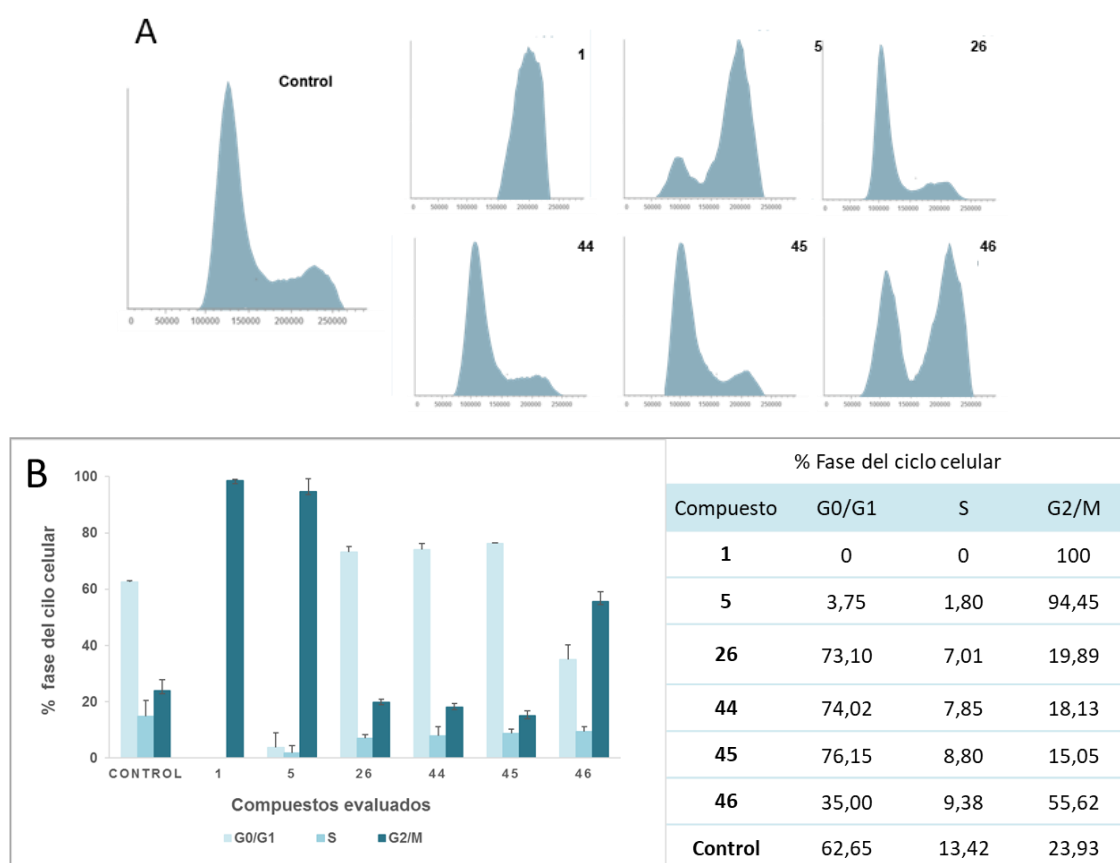


Figura 50: Efecto de los precursores ciclolignánicos **1** y **5**, del precursor monoterpilhidroquinónico **26** y de los híbridos finales **44-46** sobre el ciclo celular determinado por citometría de flujo en la línea MCF-7. Las células se incubaron con los compuestos señalados a una concentración de 1 μ M. (A): contenido de ADN analizado por citometría de flujo. (B): porcentaje de células en cada fase del ciclo celular (G0/G, S y G2/M).

Sin embargo, el bloqueo solamente fue parcial, sin llegar al bloqueo total del producto natural podofilotoxina (**1**) o al nivel de bloqueo del aldehído podofílico (**5**). Tanto el precursor **26** como las otras dos lignohidroquinonas **44** y **45** presentan un perfil similar al de las células de MCF-7 sin tratar (figura 50).

En la línea MG-63 ocurre algo similar con los nuevos compuestos sintetizados. El precursor monoterpenilhidroquinónico **26** así como las lignohidroquinonas con espaciador alifático **44** y **45** no presentan bloqueo en la fase G2/M del ciclo celular. Sólo la lignohidroquinona con el espaciador aromático **46** presenta un bloqueo en estas fases, pero mucho menos destacable que el que presentan los precursores ciclolignánicos de referencia (**1** y **5**).

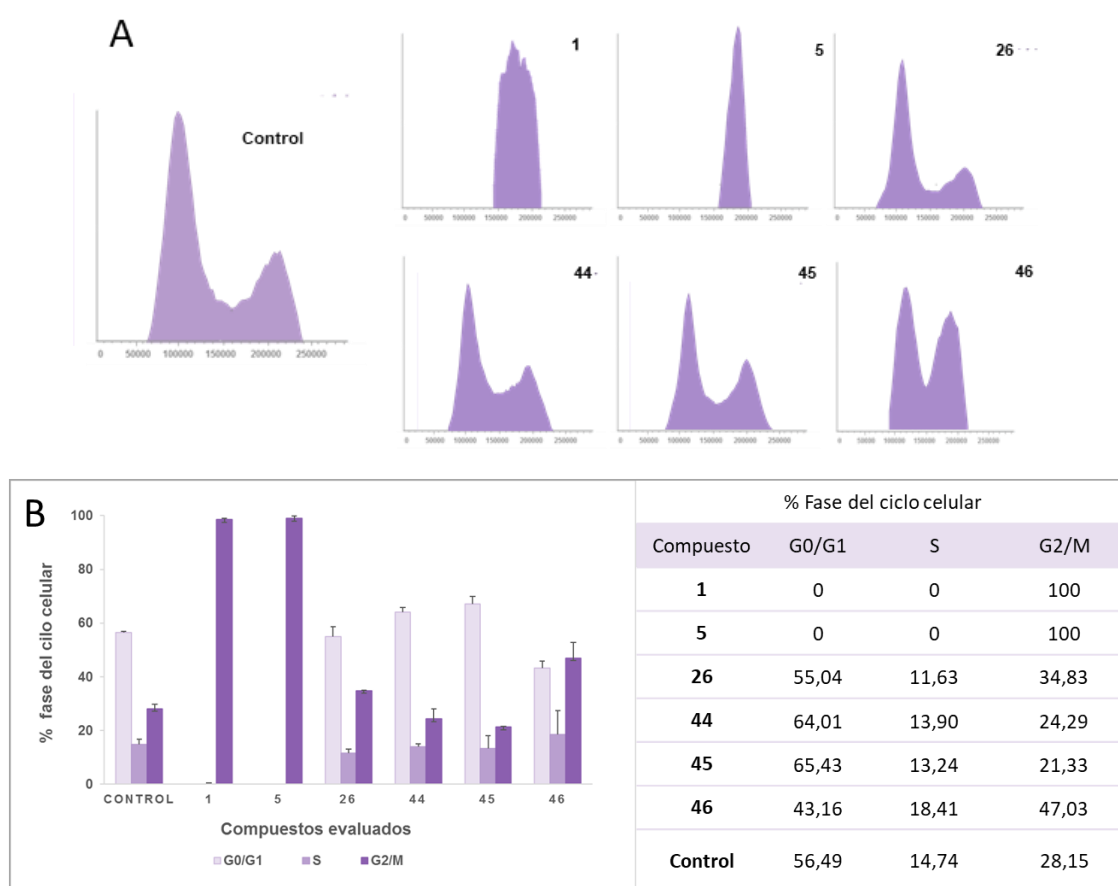


Figura 51: Efecto de los precursores ciclolignánicos **1** y **5**, del precursor monoterpenilhidroquinónico **26** y de los híbridos finales **44-46** sobre el ciclo celular determinado por citometría de flujo en la línea MG-63. Las células se incubaron con los compuestos señalados a una concentración de 1 μ M. (A): contenido de ADN analizado por citometría de flujo. (B): porcentaje de células en cada fase del ciclo celular (G0/G, S y G2/M).

Fue en la línea HT-29 donde se obtuvo el mejor resultado de esta familia de lignohidroquinonas. El perfil del control, donde no existe bloque de las fases G2/M del ciclo se repite casi sin alteraciones en el precursor **26** así como en la lignohidroquinona **45**. En el caso de la lignohidroquinona **44** se pudo observar un leve aumento de las células en esas fases sin llegar a superar el 50 % del bloqueo. Cómo ha ocurrido en las otras líneas, la lignohidroquinona **46** presentó la mayor proporción de bloqueo en las fases G2/M alcanzando casi un bloqueo total, como ocurre con los precursores ciclolignánicos.

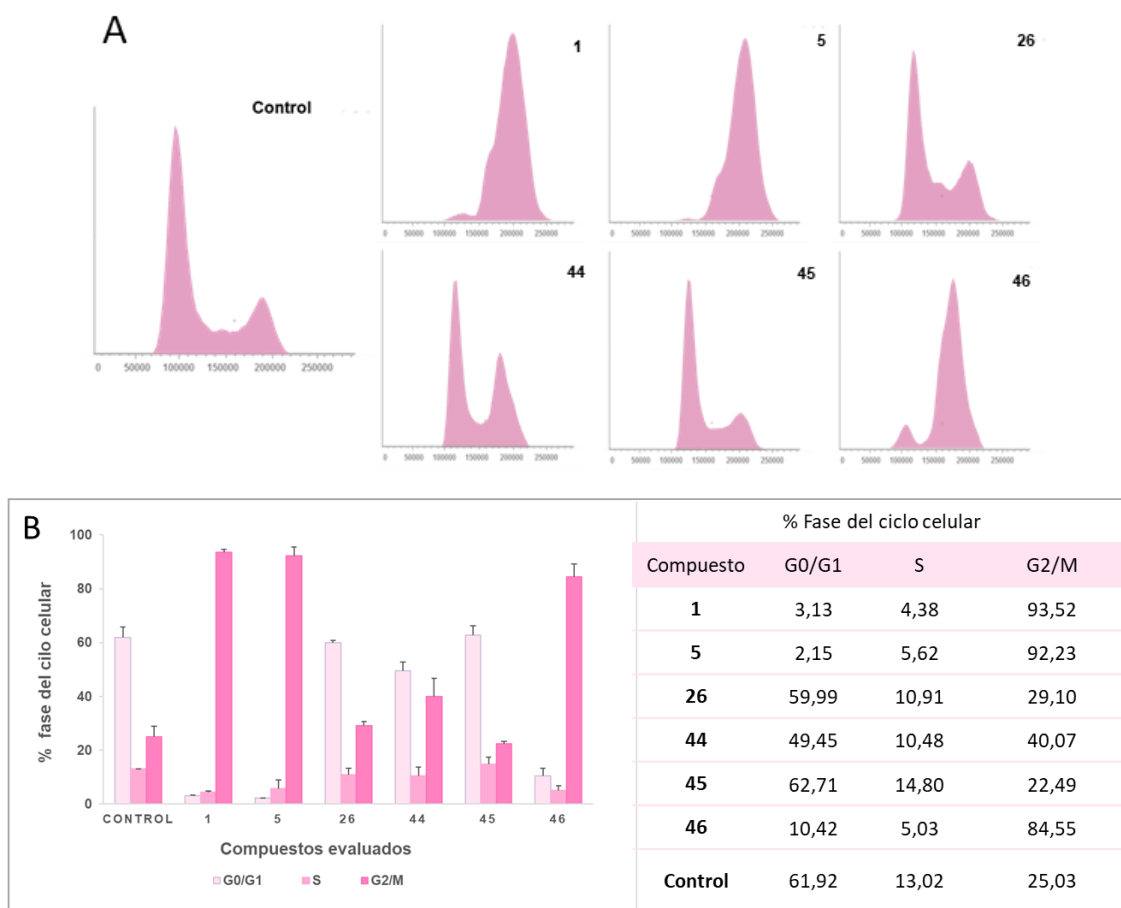


Figura 52: Efecto de los precursores ciclolignánicos **1** y **5**, del precursor monoterpilhidroquinónico **26** y de los híbridos finales **44-46** sobre el ciclo celular determinado por citometría de flujo en la línea HT-29. Las células se incubaron con los compuestos señalados a una concentración de 1 μ M. (A): contenido de ADN analizado por citometría de flujo. (B): porcentaje de células en cada fase del ciclo celular (G0/G, S y G2/M).

Para concluir con este apartado de evaluación biológica de lignohidroquinonas derivadas de monoterpenoides, se puede decir que el compuesto más activo y con resultados más destacables es el híbrido final **46**, que presenta nuevamente en su estructura un espaciador de tipo aromático para unir ambos fragmentos precursores. Los ensayos de citotoxicidad dieron como resultado un valor de GI_{50} con un valor sub- μ M en la línea HT-29 ($GI_{50} = 0,041 \mu\text{M}$) que es similar al valor del aldehído podofílico (**5**) en esa línea celular ($GI_{50} = 0,029 \mu\text{M}$) y que, además, presenta selectividad en relación con las otras dos líneas celulares ensayadas, siendo 7 veces más potente que en MG-63 y 43 veces más potente que en MCF-7, la línea menos sensible para este compuesto de las ensayadas.

Los ensayos de apoptosis, mostraron el valor más elevado para la lignohidroquinona **46** en la línea MG-63 sin embargo, se puede destacar por el análisis de los perfiles PI-/PI+ pusieron de manifiesto que la actividad apoptótica en la línea HT-29 sí parece estar más relacionada con la actividad del fragmento ciclolignánico por la presencia de más células en apoptosis temprana (mayor proporción de IP-), no siendo así para la línea MG-63 que presentó mayor número de células en apoptosis tardía (mayor proporción de IP+). El análisis del ciclo celular ha determinado que el bloqueo en las fases G2/M de la lignohidroquinona **46** en HT-29 es casi del 100 %, al igual que el precursor ciclolignánico **5**, confirmando de nuevo la selectividad de este compuesto por esta línea celular, ya que, en las demás líneas celulares ensayadas, el bloqueo no ha sido tan intenso como en la línea HT-29.

3.4. Comparación de los resultados de actividad de las lignohidroquinonas

El análisis comparativo de las nuevas lignohidroquinonas derivadas tanto de diterpenilhidroquinonas como de monoterpenilhidroquinonas en las tres líneas celulares ensayadas ha dejado conclusiones muy interesantes en cuanto a los mecanismos de citotoxicidad y de su influencia sobre el ciclo celular.

Comenzando con el análisis conjunto de las dos familias de lignohidroquinonas presentadas en este trabajo, se han analizado los resultados de citotoxicidad a las 24 h y 72 h de los precursores ciclolignánicos **1** y **5**, y de las lignohidroquinonas finales derivadas de diterpenoides (**22-24**) y derivadas de monoterpenoides (**44-46**). En la siguiente figura se pueden apreciar los porcentajes de compuestos con los valores de GI₅₀ agrupados por los rangos obtenidos en μM como se indica en la figura siguiente.

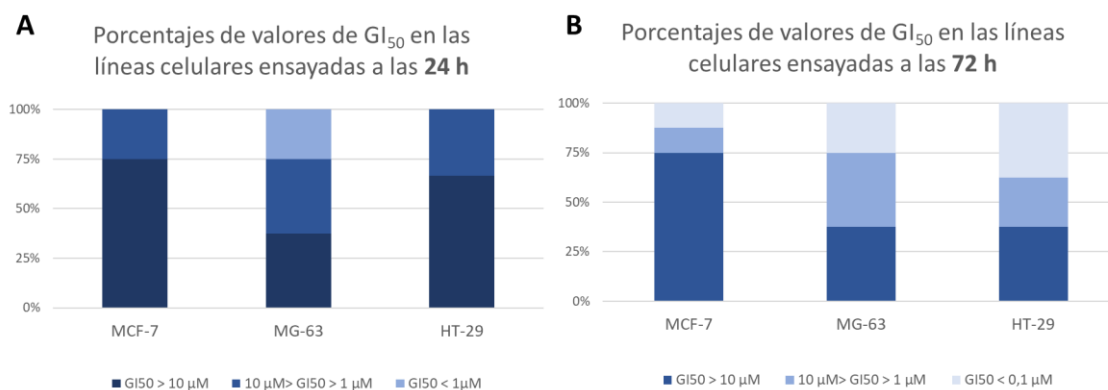


Figura 53: Comparación de los resultados de GI₅₀ obtenidos para los precursores ciclolignánicos 1 y 5, y de las lignohidroquinonas finales a las 24 h (A) y a las 72 h (B).

En general, se puede observar en las gráficas que, tanto a las 24 h como a las 72 h, la línea MCF-7 es la menos sensible a los compuestos de estas familias de híbridos. Por otro lado, a las 24 h la línea más sensible ha sido MG-63, siendo la única que a ese tiempo ha presentado valores de sub- μM . En cambio, a las 72 h, la que mejores resultados presenta es HT-29, donde se han obtenido un número mayor de valores por debajo de 0,1 μM .

Teniendo en cuenta la naturaleza del espaciador, alifático o aromático, que se ha empleado en la síntesis para unir los dos fragmentos del híbrido, también se pueden sacar algunas conclusiones sobre la relación estructura-actividad de las familias de

lignohidroquinonas. En la siguiente figura se recogen los datos de GI₅₀ en función del espaciador presente en el híbrido final.

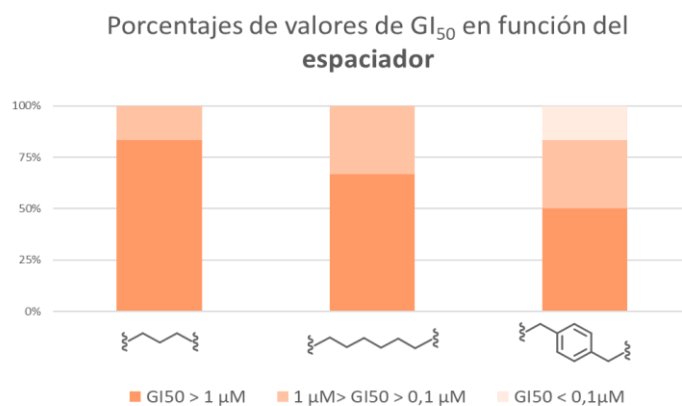


Figura 54: Resultados de GI₅₀ de los híbridos finales en función del espaciador utilizado.

Las lignohidroquinonas que presentan el espaciador alifático más corto son aquellas que han resultado de manera general menos activas en los ensayos de citotoxicidad, al contrario de lo que ocurre con aquellas que presentan el espaciador aromático, que han presentado los mejores resultados. Este hecho está en concordancia con los resultados anteriores presentados por el grupo. En la familia de la lignopurinas, los mejores resultados también se obtuvieron cuando los fragmentos del híbrido estaban unidos por un espaciador aromático.⁸⁰

Tras el estudio de las dos familias de lignohidroquinonas, se ha decidido profundizar algo más en la actividad de aquellos compuestos que presentaron mejores resultados y al mismo tiempo, poder comprender mejor la diferencia de citotoxicidad entre los tiempos cortos y largos de incubación. Por este motivo se han elegido las lignohidroquinonas **24** y **46** para realizar más ensayos, siempre teniendo como referencia a los precursores, el producto natural podofilotoxina (**1**) y el cabeza de serie, aldehído podofílico (**5**).

⁸⁰ Castro, M. A.; Miguel Del Corral, J. M.; Garcia, P. A.; Rojo, M. V.; Bento, A. C.; Mollinedo, F.; Francesch, A. M.; San Feliciano, A. Lignopurines: A new family of hybrids between cyclolignans and purines. Synthesis and biological evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *58*, 377-389.

Uno de los aspectos que llama especialmente la atención es la diferencia de citotoxicidad que han mostrado los precursores podofilotoxina (**1**) y aldehído podofílico (**5**) en la línea celular HT-29 entre los dos tiempos de incubación mostrados (24 y 72 h).

Particularmente llama la atención que a las 24 h aún no se haya detectado mortalidad celular para ambos ciclolignanos. También ha resultado interesante que en la línea MG-63, la otra línea donde los compuestos han resultado bastante activos, esa diferencia en los valores de GI₅₀ no llama tanto la atención al detectarse citotoxicidad ya a las 24 h.

Tabla 7: Comparación de las GI₅₀ de los precursores ciclolignánicos en las líneas HT-29 y MG-63 en los dos tiempos de incubación ensayados.

Compuesto	GI ₅₀ HT-29 (μM)		GI ₅₀ MG-63 (μM)	
	24 h	72 h	24 h	72 h
1	>100	0,066 ± 0,002	18,3 ± 1,4	0,007 ± 0,005
5	>100	0,029 ± 0,006	1,23 ± 0,06	0,06 ± 0,02

Este tipo de comportamiento parece que también está presente en las nuevas lignohidroquinonas **24** y **46**, aunque a la vista de los resultados obtenidos de GI₅₀ a diferentes tiempos de incubación, el efecto citotóxico observado es diferente entre ellas y respecto a los precursores.

Tabla 8: Comparación de las GI₅₀ de las lignohidroquinonas **24** y **46** en las líneas HT-29 y MG-63 en los dos tiempos de incubación ensayados.

Compuesto	GI ₅₀ HT-29 (μM)		GI ₅₀ MG-63 (μM)	
	24 h	72 h	24 h	72 h
24	>100	1,44 ± 0,30	0,50 ± 0,29	0,15 ± 0,01
46	4,12 ± 0,05	0,041 ± 0,005	0,75 ± 0,12	0,29 ± 0,17

Las diferencias de GI₅₀ en la lignohidroquinona **24** se asemejan más a los resultados obtenidos por los precursores ciclolignánicos, siendo inactiva a las 24 h aunque

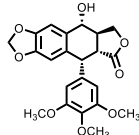
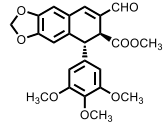
solo alcanza una GI_{50} del rango de μM a las 72 h ($GI_{50} = 1,44 \mu\text{M}$). En cambio, llama la atención como la lignohidroquinona **46** ya presenta desde las 24 h de incubación una citotoxicidad destacada ($GI_{50} = 4,12 \mu\text{M}$) multiplicándose su efecto hasta 100 veces a las 72 h, para alcanzar un valor de GI_{50} similar al del aldehído podofílico (**5**). Sin embargo, algo común a las dos lignohidroquinonas es que apenas existe diferencia entre las GI_{50} a los dos tiempos de incubación en la línea MG-63.

Con el fin de intentar justificar los valores obtenidos en los híbridos **24** y **46**, así como los precursores ciclolignánicos **1** y **5**, e indagar más en esta progresión seguida por los compuestos, se han realizado ensayos de ciclo celular por citometría de flujo en HT-29, que es donde se presenta la mayor selectividad, a un tiempo intermedio de incubación (48 h). Ya que los valores de GI_{50} obtenidos por la mayoría de estos compuestos han alcanzado rangos de sub- μM , se han analizado concentraciones más bajas ($<1 \mu\text{M}$) para poder observar hasta qué rango se ve afectado el ciclo celular y si es este realmente el mecanismo asociado a estos compuestos.

- Precursores ciclolignánicos

El análisis en HT-29 a las 48 h de los precursores podofilotoxina (**1**) y aldehído podofílico (**5**) no ha mostrado diferencias en su GI_{50} respecto a las 24 h de incubación, obteniéndose de nuevo valores por encima de $100 \mu\text{M}$, lo que concuerda con el mecanismo citotóxico progresivo propuesto ya para este tipo de compuestos. Del mismo modo, el efecto sobre la viabilidad celular observado por citometría de flujo no muestra variaciones importantes a las 48 h.

Tabla 9: Comparación de las GI_{50} a diferentes tiempos de incubación de los precursores ciclolignánicos

Compuesto	GI_{50} HT-29		
	24 h	48 h	72 h
 1	>100	>100	$0,066 \pm 0,002$
 5	>100	>100	$0,029 \pm 0,006$

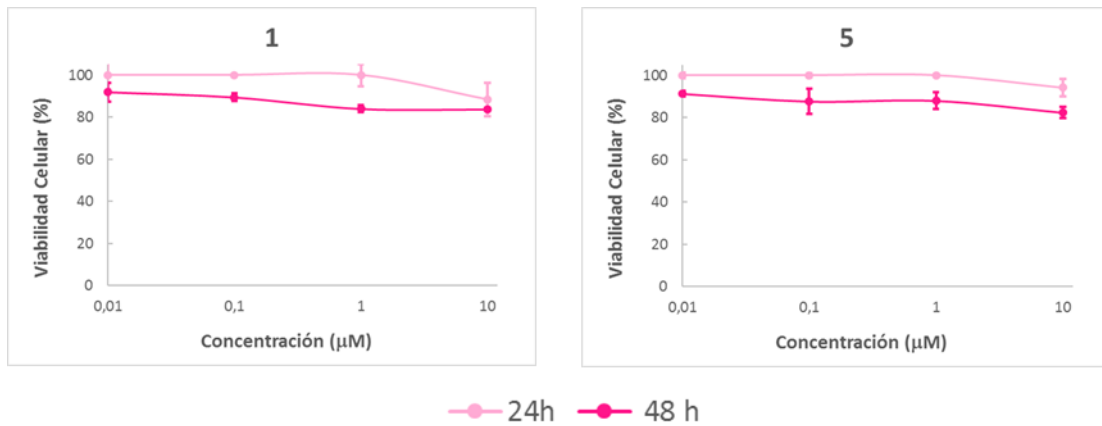


Figura 55: Efecto sobre la viabilidad celular a las 24 y 48 h de los precursores ciclogignánicos **1** y **5**

También se ha podido observar que la respuesta apoptótica mostrada por ambos compuestos no varía significativamente en las concentraciones de 1 µM hasta 0,01 µM y como era de esperar, el bloqueo del ciclo celular en G2/M es prácticamente total en todas las concentraciones a los dos tiempos de incubación.

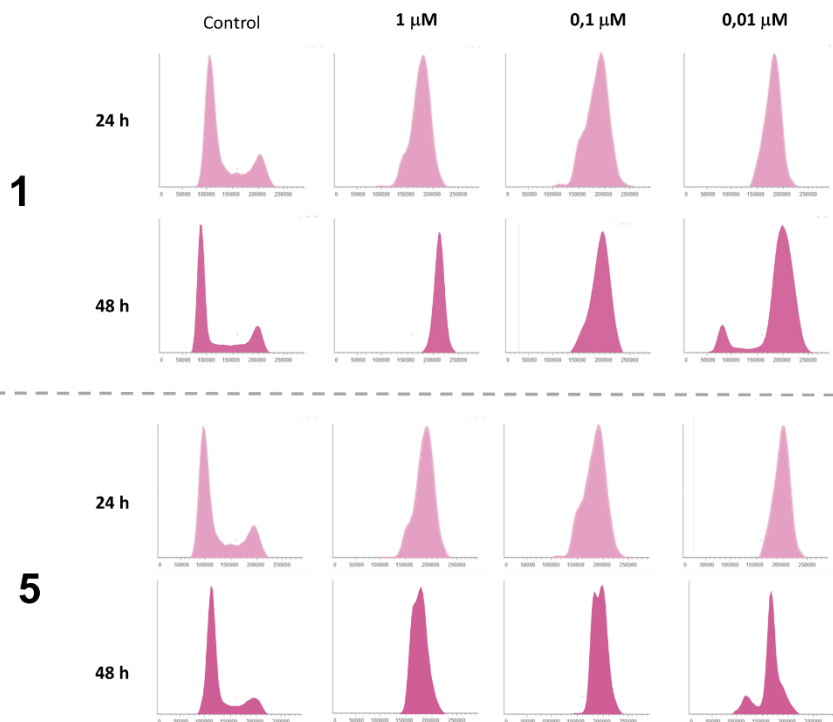


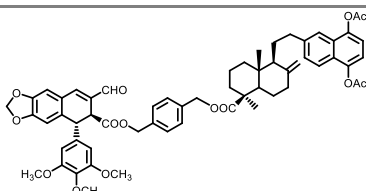
Figura 56: Efecto de los precursores ciclogignánicos **1** y **5** en línea HT-29 a las 24 y 48 h de incubación en las concentraciones de 1µM hasta 0,01 µM. Las células se incubaron con los compuestos señalados a una concentración de 1 µM. Contenido de ADN analizado por citometría de flujo.

Con estos datos se puede comprobar que los valores de GI₅₀ obtenidos a las 72 h por estos compuestos están relacionados con la inhibición del ciclo celular en las fases G2/M debido su capacidad de inhibición de la polimerización de tubulina. El comportamiento de estos dos precursores va a servir de referencia para comprender mejor el comportamiento de las dos nuevas lignohidroquinonas.

- Lignohidroquinona 24

Tras el análisis de los resultados de la lignohidroquinona **24** a las 48 h, se pudo apreciar un comportamiento similar a los precursores ciclolignánicos, siendo inactiva también a este tiempo de incubación y presentando un comportamiento de viabilidad celular a diferentes concentraciones prácticamente igual que a las 24 h.

Tabla 10: Comparación de las GI₅₀ a diferentes tiempos de incubación de los de la lignohidroquinona **24**

Compuesto	GI ₅₀ (μM) HT-29		
	24 h	48 h	72 h
 24	>100	>100	1,44 ± 0,30

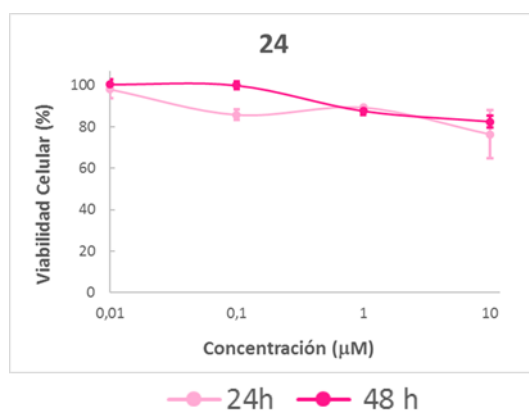


Figura 57: Efecto sobre la viabilidad celular a las 24 y 48 h la lignohidroquinona **24**

En lo que respecta al porcentaje de apoptosis, se observa un leve aumento a las 48 h a la máxima concentración ensayada sin detectarse mayores cambios en concentraciones sub- μM . En los resultados obtenidos tras el análisis del ciclo celular no se observó efecto de bloqueo en G2/M a concentraciones menores de μM , efecto que sí había sido detectado en los precursores ciclolignánicos **1** y **5**. La lignohidroquinona **24** solo provocó bloqueo del ciclo celular a 1 μM en los dos tiempos de incubación, lo que estaría de acuerdo con el valor de GI_{50} obtenido a las 72 h ($\text{GI}_{50} = 1,44 \mu\text{M}$).

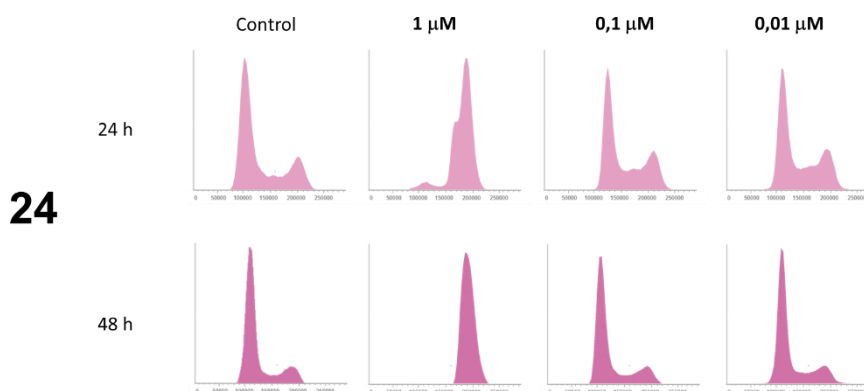


Figura 58: Efecto de la lignohidroquinona **24** en línea HT-29 a las 24 y 48 h de incubación en las concentraciones de 1 μM hasta 0,01 μM . Las células se incubaron con los compuestos señalados a una concentración de 1 μM . Contenido de ADN analizado por citometría de flujo.

Estos resultados obtenidos para la lignohidroquinona **24** dan una idea del comportamiento de estos nuevos híbridos en las líneas ensayadas. Esta lignohidroquinona había mostrado sus mejores resultados en la línea MG-63 desde las 24 h de incubación, donde ya era posible observar su selectividad en esa línea en los ensayos de viabilidad celular (figura 31) respecto de las otras lignohidroquinonas de la familia derivada de diterpenilhidroquinonas (tabla 3)

Ese hecho junto con estos resultados en HT-29 dan a entender que en la línea MG-63 el efecto citotóxico es más inmediato y la inhibición del ciclo celular provoca la muerte sin pasar por un periodo tan largo de bloqueo del ciclo en G2/M como ocurre con HT-29. Además, se justifican los valores obtenidos de GI_{50} a las 24 h, donde los resultados son más desiguales y a las 72 h los resultados se acercan en ambas líneas, aunque se mantiene la selectividad frente a MG-63.

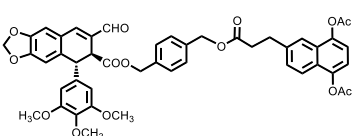
Tabla 11: Comparación de las GI₅₀ de las lignohidroquinonas **24** en las líneas HT-29 y MG-63 en los dos tiempos de incubación ensayados.

Lignohidroquinona 24		
Línea celular	GI ₅₀ (μM) 24 h	GI ₅₀ (μM) 72 h
MG-63	0,50 ± 0,29	0,15 ± 0,01
HT-29	>100	1,44 ± 0,30

- Lignohidroquinona **46**

La lignohidroquinona **46** resultó la más citotóxica de la familia derivada de monoterpenilhidroquinonas, alcanzado un valor similar al aldehído podofílico **5** y siendo además selectiva en la línea HT-29. El análisis de GI₅₀ a las 48 h dio como resultado un valor ligeramente más bajo que el obtenido a las 24 h.

Tabla 12: Comparación de las GI₅₀ a diferentes tiempos de incubación de los de la lignohidroquinona **46**.

Compuesto	GI ₅₀ (μM) HT-29		
	24 h	48 h	72 h
 46	4,12 ± 0,05	1,67 ± 0,38	0,041 ± 0,005

El estudio del efecto sobre la viabilidad celular presenta diferencias bastante destacables en el comportamiento de la lignohidroquinona **46** tras las 48 h de incubación, ya que la viabilidad disminuye a diferencia de lo que había ocurrido con los compuestos ensayados anteriormente a este tiempo.

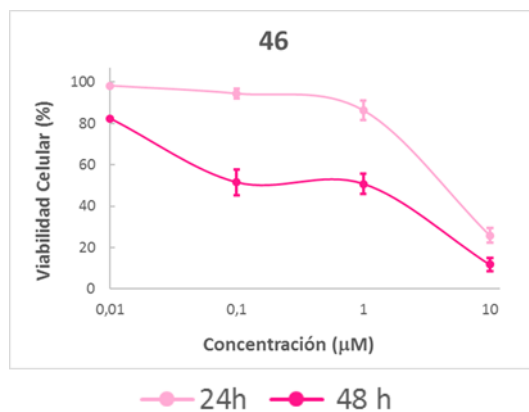


Figura 59: Efecto sobre la viabilidad celular a las 24 y 48 h la lignohidroquinona **46**

Los ensayos de apoptosis en HT-29 a las 48 h de incubación también mostraron resultados destacables ya que se pudo apreciar un aumento considerable de la apoptosis a concentraciones de 1 y 0,1 μM, incluso una alteración a 0,01 μM, donde hasta el momento no se había detectado actividad significativa para ningún compuesto ensayado en este tiempo de incubación.

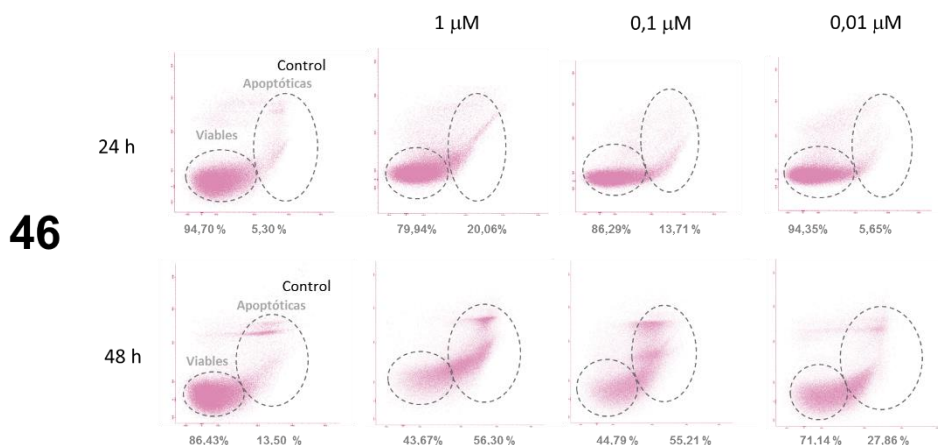


Figura 60: Respuesta apoptótica de la lignohidroquinona **46** en concentraciones de 1-0,01 μM sobre la línea celular HT-29 a las 24 h y 48 h de incubación.

El análisis del ciclo celular mostró los resultados más interesantes ya que a partir de ellos, se puede explicar un poco más la citotoxicidad de este nuevo híbrido **46**. Cuando se ensayó la lignohidroquinona **46** a las 24 h a concentraciones sub-μM, se obtuvo un leve bloqueo en las fases G2/M a 0,1 μM, siendo inactiva en la concentración más baja. En este caso, llama la atención la progresión del efecto a las 48 h de incubación, donde

se mantiene el bloqueo total en la máxima concentración ensayada y, además, aparece bloqueo en G2/M también en 0,1 μM , concentración en la que a las 24 h solo se había detectado una pequeña alteración. También aparece efecto sobre el ciclo celular en la mínima concentración ensayada, rango que solo había sido alcanzado hasta el momento por los precursores **1** y **5**.

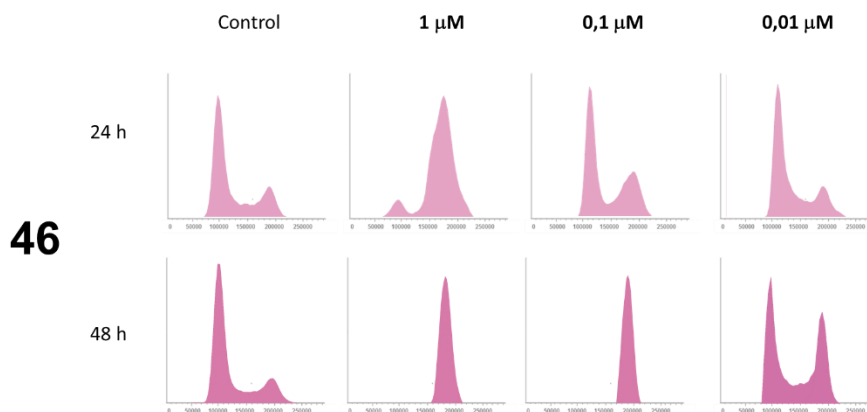


Figura 61: Efecto de la lignohidroquinona **46** en línea HT-29 a las 24 y 48 h de incubación en las concentraciones de 1 μM hasta 0,01 μM . Las células se incubaron con los compuestos señalados a una concentración de 1 μM . Contenido de ADN analizado por citometría de flujo

La capacidad para inhibir el ciclo celular hasta ese rango de concentración justifica la GI_{50} obtenida para este compuesto en la línea HT-29 ($\text{GI}_{50} = 0,041 \mu\text{M}$), pudiéndose atribuir esa citotoxicidad a las 72 h al efecto de inhibición de la polimerización de la tubulina.

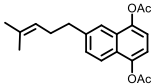
A pesar de estos resultados que explican la evolución de la citotoxicidad de este compuesto, sigue siendo algo llamativo la citotoxicidad tan elevada a las 24 h, que en el resto de derivados ciclolignánicos no se había presentado y, como se ha visto también en la lignohidroquinona **24**, esta alta citotoxicidad a tiempos bajos de incubación sólo ha podido percibirse en la línea MG-63.

En este caso parece que esa citotoxicidad concuerda con el comportamiento esperado para el resto monoterpenilhidroquinónico. Si se observa la GI_{50} del precursor monoterpenilhidroquinónico **26** a las 24 h y a las 72 h ($\text{GI}_{50} = 8,51$ y $\text{GI}_{50} = 4,33 \mu\text{M}$, respectivamente), se puede observar que no hay mucha evolución en la citotoxicidad de este compuesto a lo largo del tiempo de incubación, al igual que ocurre con la

lignohidroquinona **46** entre las 24 y la 48 h de incubación ($GI_{50} = 4,12$ y $GI_{50} = 1,67$ μ M, respectivamente).

Con el fin de corroborar que el precursor monoterpilhidroquinónico no presenta evolución en su citotoxicidad a lo largo del tiempo, también se realizaron los ensayos correspondientes a las 48 h. La variación en la GI_{50} resultó ser mínima entre las 24 y las 48 h, y más aun comparándolas con las 72 h de incubación.

Tabla 13: Comparación de las GI_{50} a diferentes tiempos de incubación de los de la monoterpilhidroquinona **26**.

		GI_{50} (μ M) HT-29		
Compuesto		24 h	48 h	72 h
	26	$8,51 \pm 0,01$	$4,81 \pm 0,06$	$4,33 \pm 1,73$

Al analizar la influencia sobre la viabilidad celular, como era previsible, el comportamiento del precursor **26** a las 24 y las 48 h es prácticamente igual.

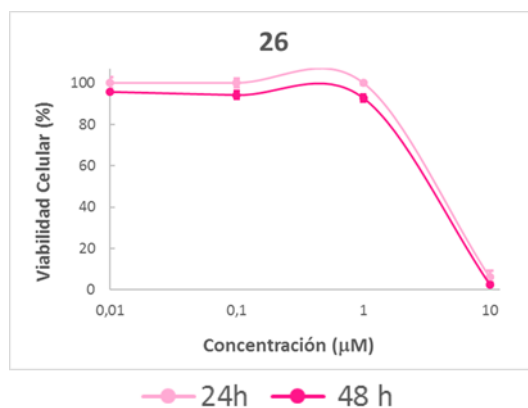


Figura 62: Efecto sobre la viabilidad celular a las 24 y 48 h la lignohidroquinona **26**

Debido a que no se obtuvieron resultados relevantes en los ensayos de apoptosis ni en los análisis de las poblaciones celulares en cada fase del ciclo, se puede deducir que este fragmento hidroquinónico ha influido en la citotoxicidad del híbrido solo al principio

de los ensayos y la sucesiva progresión de la citotoxicidad se debe al efecto del fragmento ciclolignánico incluido en la lignohidroquinona **46**.

Si se compara la estructura de las lignohidroquinonas **24** y **46** se puede apreciar que la diferencia se encuentra en el tamaño del terpeno utilizado en la síntesis del fragmento hidroquinónico por lo que la estrategia de simplificación utilizada en el diseño, manteniendo la parte responsable de la actividad, ha servido para modular favorablemente dicha actividad.

El caso de la lignohidroquinona **46** es un ejemplo de cómo la hibridación es una estrategia muy eficaz para la obtención de nuevos compuestos combinando las características farmacológicas de ambos fragmentos del híbrido que presentan mecanismos de acción diferentes.

4. 7 β ,9-Bisciclolignanos.

Como último objetivo sintético de esta Tesis de Doctoral, se ha iniciado la preparación de una nueva familia de compuestos híbridos formados por unión de dos esqueletos de ciclolignanos.

Hasta el momento se han sintetizado híbridos derivados del aldehído podofílico donde los espaciadores se unían al ciclolignano por el ácido carboxílico de la posición C-9' a través de enlaces tipo éster, como en el caso de las lignohidroquinonas sintetizadas hasta el momento. Trabajos anteriores mostraron que derivados imínicos del aldehído podofílico mejoraban significativamente la selectividad citotóxica frente a HT-29, por lo que, en esta nueva familia de híbridos, se ha planteado la unión también a través de la posición C-9, donde se encuentra la función aldehído, usando espaciadores de tipo diamina y aprovechando la experiencia previa en la formación de iminas en esa posición.⁷⁹

Por otro lado, existen de fármacos como etopósido⁴⁰ y derivados que, como se ha recogido en la introducción de esta memoria, presentan propiedades citotóxicas muy importantes actuando por un mecanismo de acción diferente al de podofilotoxina (**1**). Este cambio de actividad se debe a las modificaciones estructurales de etopósido respecto al producto natural: la inversión de la configuración en la posición C-7 y la O-desmetilación en la posición C-4' del resto de trimetoxifenilo.^{42,43,44,45,46} Ambas modificaciones estructurales han sido la base del desarrollo de numerosos análogos, en los que además se han incluido funciones nitrogenadas en la posición C-7 β .

⁷⁹ Castro, M. A.; del Corral, J. M.; Garcia, P. A.; Rojo, M. V.; de la Iglesia-Vicente, J.; Mollinedo, F.; Cuevas, C.; San Feliciano, A. Synthesis and biological evaluation of new podophyllic aldehyde derivatives with cytotoxic and apoptosis-inducing activities. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 983-993.

⁴⁰ Montecucco, A.; Zanetta, F.; Biamonti, G. Molecular mechanisms of etoposide. *EXCLI J.* **2015**, *14*, 95-108.

⁴² Byl, J. A. W.; Cline, S. D.; Utsugi, T.; Kobunai, T.; Yamada, Y.; Osheroff, N. DNA Topoisomerase II as the Target for the Anticancer Drug TOP-53: Mechanistic Basis for Drug Action. *Biochemistry (N. Y.)*. **2001**, *40*, 712-718.

⁴³ Barret, J.; Kruczynski, A.; Etiévant, C.; Hill, B. T. Synergistic effects of F 11782, a novel dual inhibitor of topoisomerases I and II, in combination with other anticancer agents. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2002**, *49*, 479-486.

⁴⁴ Chen, M. C.; Pan, S. L.; Shi, Q.; Xiao, Z.; Lee, K. H.; Li, T. K.; Teng, C. M. QS-ZYX-1-61 induces apoptosis through topoisomerase II in human non-small-cell lung cancer A549 cells. *Cancer. Sci.* **2012**, *103*, 80-87.

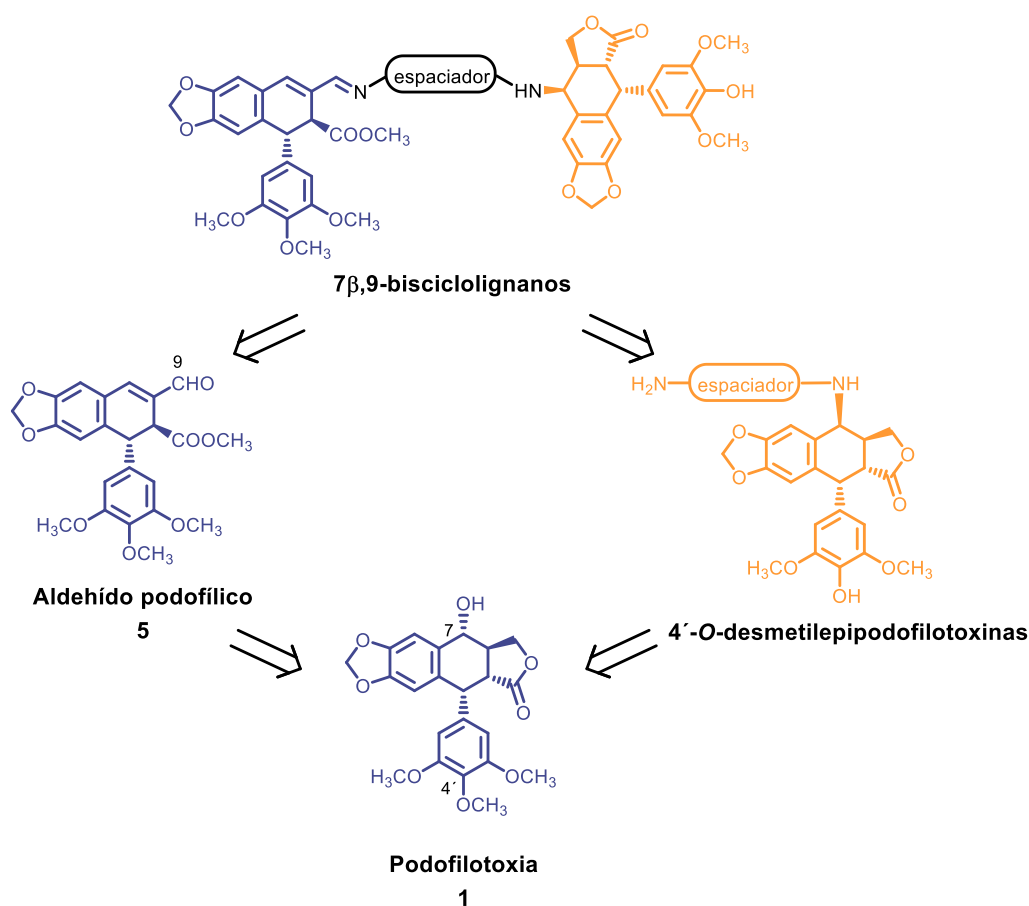
⁴⁵ Kruczynski, A.; Pillon, A.; Creancier, L.; Vandenberghe, I.; Gomes, B.; Brel, V.; Fournier, E.; Annereau, J. P.; Currie, E.; Guminski, Y.; Bonnet, D.; Bailly, C.; Guilbaud, N. F14512, a polyamine-vectorized anti-cancer drug, currently in clinical trials exhibits a marked preclinical anti-leukemic activity. *Leukemia.* **2013**, *27*, 2139-2148.

⁴⁶ Liu, Y. Q.; Tian, J.; Qian, K.; Zhao, X. B.; Morris-Natschke, S. L.; Yang, L.; Nan, X.; Tian, X.; Lee, K. H. Recent progress on C-4-modified podophyllotoxin analogs as potent antitumor agents. *Med. Res. Rev.* **2015**, *35*, 1-62.

Todo ello nos ha llevado a plantear la formación de esta nueva familia de compuestos híbridos que hemos denominado $7\beta,9$ -bisciclolignanos y que están formados por un fragmento de aldehído podofílico, inhibidor de la polimerización de tubulina, y derivados de 4'-*O*-desmetilepipodofilotoxina, inhibidores de la DNA-topoisomerasa II, unidos a través de un espaciador aromático.

En este caso, podofilotoxina, **1**, es el precursor de ambos fragmentos ciclolignánicos. Por un lado, la *O*-desmetilación de la posición C-4' y la epimerización de la posición C-7 seguida de la sustitución por los espaciadores de tipo diamina, da lugar a uno de los fragmentos del híbrido. Por el otro, el aldehído podofílico **5**, obtenido previamente se condensará con el primer fragmento a través de un enlace de tipo imina.

La estructura general de estos bisciclolignanos y el análisis retrosintético planteado se recoge a continuación:



4.1. Obtención de 7 β -amino-4'-O-desmetilepipodofilotoxinas

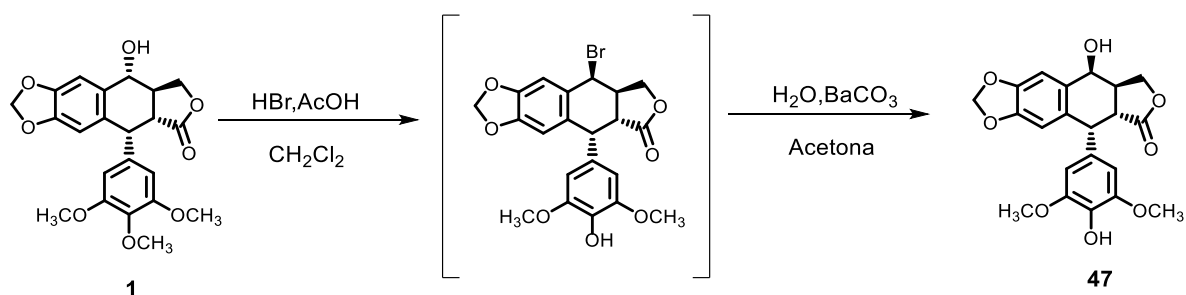
Para llevar a cabo la síntesis de los bisciclolignanos, se comenzó con la obtención de los derivados ciclolignánicos análogos de etopósido, es decir, desmetilados en la posición O-4' y con un sustituyente voluminoso en posición beta en C-7, en este caso, un compuesto de tipo α,ω -diamina como se ha representado en el esquema anterior.

Existen varios ejemplos en bibliografía que describen la inversión de la configuración en C-7 y la desmetilación en O-4' en un solo paso, seguido de la reacción con diferentes nucleófilos en la posición C-7.¹⁰⁷ Con el fin de seleccionar las condiciones ideales para realizar conjuntamente estas dos etapas, se utilizó como modelo la preparación de la 4'-O-desmetilepipodofilotoxina a partir de podofilotoxina utilizando diferentes reactivos

En primer lugar, empleando unas condiciones utilizadas anteriormente por nuestro grupo de investigación,¹⁰⁸ se llevó a cabo dicha transformación utilizando como reactivo una disolución de ácido bromhídrico en ácido acético (33 %) en CH₂Cl₂ durante 24 h. En este caso, se forma un intermedio de reacción 4'-O-desmetilado con un átomo de bromo en posición C-7 del ciclolignano que rápidamente, se hizo reaccionar con H₂O como nucleófilo. Siguiendo este procedimiento, se obtuvo la 4'-O-desmetilepipodofilotoxina **47** con un rendimiento moderado (56 %)

¹⁰⁷ Lee, K. H.; Beers, S. A.; Mori, M.; Wang, Z. Q.; Kuo, Y. H.; Li, L.; Liu, S. Y.; Chang, J. Y.; Han, F. S.; Cheng, Y. C. Antitumor agents. 111. New 4-hydroxylated and 4-halogenated anilino derivatives of 4'-demethylepipodophyllotoxin as potent inhibitors of human DNA topoisomerase II. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 1364-1368.

¹⁰⁸ Sancho Monforte, P. Nuevos desalquil-ciclolignanos relacionados con podofilotoxina. Grado de Salamanca. **1994**.



Para intentar mejorar el rendimiento de **47**, se probaron otros agentes desmetilantes y variaciones en las condiciones de reacción. La reacción se lleva a cabo siempre de manera secuencial, en estos casos a través de un derivado iodado, e identificando únicamente los productos finales de reacción. En una primera etapa, podofilotoxina (**1**) se trata con NaI durante 5 min, seguido del tratamiento con el agente desmetilante durante un tiempo t_1 . Para la segunda parte, se evapora el disolvente y el producto de reacción se mantiene en contacto con el nucleófilo, en este caso agua, durante un tiempo t_2 . Las diferentes condiciones de reacción utilizadas se recogen la tabla siguiente:

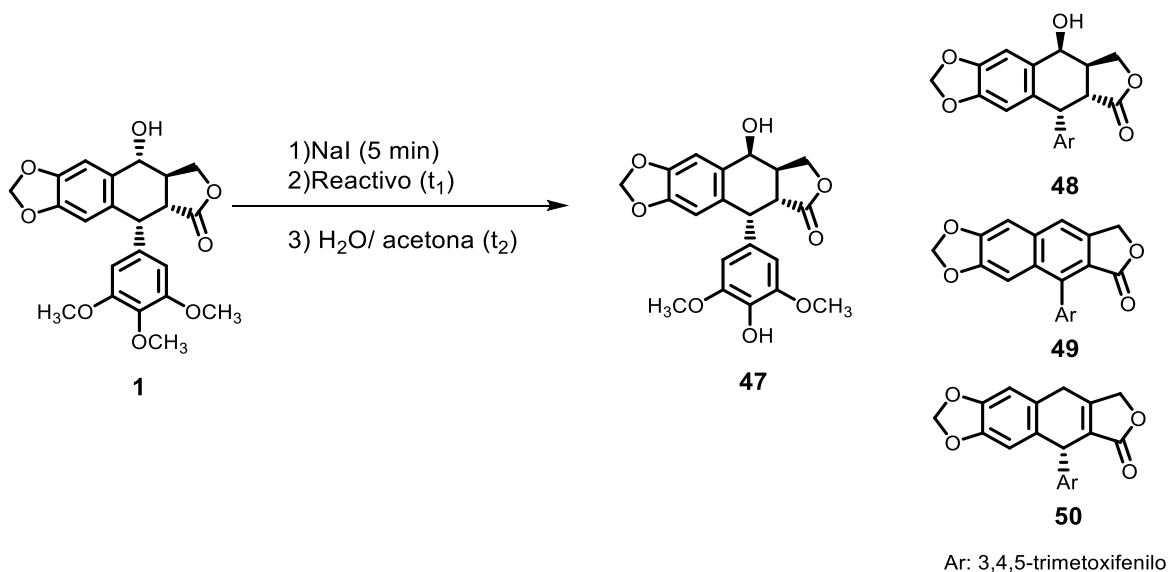


Tabla 14: condiciones de reacción para la obtención del compuesto **47**.

Entrada	Reactivo	Proporción 1: Reactivo	Disolvente	t ₁ , t ₂	Producto de reacción
1		1:2	CH ₃ CN	15 min, 2 h	48
2	BF ₃	1:2	CH ₂ Cl ₂	5 h, 19 h	49
3		1:3		5 h, 30 min	49 + 50
4	ZnCl ₄	1:2	CH ₃ CN	5 h, 30 min	1
5			CH ₂ Cl ₂		
6		1:3	CH ₂ Cl ₂		49 + 50
7		1:2			49 + 50
8	MeSO ₃ H	1:3	CH ₂ Cl ₂	5 h, 30 min	47 + 49 + 50
9		1:4,5			47 (81%)
10	TMSCl	1:4,5	CH ₂ Cl ₂	5 h, 30 min	47 (40%)

Como se puede observar en la tabla anterior se han modificado no sólo el agente desmetilante y su relación con respecto a **1**, sino también el disolvente de la primera etapa y los tiempos de reacción tanto de la primera como la segunda etapa.

Cuando se empleó BF₃¹⁰⁹ como reactivo y CH₃CN como disolvente en un tiempo corto para la primera etapa (entrada 1) se obtuvo un producto de reacción complejo en cuyo espectro de RMN de ¹H se pudieron apreciar las señales de la epipodofilotoxina (**48**), producto de epimerización en C-7, sin llegar a obtener la desmetilación en la posición O-4'. El cambio de disolvente por CH₂Cl₂ y de los tiempos de reacción t₁ y t₂ (entrada 2) condujo también a un producto de reacción complejo donde únicamente se pudo identificar el compuesto aromático anhidrodeshidropodofilotoxina **49**, también sin desmetilar en O-4', por lo que nos planteamos aumentar la proporción del agente desmetilante y disminuir el tiempo de la segunda parte de la reacción (entrada 3), obteniéndose también un producto de reacción donde, además del compuesto aromático

¹⁰⁹ Kamal, A.; Kumar, B. A.; Arifuddin, M. A One-Pot, Efficient and Facile Synthesis of 4β-Arylamino-podophyllotoxins: Synthesis of NPF and GL-331 as DNA Topoisomerase II Inhibitors *Tetrahedron Letters* **2003**, *44*, 8457-8459.

49, se observan señales asignables al compuesto de deshidratación β -apopodofilotoxina **50**, pero en ningún caso se observó la desmetilación en O-4'.

Cuando se empleó ZnCl_4 ¹¹⁰, con los disolventes utilizados hasta el momento, en proporción 1:2 respecto de **1** (entradas 4 y 5) se recuperó el producto de partida sin reaccionar. El aumento de la proporción de reactivo (entrada 6) condujo de nuevo a una mezcla compleja donde se identificaron señales de los productos de deshidratación **49** y **50**, sin detectarse señales de desmetilación en O-4'.

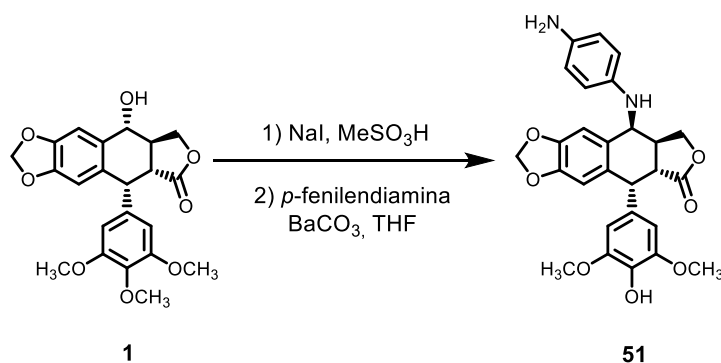
Resultados similares se obtuvieron cuando se utilizó ácido metanosulfónico (MeSO_3H)¹¹¹ en relación 1:2 (entrada 7). Sin embargo, en el caso de MeSO_3H , el aumento de la proporción de reactivo a 1:3 (entrada 8) condujo a un producto de reacción donde por primera vez fue posible apreciar las señales características de la 4'-*O*-desmetilepipodofilotoxina **47**, aunque se siguieron observando los compuestos **49** y **50**. Este resultado motivó el incremento de las proporciones de reactivo. Así, cuando se aumentó un 50 % la proporción de reactivo respecto de las últimas condiciones empleadas (entrada 9), se obtuvo **47** con buen rendimiento (81 %). Finalmente, se aplicaron las proporciones optimizadas para el MeSO_3H con otro reactivo, el clorotrimetilsilano (TMSCl)¹¹² (entrada 10), con el fin de ampliar las posibilidades de reacción, obteniendo **47** pero con menor rendimiento que con MeSO_3H (40 %).

Continuando con el objetivo de síntesis de 7 β ,9-bisciclolignanos planteados, y una vez conseguida la desmetilación en O-4', el siguiente paso fue la preparación del 7 β -ciclolignano **51** que incluye un espaciador diaminado de tipo aromático que permitirá la posterior condensación con el aldehído podofílico (**5**). Para ello, se hizo reaccionar **1** en las condiciones optimizadas en la obtención de la 4'-*O*-desmetilepipodofilotoxina y utilizando en la segunda parte de la reacción *p*-fenilendiamina como nucleófilo.

¹¹⁰ Kamal, A.; Kumar, B. A.; Suresh, P.; Shankaraiah, N.; Kumar, M. S. An efficient one-pot synthesis of benzothiazolo-4 β -anilino-podophyllotoxin congeners: DNA topoisomerase-II inhibition and anticancer activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 350-353.

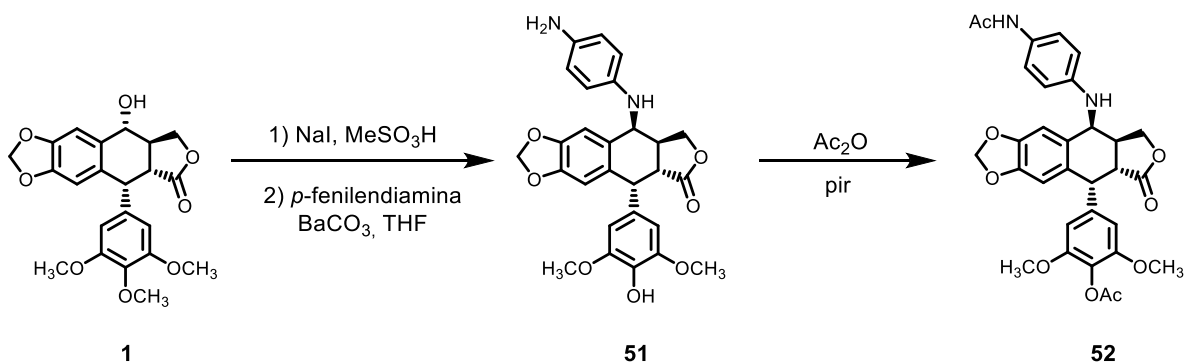
¹¹¹ Kamal, A.; Laxman, N.; Ramesh, G. Facile and Efficient One-Pot Synthesis of 4 β -Arylamino-podophyllotoxins: Synthesis of DNA Topoisomerase II Inhibitors (NPF and W-68) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2000**, *10*, 2059-2062.

¹¹² Kamal, A.; Ramulu, P.; Srinivas, O.; Ramesh, G.; Kumar, P. P. Synthesis of C8-linked pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine-benzimidazole conjugates with remarkable DNA-binding affinity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4791-4794.



El espectro de ^1H del producto de reacción indica que se ha formado en una proporción importante el compuesto **51**, sin embargo, cuando se purificó por cromatografía en columna, se obtuvo un bajo rendimiento (20 %) pudiéndose deber este hecho a la degradación del compuesto en la columna de cromatografía por autooxidación radicalaria del grupo amino aromático.

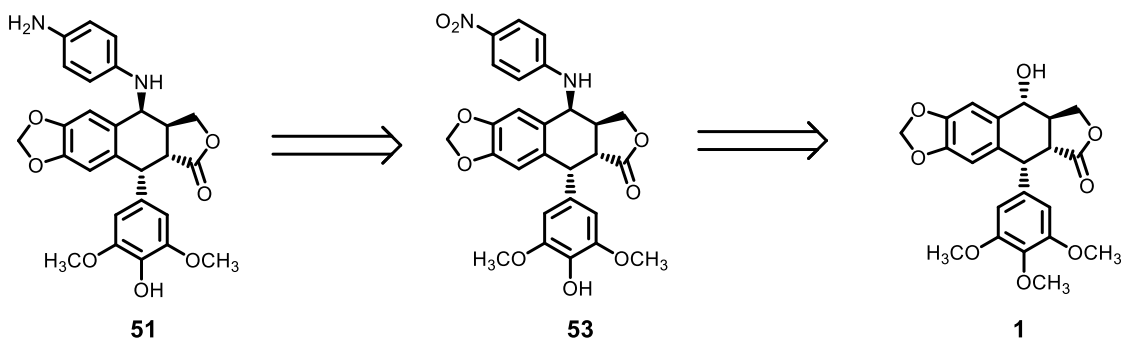
Con el fin de comprobar que el compuesto **51** se forma en una mayor proporción, se llevó a cabo de nuevo la reacción de obtención del compuesto **51** y el producto de reacción se acetiló rápidamente. Tras realizar la cromatografía en columna, se obtuvo el compuesto acetilado **52** con un rendimiento del 46 %.



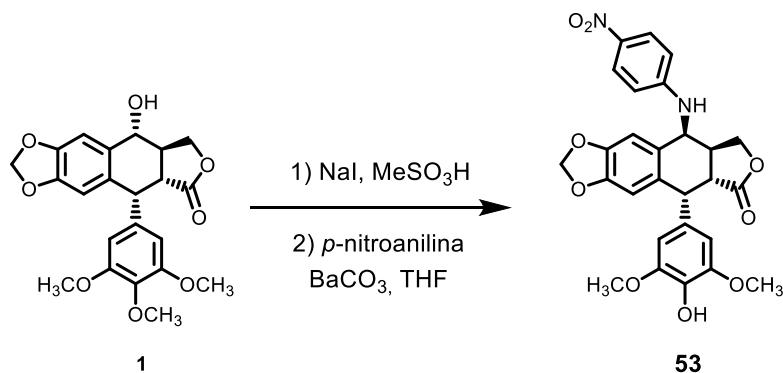
Tratando de obtener el compuesto **51** con mejores rendimientos, se planteó una ruta alternativa a través de un compuesto ya descrito en bibliografía y que ha llegado a ensayos clínicos, el GL-331.⁴⁶ En nuestro caso, el compuesto **53** con un grupo nitro es

⁴⁶ Liu, Y. Q.; Tian, J.; Qian, K.; Zhao, X. B.; Morris-Natschke, S. L.; Yang, L.; Nan, X.; Tian, X.; Lee, K. H. Recent progress on C-4-modified podophyllotoxin analogs as potent antitumor agents. *Med. Res. Rev.* **2015**, *35*, 1-62.

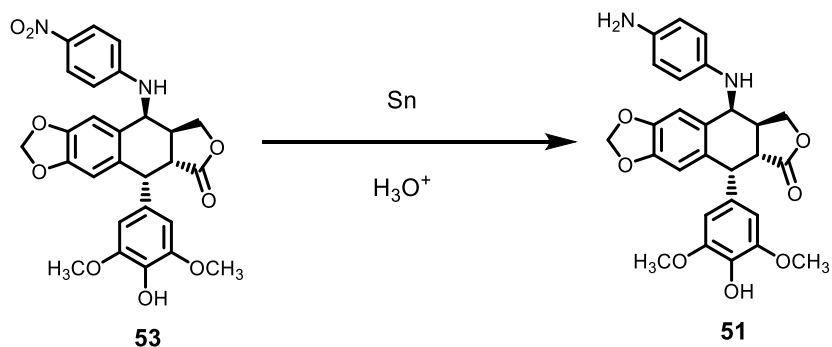
más estable que el compuesto **51**, al que se llegaría por posterior reducción de ese grupo, tal y como se recoge en el siguiente esquema retrosintético.



Cuando se hizo reaccionar podofilotoxina **1** en las condiciones anteriormente descritas y realizando la sustitución en el último paso con *p*-nitroanilina se obtuvo el derivado ciclolignánico **53** (67 %).



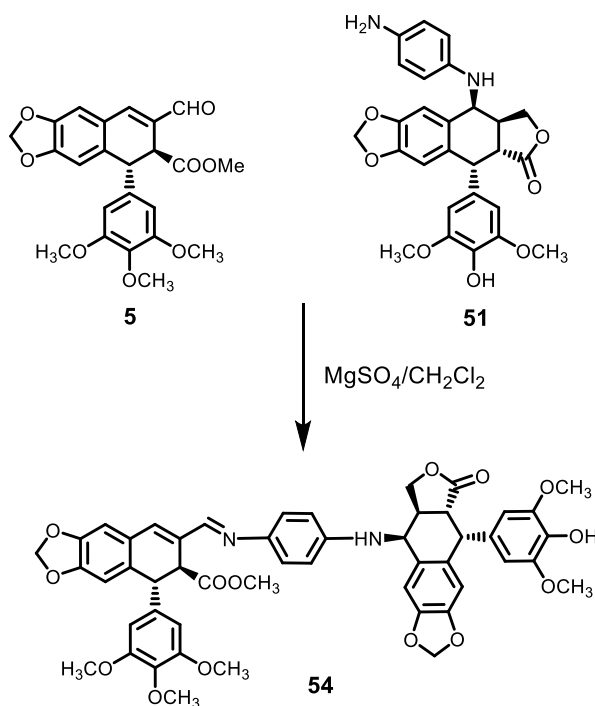
El tratamiento del compuesto **53** con Sn en medio ácido sí condujo a un producto de reacción en cuyo espectro de RMN de ^1H se pudieron apreciar las señales asignadas al compuesto **51** buscado, mezclado en proporción 1:1 con el compuesto de partida **53**.



Aunque esta metodología no consigue superar el rendimiento obtenido por la primera ruta propuesta, puede suponer una alternativa útil para la obtención de otros precursores de esta familia de compuestos.

4.2. Obtención del 7 β ,9-bisciclolignano **54**

Una vez obtenido el compuesto **51**, es posible obtener el 7 β ,9-bisciclolignano **54** por reacción de condensación con el aldehído podofílico (**5**) obtenido previamente. Tras disolver ambos compuestos en CH₂Cl₂, en presencia de MgSO₄, se obtuvo el híbrido **54** que presenta en su espectro de RMN de ¹H una señal singlete a 8,23 ppm asignable al hidrógeno imínico, así como el resto de señales características de dos unidades ciclolignánicas con diferente grado de metilación en los oxígenos del anillo E.



La puesta punto de estas últimas reacciones y la utilización de diferentes espaciadores diaminaos permitirán en un futuro aumentar el número de compuestos de esta nueva familia de bisciclolignanos.

4.3 Evaluación biológica

Una vez sintetizado el primer el 7 β ,9-bisciclolignano (**54**) se ha evaluado su actividad citotóxica junto con el precursor 7 β -ciclolignánico **51**, para obtener datos iniciales de la bioactividad de esta nueva familia de compuestos híbridos.

Por el momento solamente se han realizado los ensayos mediante citometría de flujo como se ha descrito en las lignohidroquinonas anteriormente preparadas, observando el efecto de los compuestos sobre la viabilidad celular, analizando la respuesta apoptótica y evaluando el propio ciclo celular tras el tratamiento de las líneas celulares con los compuestos sintetizados. De nuevo, se han tomado como referencia el producto natural podofilotoxina (**1**) de donde derivan ambos esqueletos ciclolignánicos presentes en el híbrido y aldehído podofílico (**5**), incluido como fragmento en el propio híbrido **54**. De todos estos ensayos se han podido llegar a conclusiones acerca de la actividad de estos compuestos que ayudarán en el futuro a plantear nuevas síntesis y análisis de actividad.

4.3.1 Evaluación del ciclo celular por citometría de flujo.

En trabajos realizados anteriormente las iminas derivadas del aldehído podofílico han dado muy buenos resultados de citotoxicidad. También se ha podido confirmar que estos derivados mantienen la capacidad de inhibición de la polimerización de la tubulina del compuesto cabeza de serie, dando como resultado un bloqueo en G2/M como se ha observado ya en este trabajo para los ciclolignanos **1** y **5**.⁷⁹ Por otro lado, está descrito que los fármacos como etopósido y otros ciclolignanos que poseen un sustituyente voluminoso en la posición C-7 β , son capaces de inhibir la topoisomerasa II^{113,114}. Esta respuesta se traduce en una activación de los procesos de apoptosis y del ciclo celular, que en el caso de etopósido y otros análogos

⁷⁹Castro, M. A.; Miguel del Corral, J. M.; García, P. A.; Rojo, M. V.; de la Iglesia-Vicente, J.; Mollinedo, F.; Cuevas, C.; San Feliciano, A. Synthesis and biological evaluation of new podophyllic aldehyde derivatives with cytotoxic and apoptosis-inducing activities. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 983-993.

¹¹³Larsen, A. K.; Skladanowski, A.; Bojanowski, K. The roles of DNA topoisomerase II during the cell cycle. *Prog. Cell Cycle Res.* 1996, *2*, 229-239.

¹¹⁴Darzynkiewicz, Z.; Zhao, H.; Halicka, H. D.; Rybak, P.; Dobrucki, J.; Wlodkowic, D. DNA damage signaling assessed in individual cells in relation to the cell cycle phase and induction of apoptosis. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2012, *49*, 199-217.

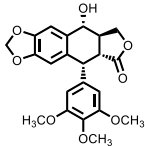
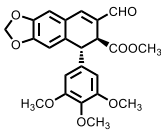
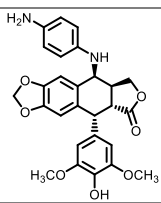
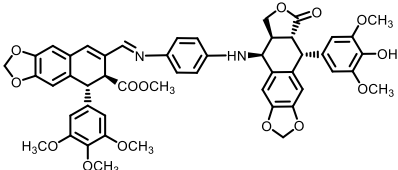
como el GL-331 (compuesto **53** de este trabajo) se manifiesta en un bloqueo al principio de la fase G2¹¹⁵.

Con los ensayos de esta nueva familia de híbridos se pretende determinar el efecto que desencadenan estos compuestos sobre el ciclo celular.

4.3.1.1. Efecto de los compuestos sobre la viabilidad celular.

El 7,9β-bisciclolignano (**54**) junto con el precursor ciclolignánico **51** se incubaron en las líneas MCF-7, MG-63 y HT-29, determinando su citotoxicidad a las 24 h mediante citometría de flujo. Los resultados de este ensayo se recogen en la tabla 14.

Tabla 14: Citotoxicidad de los compuestos evaluados a las 24 h de incubación (GI₅₀, μM ± D.E.).

Compuesto	MCF-7	MG-63	HT-29	
	1	>100	18,3 ± 1,4	>100
	5	>100	1,23 ± 0,06	>100
	51	0,8 ± 0,04	>100	2,62 ± 0,30
	54	>100	1,00 ± 0,01	>100

¹¹⁵ Chen, Y.; Su, Y. H.; Wang, C. H.; Wu, J. M.; Chen, J. C.; Tseng, S. H. Induction of apoptosis and cell cycle arrest in glioma cells by GL331 (a topoisomerase II inhibitor). *Anticancer Res.* **2005**, 25, 4203-4208.

El bisciclolignano **54** presentó un comportamiento similar a los precursores **1** y **5** en las tres líneas celulares ensayadas, siendo inactivo en MCF-7 y HT-29 y mostrando selectividad frente a MG-63 con una GI_{50} similar a la del aldehído podofílico (**5**) a este tiempo de incubación. Llamó la atención el comportamiento del intermedio **51** cuyo perfil de citotoxicidad se invierte respecto a los precursores y al bisciclolignano **54**. El compuesto **51** mostró el mejor valor de GI_{50} en MCF-7 de todos los ensayados hasta el momento, y fue citotóxico a nivel de μM en HT-29 e inactivo frente a MG-63 (a las 24 h).

En la figura 61 se representa la viabilidad celular (%) de cada línea neoplásica frente a las concentraciones ensayadas de los precursores ciclolignánicos y de los nuevos compuestos sintetizados **51** y **54** en concentraciones de 0,01 μM hasta 10 μM .

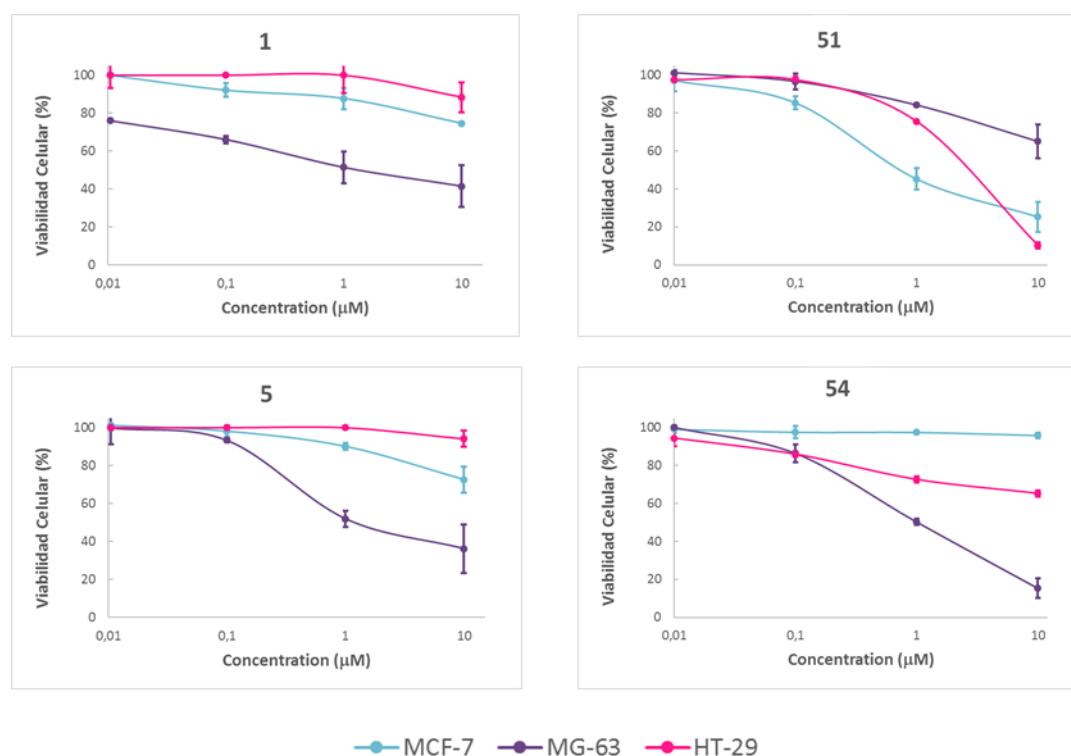


Figura 61: Efecto sobre la viabilidad celular de los ciclolignánicos **1,5** y **51**, y del bisciclolignano **54** a las 24 h.

En las curvas de viabilidad se aprecia cómo el híbrido final presenta un comportamiento más parecido a los precursores **1** y **5** sobre todo en lo referente a MG-63 y cómo el comportamiento del 7β -ciclolignano **51** presentó otro perfil diferente. Este primer análisis de citotoxicidad puede indicar diferencias en los mecanismos de acción

entre los compuestos y cómo la presencia del aldehído en el híbrido final puede condicionar la actividad final.

4.3.1.2. Análisis de la apoptosis

Se ha evaluado el 7 β -ciclolignano **51** y el 7 β ,9-bisciclolignano **54** en concentraciones de 1 y 0,1 μ M durante 24 h, en el ensayo de apoptosis, comparando los resultados con los precursores ciclolignánicos **1** y **5** en las mismas concentraciones y tiempo. Debido a los resultados obtenidos previamente por los precursores **1** y **5**, se ha ampliado el análisis a la concentración de 0,1 μ M, además de la de 1 μ M que se venía analizando hasta el momento.

Cuando se trató la línea MCF-7 con los compuestos **51** y **54**, se pudo observar que los precursores **1** y **5** permanecían inactivos a ambas concentraciones, lo mismo que el híbrido **54** sintetizado. Por el contrario, el 7 β -ciclolignano **51** de nuevo tuvo un comportamiento diferente en esta línea celular siendo capaz de inducir apoptosis incluso a la concentración de 0,1 μ M, lo que están en concordancia con los resultados anteriores.

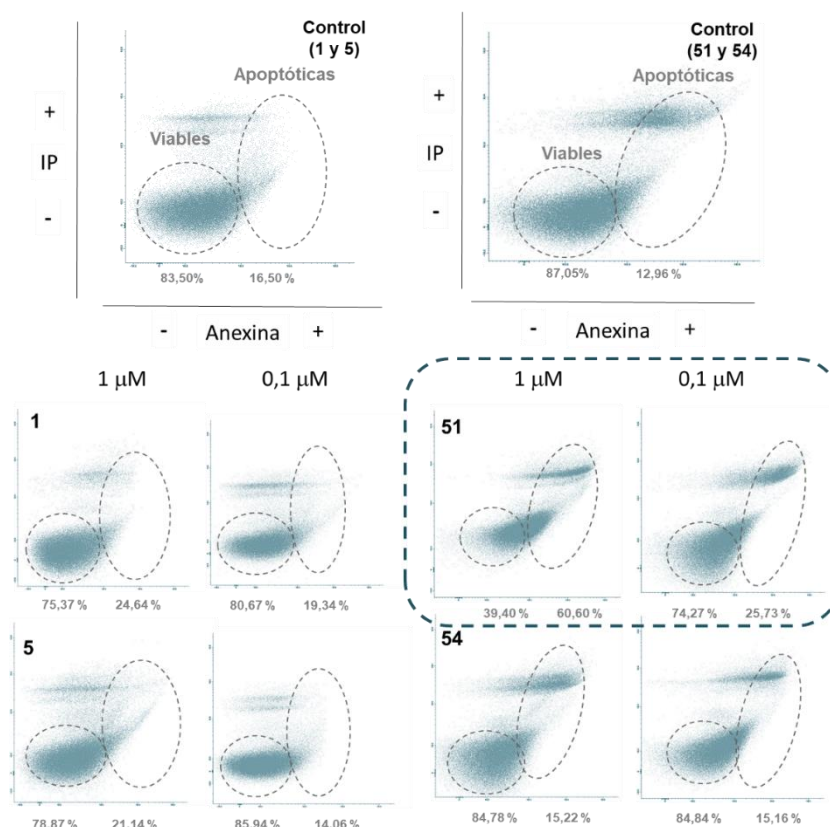


Figura 64: Efecto de los ciclolignánicos **1**, **5** y **51** y del bisciclolignano **54** concentraciones de 1-0,1 μ M durante 24 h en la apoptosis de la línea celular MCF-7.

En el caso de la línea MG-63, hasta el momento la más sensible a los compuestos sintetizados en esta memoria, los ciclolignanos ensayados fueron capaces de inducir apoptosis incluso en concentraciones de $0,1 \mu\text{M}$ aunque ninguno de ellos alcanza el valor del compuesto natural podofilotoxina. Es de destacar el patrón de apoptosis en los compuestos **51** y **54** que difiere de los precursores ciclolignánicos **1** y **5**, algo que por sus características estructurales podría esperarse.

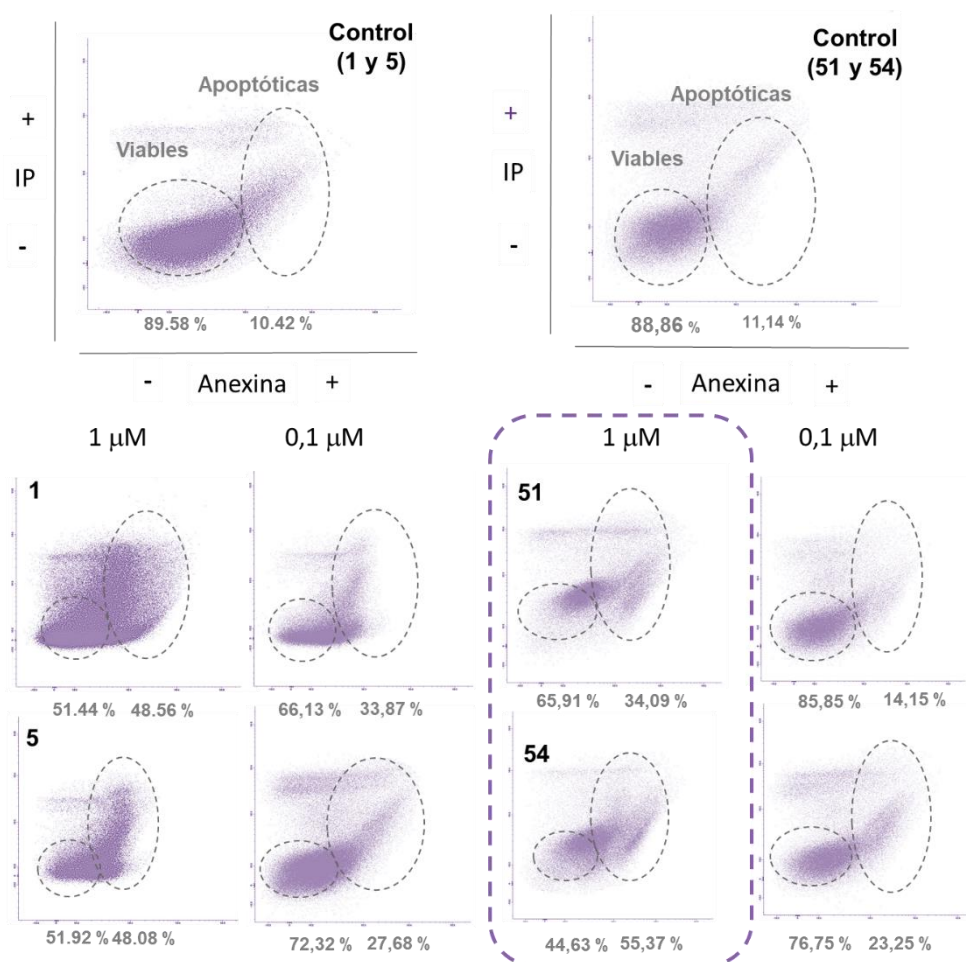


Figura 65: Efecto de los ciclolignánicos **1**, **5** y **51** y del bisciclolignano **54** concentraciones de 1-0,1 μM durante 24 h en la apoptosis de la línea celular MG-63.

En la línea HT-29 los nuevos compuestos sintetizados **51** y **54** fueron más activos que los precursores **1** y **5** a la concentración de 1 μM . Sin embargo, el 7 β -ciclolignano **51** resultó inactivo al disminuir la concentración del ensayo mientras que por su parte el 7 β ,9-bisciclolignano **54**, sí mostró una ligera actividad apoptótica a la concentración de 0,1 μM , a pesar de no mostrar citotoxicidad ($\text{GI}_{50} > 100 \mu\text{M}$).

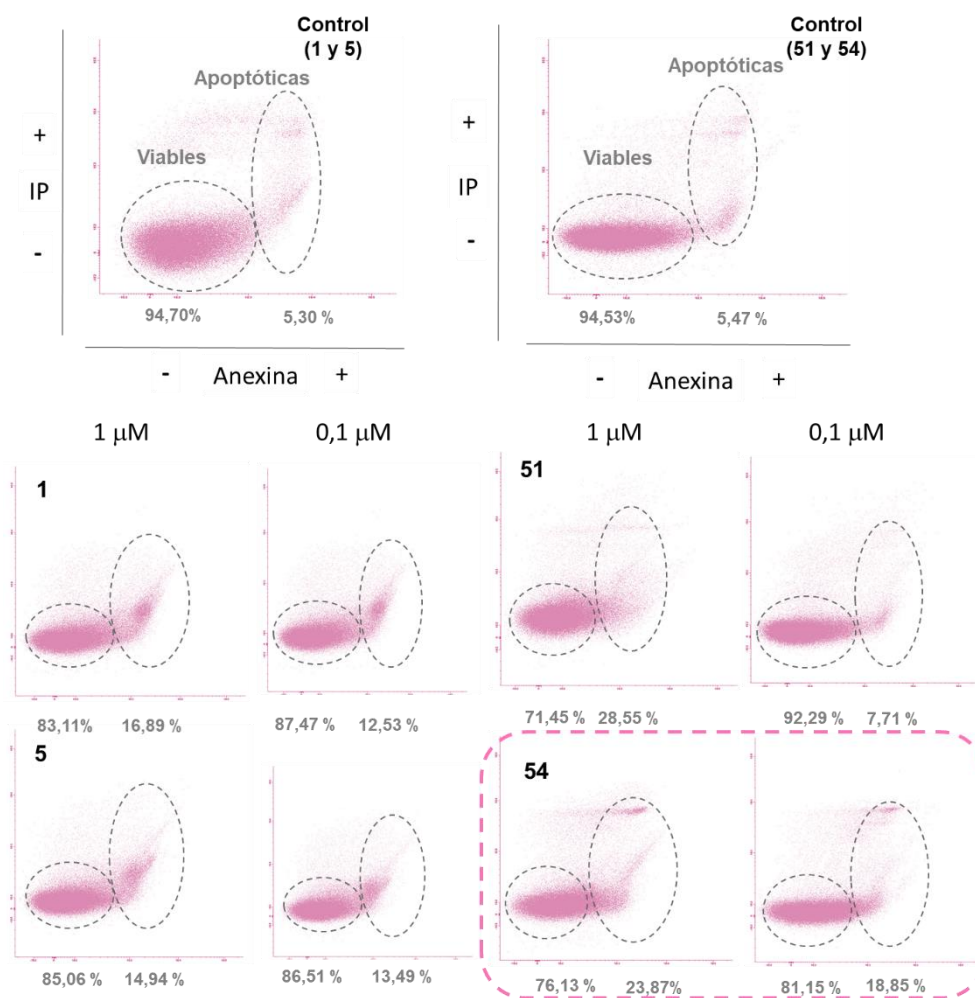


Figura 66: Efecto de los ciclolignánicos **1**, **5** y **51** y del bisciclolignano **54** concentraciones de 1-0,1 μM durante 24 h en la apoptosis de la línea celular HT-29.

Respecto del análisis de la relación de IP-/IP+, en este caso, se han observado las proporciones del marcaje de IP en las concentraciones. de 1 μM y 0,1 μM tanto en los precursores **1** y **5** como en los compuestos **51** y **54**.

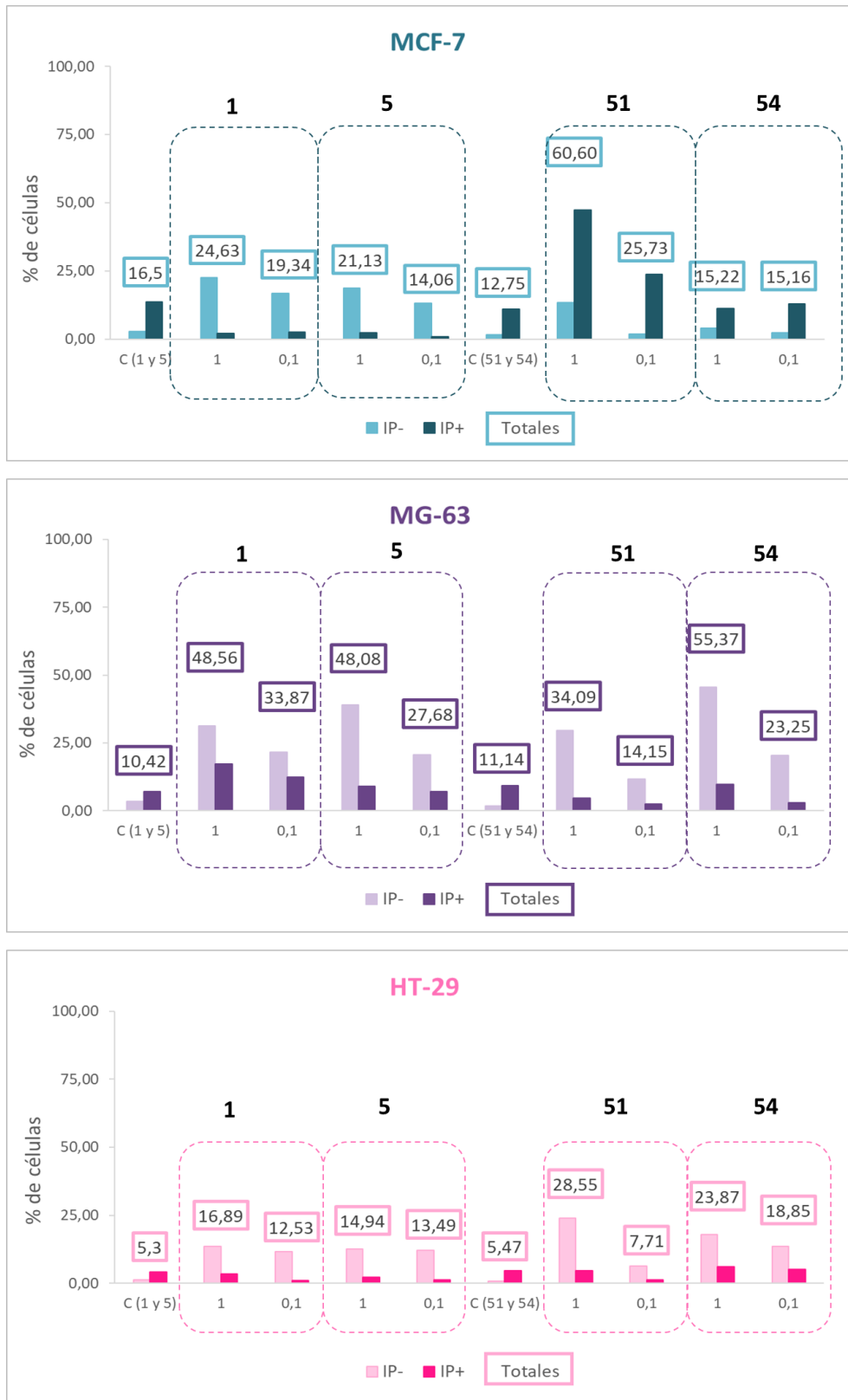


Figura 67: Representación en barras de los valores de IP-/IP+ de los compuestos **1**, **5**, **51** y **54** y sus controles (c) en las líneas ensayadas respecto de los valores totales de apoptosis (valor situado encima de las barras) en las concentraciones indicadas en el eje de abscisas (1 y 0,1 μ M).

Como ya se había observado previamente, podofilotoxina (**1**) y aldehído podofílico (**5**) mantienen la proporción IP- mayor y en este caso, también en la concentración de 0,1 μM .

Los compuestos **51** y **54** mantienen ese perfil en las líneas MG-63 y HT-29 pero no en la línea MCF-7. Este hecho hace que no se pueda asegurar que la actividad en esta línea se corresponda con el resto ciclolignánico precursor, pudiéndose deber a que al tiempo de incubación del ensayo no se hayan activado los mecanismos apoptóticos o bien que su acción en esta línea celular se deba a otros mecanismos que, por esta técnica y con los datos que se tienen hasta el momento, no se han podido determinar.

4.3.1.3. Análisis del ciclo celular

Como se ha comentado antes, tanto los ciclolignanos que mantienen la capacidad de inhibición de la polimerización de tubulina, como aquellos que poseen la acción de inhibición de la topoisomerasa II, son capaces de detener el ciclo celular en las fases G2/M o bien en G1. Por este motivo, el ensayo de citometría de flujo, que puede determinar cómo afectan los compuestos a la progresión del ciclo celular, resulta muy útil. Los precursores ciclolignánicos podofilotoxina (**1**) y aldehído podofílico (**5**), y los nuevos compuestos **51** y **54** se ensayaron en concentraciones de 1-0,01 μM con IP para determinar los diferentes % de células en cada fase del ciclo celular a las 24 h de incubación.

Al incubar la línea MCF-7 con los compuestos **51** y **54** se pudo apreciar actividad de bloqueo casi total del ciclo celular en las fases G2/M a la concentración 1 μM , como ya se había observado anteriormente para **5** a esa concentración, aunque en ninguno de los casos se observó el bloqueo total que se observa en el precursor **1**. A concentraciones menores (0,1 y 0,01 μM) únicamente mostró actividad el producto natural podofilotoxina

(1), no apareciendo ningún bloqueo ni total ni tampoco parcial para los otros tres compuestos.

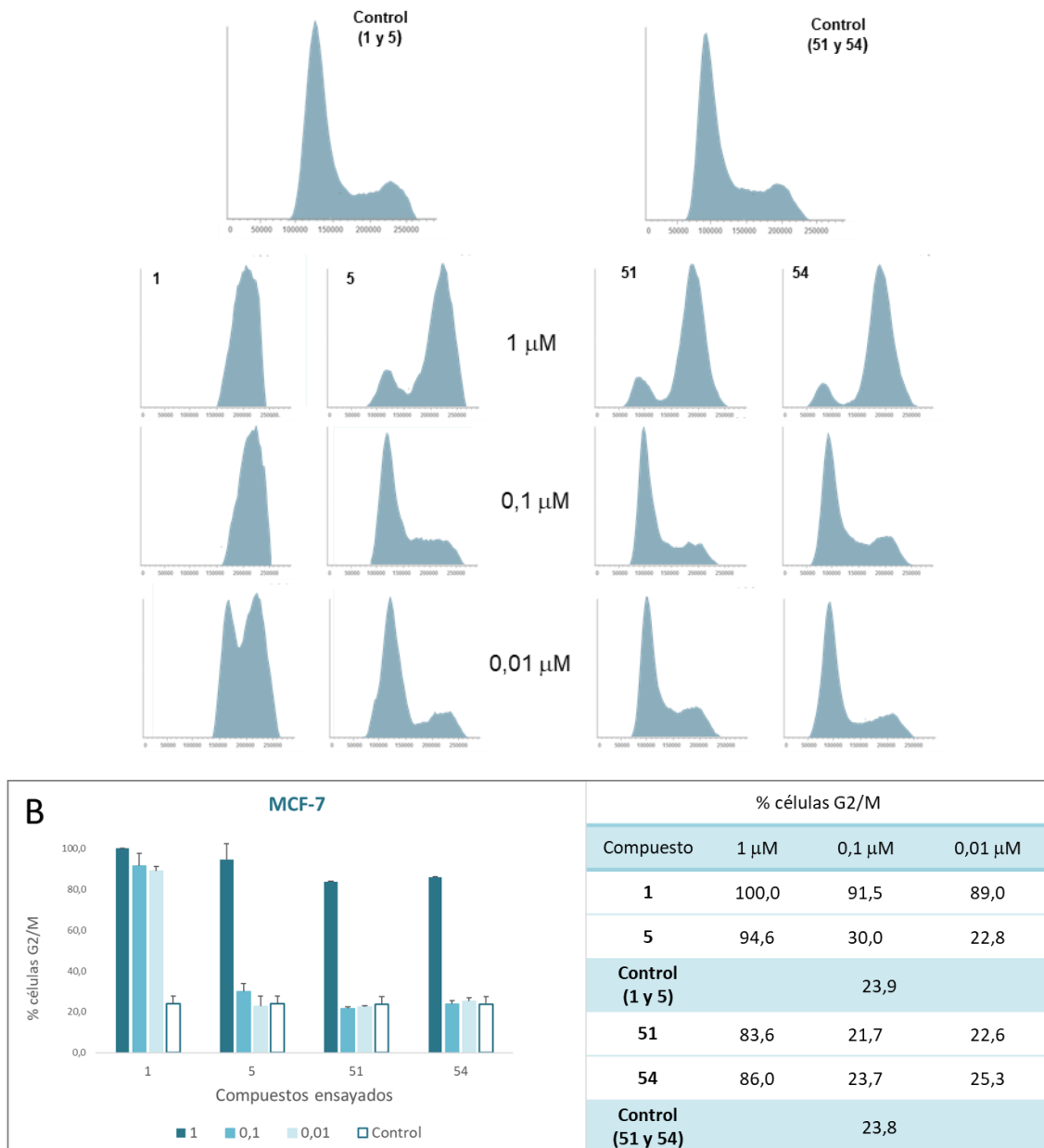


Figura 68: Efecto de los ciclolignanos **1**, **5** y **51**, y del bisicyclolignano **54** sobre el ciclo celular determinado por citometría de flujo en la línea MCF-7. Las células se incubaron con los compuestos señalados a concentraciones de 1 μM hasta 0,01 μM . (A): contenido de ADN analizado por citometría de flujo. (B): porcentaje de células en G2/M.

En la línea MG-63 se han obtenido resultados muy interesantes de bloque dosis-dependiente para los nuevos compuestos sintetizados. En los compuestos **51** y **54** se puede observar un bloqueo total en la máxima concentración ensayada, siendo el

comportamiento igual al de los precursores **1** y **5** en esta línea. El tratamiento de la línea MG-63 ha dado resultados de bloqueo en las fases G2/M en todos los compuestos a una concentración de 0,1 μ M, siendo casi total en podofilotoxina (**1**), relativamente alto en el caso del 7 β ,9-bisciclolignano **54**. menor en el 7 β -ciclolignano **51** y algo más débil en el aldehído podofílico (**5**). En el caso de la concentración 0,01 μ M solamente se ha detectado bloqueo G2/M casi total en podofilotoxina (**1**) aunque cabe destacar el valor obtenido por el 7 β ,9-bisciclolignano **54**, que si mostró actividad a esa concentración a diferencia de los otros dos compuestos ensayados.

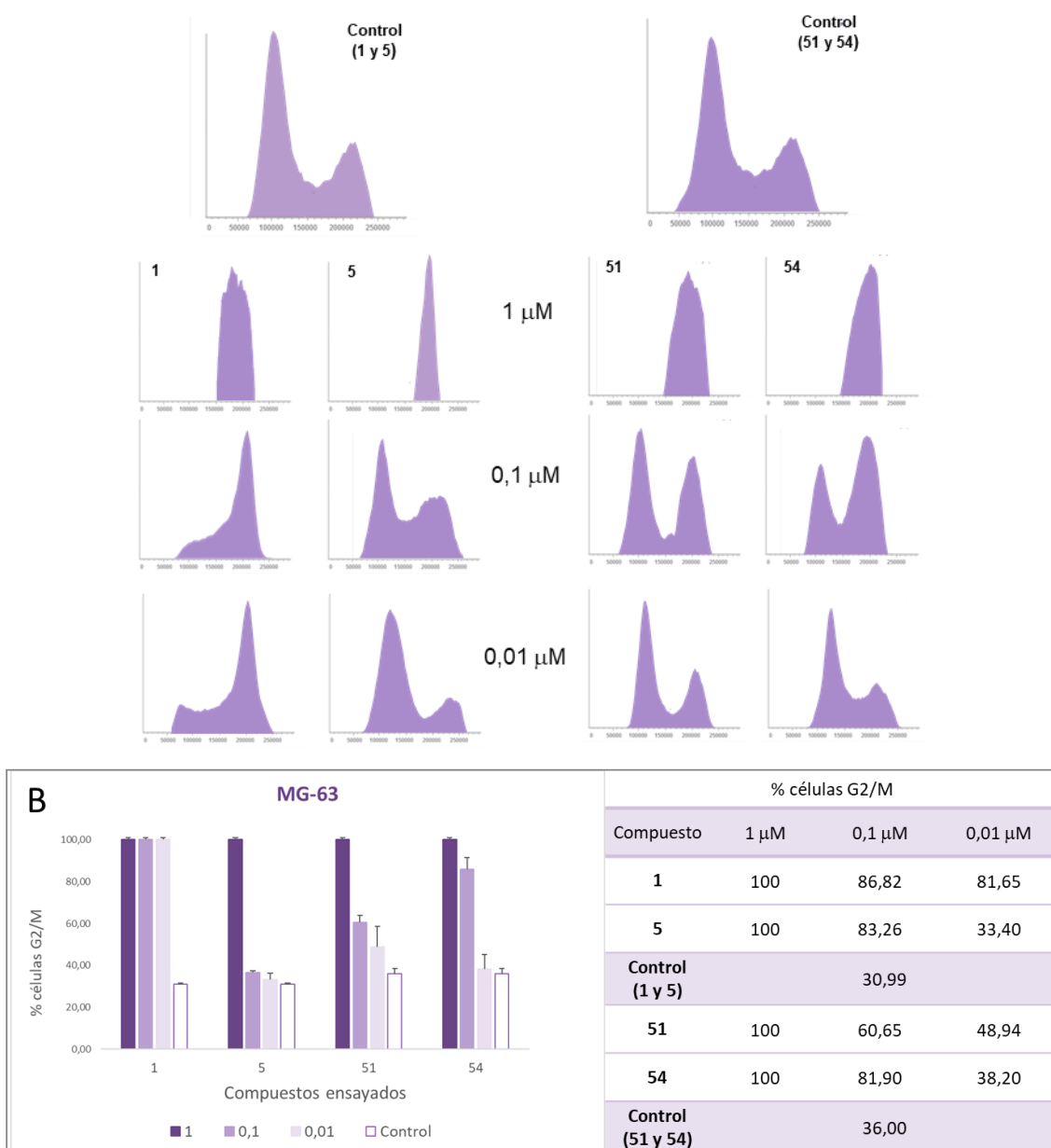


Figura 69: Efecto de los ciclolignanos **1**, **5** y **51**, y del bisciclolignano **54** sobre el ciclo celular determinado por citometría de flujo en la línea MG-63. Las células se incubaron con los compuestos señalados a concentraciones de 1 μ M hasta 0,01 μ M. (A): contenido de ADN analizado por citometría de flujo. (B): porcentaje de células en G2/M.

En la línea HT-29 se ha podido observar un bloqueo total de la fase G2/M del ciclo celular en los precursores **1** y **5** a cualquier concentración, que también aparece a la concentración de 1 μM en el caso de los compuestos **51** y **54**. En este caso, solamente en el 7 β ,9-bisciclolignano **54** se observa un bloqueo parcial a la concentración de 0,1 μM y una ligera actividad en 0,01 μM . Aunque el nuevo híbrido **54** no ha logrado alcanzar los resultados de los precursores, se puede ver una cierta selectividad de este compuesto en esta línea celular.

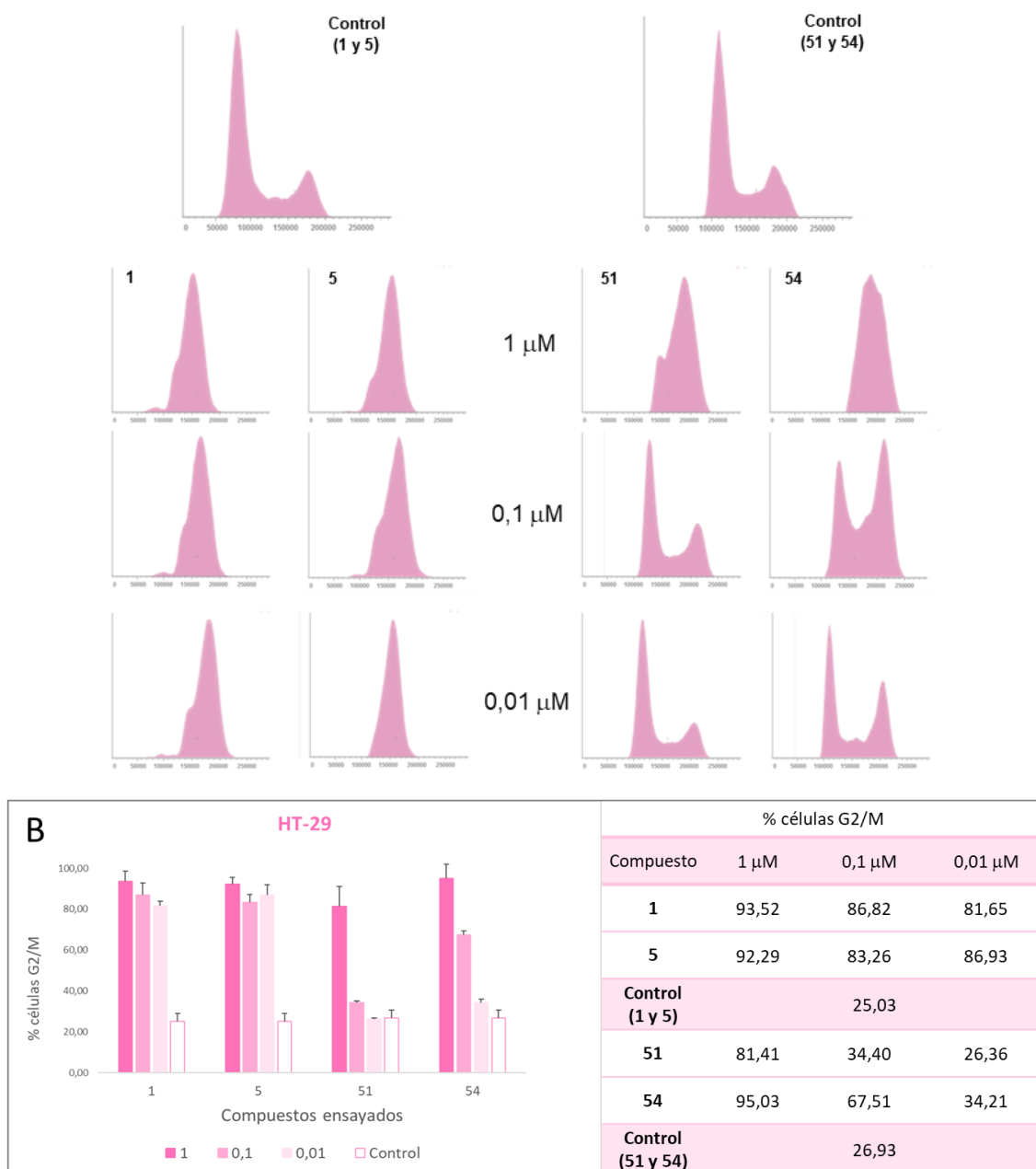


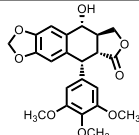
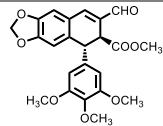
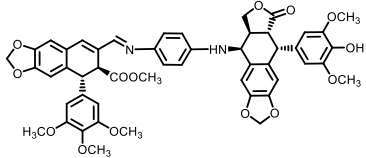
Figura 70: Efecto de los ciclolignanos **1**, **5** y **51**, y del bisciclolignano **54** sobre el ciclo celular determinado por citometría de flujo en la línea HT-29. Las células se incubaron con los compuestos señalados a concentraciones de 1 μM hasta 0,01 μM . (A): contenido de ADN analizado por citometría de flujo. (B): porcentaje de células en G2/M.

4.3.2 Resultados en HT-29 a las 48 h

Por los interesantes resultados obtenidos para el híbrido **54** en HT-29 a las 24 y a las 72 h, se han realizado también los estudios de citometría de flujo a las 48 h en la línea HT-29, utilizando como referencia los ciclolignanos precursores podofiloxina (**1**) y aldehído podofílico (**5**).

El cálculo de la GI₅₀ para el híbrido **54** a las 48 h dio como resultado un valor en el rango de μM (2,02 μM), que contrasta con la nula citotoxicidad observada a ese tiempo de los ciclolignanos **1** y **5**. Así mismo, el estudio sobre la viabilidad celular, también mostró diferencias respecto de los resultados obtenidos a las 24 h.

Tabla 15: Resultados de las GI₅₀ a 48 h de los precursores ciclolignánicos **1** y **5**, y el bisciclolignano **54** en HT-29 comparado con los obtenidos a las 24 h

GI ₅₀ HT-29		
Compuesto	24 h	48 h
 1	>100	>100
 5	>100	>100
 54	>100	2,02 ± 0,78

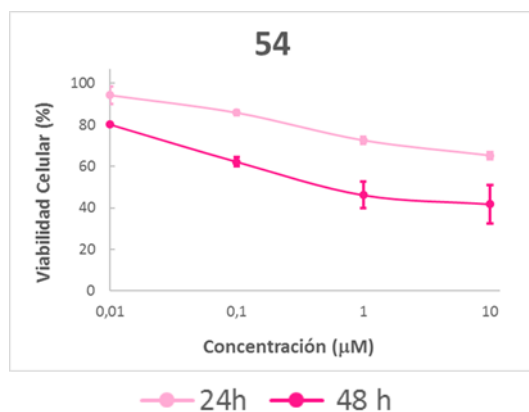


Figura 71: Efecto sobre la viabilidad celular a las 24 y 48 h del bisciclolignano **54**.

Cuando se determinó el efecto apoptótico del nuevo 7 β ,9-bisciclolignano **54** a este tiempo de incubación, se obtuvieron los mejores resultados de apoptosis de todos los compuestos estudiados hasta el momento, resultando incluso activo a la concentración de 0,01 μ M, resultado mucho más activo que a las 24 h.

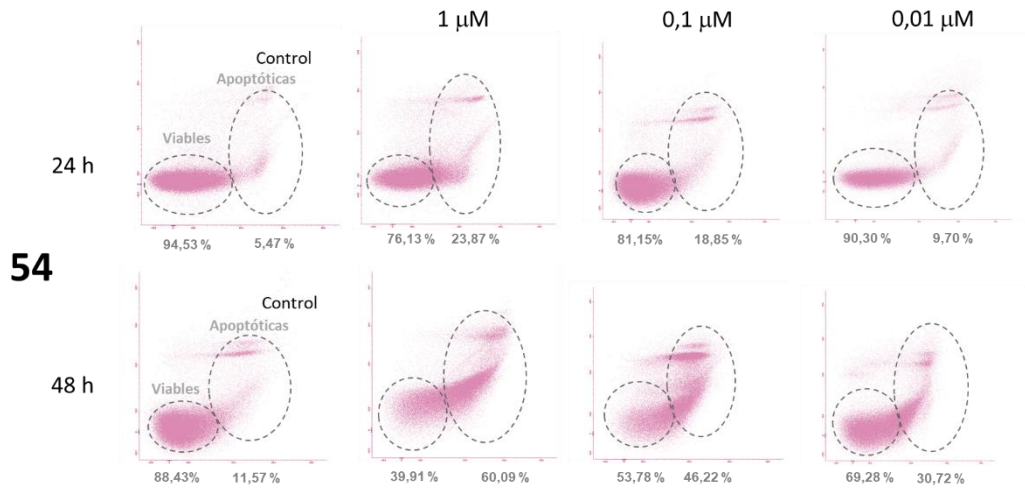


Figura 72: Respuesta apoptótica de la lignohidroquinona **54** en concentraciones de 1-0,01 μ M sobre la línea celular HT-29 a las 24 h y 48 h de incubación.

El comportamiento en la inhibición del ciclo celular se asemeja bastante al obtenido por la lignohidroquinona **46**, observándose un aumento progresivo del bloqueo al aumentar el tiempo de incubación y produciendo este efecto incluso en la concentración más baja ensayada (0,01 μ M), alcanzando el valor de los precursores **1** y **5**.

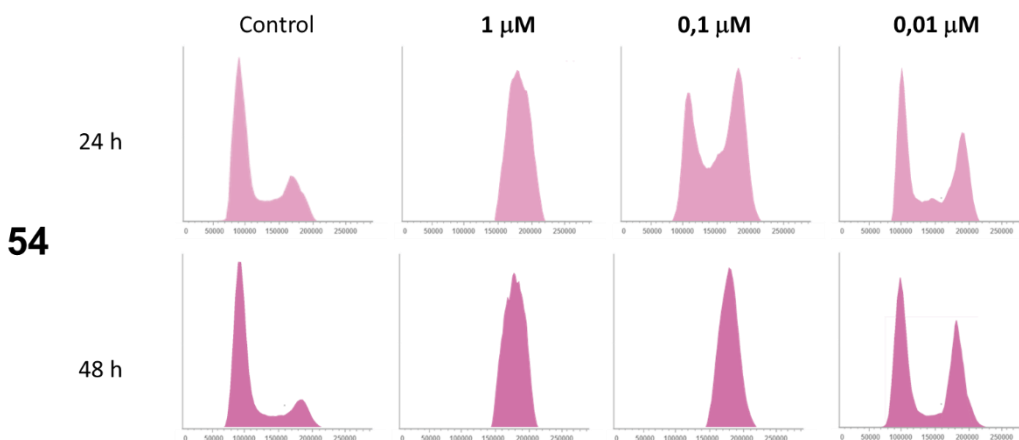


Figura 73: Efecto del bisciclolignano **54** en línea HT-29 a las 24 y 48 h de incubación en las concentraciones de 1 μ M hasta 0,01 μ M. Las células se incubaron con los compuestos señalados a una concentración de 1 μ M. Contenido de ADN analizado por citometría de flujo.

Con la síntesis y evaluación del nuevo 7 β ,9-bisciclolignano **54** se ha iniciado una nueva familia de híbridos de podofilotoxina que presenta unas interesantes características con mucho potencial para continuar con la preparación de más conjugados siguiendo este planteamiento.

De nuevo, la línea MCF-7 ha resultado la menos sensible en todos los ensayos, aunque destaca la actividad obtenida para el precursor de esta familia, el 7 β -ciclolignano **51** que ha presentado un GI₅₀ por debajo de μ M a las 24 h, siendo este valor más bajo que lo que se encuentra descrito en bibliografía para etopósido a las 24 h en la misma línea celular, con valores por encima de μ M (<10 μ M).¹¹⁶

El compuesto **51** también ha presentado activación importante de la apoptosis en esta línea, aunque no se han detectado alteraciones en el ciclo celular por debajo del rango de μ M.

El 7 β ,9-bisciclolignano **54** mantiene la influencia y la selectividad frene a HT-29 aportada por el resto de aldehído podofílico incluido en su estructura, como se hace visible en los resultados de apoptosis donde se alcanzan los valores del precursor, mientras que el 7 β -ciclolignano **51** no presenta esta actividad.

En la línea MG-63 también ha destacado el nuevo híbrido **54** por su citotoxicidad a las 24 h horas, siguiendo el comportamiento de los precursores **1** y **5** pero también por los demás resultados obtenidos en el análisis de la apoptosis y mostrando actividad en rangos de sub- μ M en la línea MG-63, que hasta el momento no se habían observado ni siquiera en la lignohidroquinona **24** que mostró los mejores resultados en esa línea.

Por otro lado, también ha llamado la atención que en los ensayos de inhibición del ciclo celular se puede apreciar una cierta selectividad del 7 β ,9-bisciclolignano **54** en la línea HT-29, que ha mostrado actividad hasta la concentración más baja ensayada (0,01 μ M), por lo que parece que este híbrido mantiene la influencia del resto de aldehído podofílico **5** en su actividad. Además, los ensayos realizados a las 48 h en esta línea

¹¹⁶ Srinivas, C.; Ramaiah, M. J.; Lavanya, A.; Yerramsetty, S.; Kavi Kishor, P. B.; Basha, S. A.; Kamal, A.; Bhadra, U.; Bhadra, M. P. Novel Etoposide Analogue Modulates Expression of Angiogenesis Associated microRNAs and Regulates Cell Proliferation by Targeting STAT3 in Breast Cancer. *PLoS One* **2015**, *10*, e0142006. of Angiogenesis Associated microRNAs and Regulates Cell Proliferation by Targeting STAT3 in Breast Cancer. *PLoS One* **2015**, *10*, e0142006.

también ponen de manifiesto una mejora de la citotoxicidad respecto de los precursores así como un aumento importante de los valores de apoptosis a ese tiempo de incubación.

A través de los resultados de la inhibición del ciclo celular, se ha podido comprobar que existe una influencia del resto de aldehído podofílico incluido en su estructura, aunque con los ensayos realizados no se puede determinar la influencia del fragmento de 4'-desmetilepipodofilotoxina ya que este ensayo de IP no permite diferenciar si el bloqueo en G2/M se corresponde con la inhibición de la topoisomerasa II o con la inhibición de la polimerización de tubulina. A pesar de no poder contar con esa información, el comportamiento diferente de este híbrido a las 48 h respecto de los precursores, induce a pensar que puede haber un mecanismo diferente a la inhibición de la polimerización de la tubulina implicado en la citotoxicidad de este compuesto.

 **PARTE EXPERIMENTAL** 

TECNICAS GENERALES

Instrumentación

Espectroscopia de IR

Los ensayos se llevaron a cabo en dos espectrofotómetros, Nicolet Impact 410 y Spectrum BX (FT-IR System, PerkinElmer), todos ellos en película sobre cristales de NaCl. Los valores de número de onda de máxima vibración (ν_{\max}) se expresan en cm^{-1} .

Espectrometría de masas de alta resolución (HRMS)

Los espectros de masas de alta resolución se adquirieron en un espectrómetro de cuadrupolo-tiempo modelo Applied Biosystems QSTAR XL, empleando el electrospray como modo de ionización a 5500 V y un detector de tiempo de vuelo (ESI-Q-TOF). Los iones observados se expresan como m/z .

Espectroscopia de RMN ^1H y ^{13}C

Se realizaron en un espectrómetro Bruker AC 200 (200 MHz para ^1H y 50,3 MHz para ^{13}C), en un espectrómetro Bruker Advance 400 MHz DRX (400 MHz para ^1H y 100 MHz para ^{13}C), y en un espectrómetro Varian Mercury Vx 400 MHz (400 MHz para ^1H y 100 MHz para ^{13}C) indicándose en las tablas y figuras el uso de cada uno. El disolvente utilizado generalmente fue CDCl_3 , tomando como referencia la señal residual del disolvente sin deuterar. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm y las constantes de acoplamiento (J) en Hz. La multiplicidad de los carbonos se determina utilizando la secuencia de pulsos DEPT (Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer). La secuencia distingue los carbonos protonados CH , CH_2 y CH_3 utilizando pulsos de protón a través del desacoplador a 90 y 135°.

Microondas

Para llevar a cabo reacciones por irradiación con microondas, se empleó un equipo Anton Para Monowave 300 reactor de microondas monomodo

Técnicas cromatográficas

Cromatografía en capa fina

Para llevar a cabo el control de las reacciones se utilizaron láminas de poliéster Polychrom Si F254 de 0,25 mm de espesor de capa con recubrimiento de gel de sílice y con indicador fluorescente UV254. Las sustancias que se observan al UV, se visualizaron por iluminación con luz UV de $\lambda = 254$ nm y $\lambda = 336$ nm.

Cromatografía en columna

Se utilizaron columnas de vidrio rellenas con gel de sílice Merk 60 (0,040 – 0,063 mm) y Alúmina básica 60 (0,063 – 0,200 mm) de Actividad II (preparada por desactivación de la alúmina de actividad I por adición del correspondiente porcentaje de agua) normalmente en proporción 50-60 g de fase estacionaria por cada gramo de sustancia a cromatografiar.

Preparación de disolventes

Acetonitrilo (CH₃CN): se utilizó acetonitrilo comercial secado sobre CaCl₂.

Diclorometano (CH₂Cl₂): se utilizó diclorometano comercial secado sobre CaCl₂ o tamiz molecular de 0,4 nm. Cuando se utilizó para las reacciones de aminación reductora, el diclorometano seco se mantuvo en agitación con NaHCO₃ durante 10 min previamente a su utilización.

Dimetilformamida (DMF): el disolvente comercial se secó sobre tamiz molecular de 0,4 nm. Cuando fue necesario, se mantuvo en agitación con K₂CO₃ durante 10 min previamente a su utilización.

Dimetilsulfóxido (DMSO): se utilizó dimetilsulfóxido comercial conservado sobre tamiz molecular de 0,4 nm.

Diétil éter (Et₂O): para análisis es secado sobre láminas de sodio.

n-Hexano (*Hex*): se destiló el hexano comercial en columna de rectificación, recogién dose sobre CaCl_2 .

Metanol (*MeOH*): Se utilizó el comercial, que se secó sobre tamiz molecular de 0,4 nm cuando se requirieron condiciones anhidras.

Tetrahidrofurano (*THF*): se destiló el comercial inmediatamente antes de usarse sobre sodio laminado, bajo atmósfera de argón usando benzofenona como indicador.

Tolueno: se almacenó sobre láminas de sodio.

Metodologías sintéticas generales

Oxidaciones de Swern

A un matraz de reacción de 3 bocas conteniendo CH_2Cl_2 seco se le acoplaron dos embudos de adición de presión compensada, poniéndose en uno de ellos una disolución de dimetilsulfóxido en CH_2Cl_2 y en el otro una disolución de dihidroxiester también en CH_2Cl_2 . Al matraz también se le acopló un séptum y se sellaron todas las uniones con *Parafilm*[®]. Tras eliminar el aire por succión a vacío, el matraz se llevó a $-55\text{ }^\circ\text{C}$ y se mantuvo durante todo el proceso en atmósfera inerte y agitación. En primer lugar, se añadió a través del septum una disolución de cloruro de oxalilo en CH_2Cl_2 . Después de 5 min se añadió gota a gota la disolución de dimetilsulfóxido y tras otros 5 min se adicionó lentamente la disolución del dihidroxiester, manteniéndose la mezcla de reacción en las mismas condiciones durante 30 min más. Transcurrido este tiempo se añadió lentamente trietilamina y se elevó la temperatura lentamente hasta $0\text{ }^\circ\text{C}$, permaneciendo en estas condiciones 60 min más, tras lo cual se añadió agua a la mezcla de reacción. Finalizada la reacción, se diluyó con AcOEt y la fase orgánica se lavó consecutivamente con una disolución acuosa de HCl 2 N y con disoluciones acuosas saturadas de NaHCO_3 y NaCl hasta pH neutro. La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro y el disolvente se evaporó hasta obtener el aldehído deseado.

1. Obtención de precursores ciclolignánicos

• Aislamiento de podofilotoxina a partir de la resina comercial de *Podophyllum emodi*

25,0 g de resina comercial de *Podophyllum emodi* Wall. (Berberidaceae) se suspendieron en 100 mL de hexano caliente, separándose 994 mg de fracción soluble I. La fracción insoluble I se disolvió en AcOEt caliente (200 mL) obteniéndose 23,0 g de fracción soluble II.

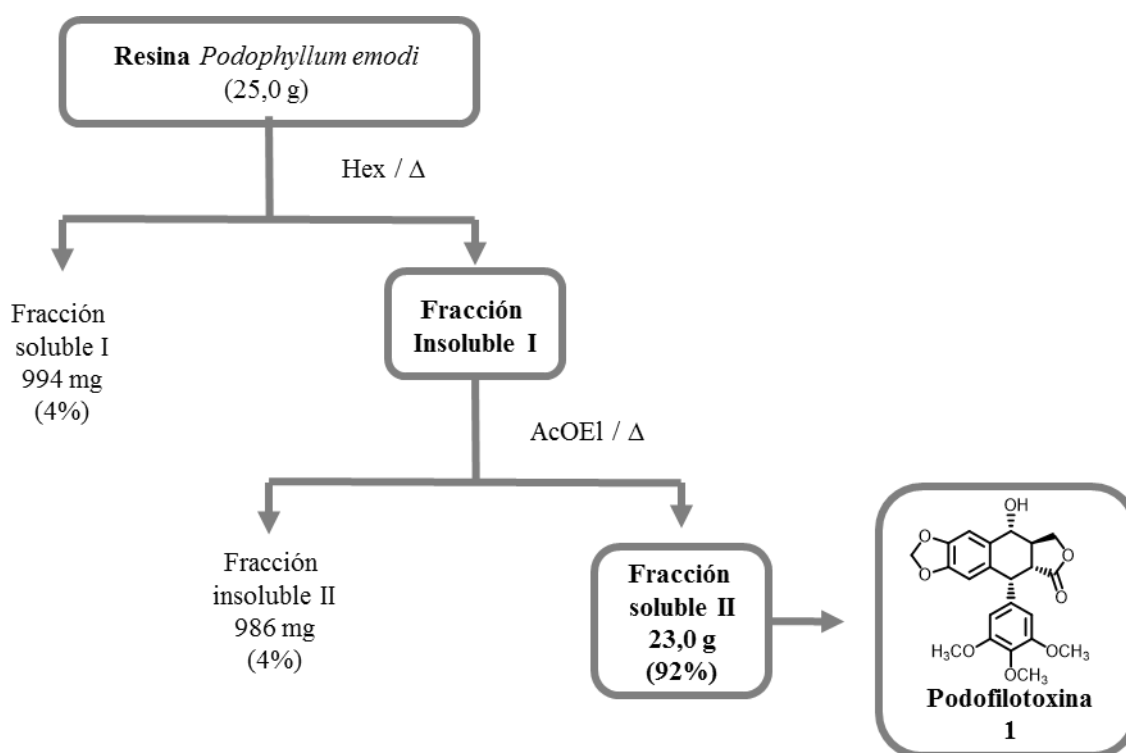


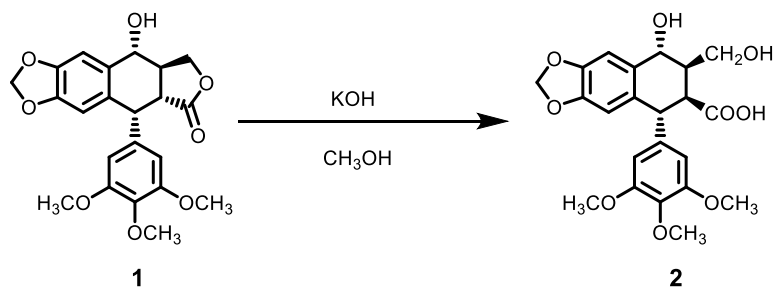
Figura 72: Aislamiento de podofilotoxina 1.

La fracción soluble II (23,0 g) se cromatografía sobre alúmina neutra de actividad II, eluyéndose con una mezcla de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (97:3) 6,79 g (29,5 %) de podofilotoxina 1.

RMN ^1H : tabla I.

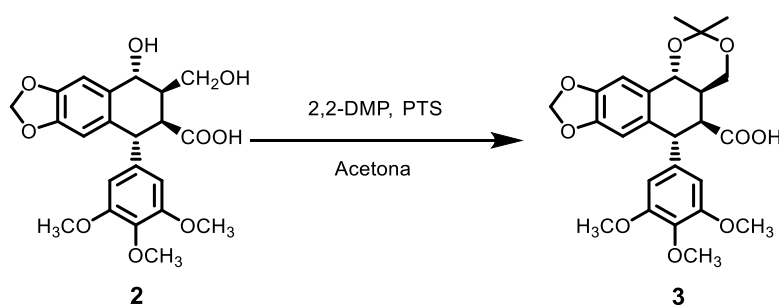
RMN ^{13}C : tabla II.

• Obtención del ácido picropodofílico 2



500 mg (1,21 mmol) de podofilotoxina, **1**, disueltos en 10 mL de CH₃OH se hicieron reaccionar con 40 mL de una disolución metanólica de KOH al 5 %. Esta mezcla se mantuvo en agitación y temperatura ambiente durante 2 h. Pasado ese tiempo se añadió agua y se aciduló con HCl 2 N hasta pH 4. Se evaporó el disolvente y se extrajo con AcOEt. La fase orgánica se lavó con una disolución acuosa saturada de NaCl hasta pH neutro, se secó la fase orgánica con Na₂SO₄ anhidro y tras evaporar el disolvente se obtuvieron 476 mg (94 %) del ácido picropodofílico **2**.

• Obtención del acetónido 3



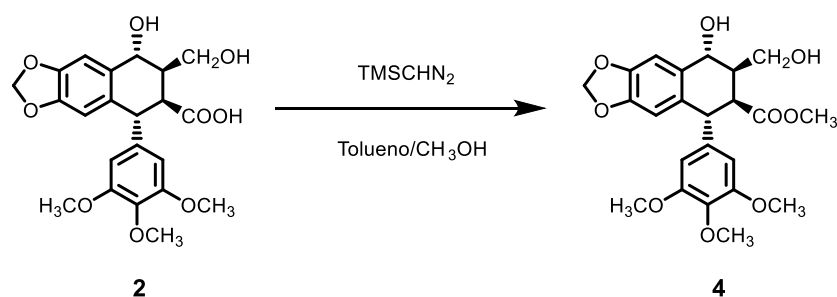
200 mg (0,460 mmol) de ácido picropodofílico, **2**, disueltos en 4,0 mL de acetona se hicieron reaccionar con 170 µL (1,38 mmol) de 2,2-dimetoxipropano y 23 mg (10 µmol) de *p*-toluensulfonato de piridinio durante 1,5 h a temperatura ambiente y agitación. Transcurrido ese tiempo, se añadió agua y se evaporó el disolvente orgánico de la reacción. Se extrajo con AcOEt y la fase orgánica obtenida se lavó con una disolución acuosa saturada de NaCl, se secó con Na₂SO₄ anhidro y se evaporó el disolvente obteniéndose 190 mg (88 %) del acetónido **3**.

RMN ^1H : tabla I, figura I

RMN ^{13}C : tabla II, figura I

IR (ν_{max}): 1706 (COOH) cm^{-1} .

• Obtención del picropodofilato de metilo



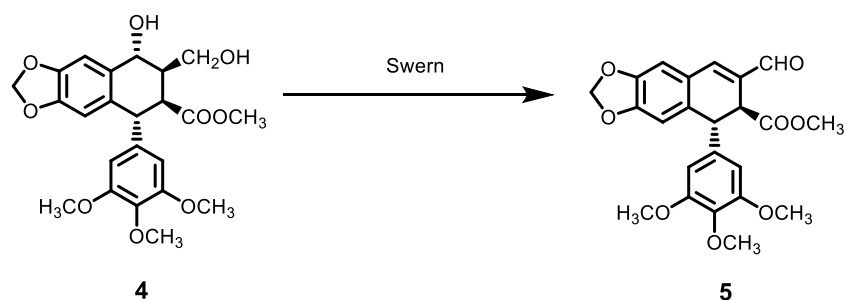
200 mg (0,460 mmol) de ácido picropodofílico, **2**, se hicieron reaccionar con una disolución de trimetilsilildiazometano 2 M en hexano (116 μL , 0,232 mmol) en una mezcla de tolueno: metanol (20 mL, 1:1) durante 14 h a temperatura ambiente y atmósfera inerte. Transcurrido ese tiempo, se evaporó el disolvente, obteniéndose 210 mg de un producto de reacción que contiene el picropodofilato de metilo **4** (80 %) junto con resto del producto de partida.

RMN ^1H : tabla I, figura II

RMN ^{13}C : tabla II, figura II

IR ($\nu_{\text{máx}}$): 3620, 3500 (OH), 1735 (COOR) cm^{-1} .

• Obtención del aldehído podofílico 5



Una disolución de picropodofilato de metilo, **4**, (200 mg, 0,490 mmol) en CH₂Cl₂ seco (2,5 mL) se hizo reaccionar con cloruro de oxalilo 2,0 M en CH₂Cl₂ (1,7 mL, 3,4 mmol), dimetilsulfóxido (192 µL, 2,68 mmol) disuelto en CH₂Cl₂ (1,0 mL) y trietilamina (0,64 mL, 4,4 mmol), siguiendo para ello el procedimiento general descrito para las oxidaciones de Swern. El producto de reacción obtenido se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice, eluyéndose con una mezcla de CH₂Cl₂: AcOEt (9:1) 172 mg (90 %) del aldehído podofílico **5**.

RMN ¹H: tabla I, figura II

RMN ¹³C: tabla II, figura II

IR (ν_{máx}): 1740 (COOR), 1680 (CHO) cm⁻¹.

2. Lignohidroquinonas a partir de derivados diterpénicos.

2.1. Obtención de precursores diterpenilhidroquinónicos.

2.1.1. Aislamiento de ácido mirceocomúnico 6

1,521 kg de arcéstidas secas y trituradas de *Juniperus oxycedrus* recolectadas en La Fregeneda (Salamanca) se extrajeron con n-hexano en un aparato soxhlet durante 16 h, obteniéndose el extracto bruto que se mantiene a -20 °C durante una noche. Transcurrido ese tiempo, se filtran las ceras con un embudo büchner, se evapora el disolvente y se redisuelve en metanol para proceder de la misma manera que anteriormente. Tras filtrar y evaporar el disolvente se obtienen 63,9 g (4,2 % del peso de las arcéstidas) de extracto descerado. Este extracto se disuelve en éter y se realiza el fraccionamiento ácido-base con una disolución acuosa de NaOH 4 %, de donde se obtienen 51,1 g (80%) de fracción ácida (3,6 % del peso de arcéstidas inicial), tal y como se representa en la siguiente figura

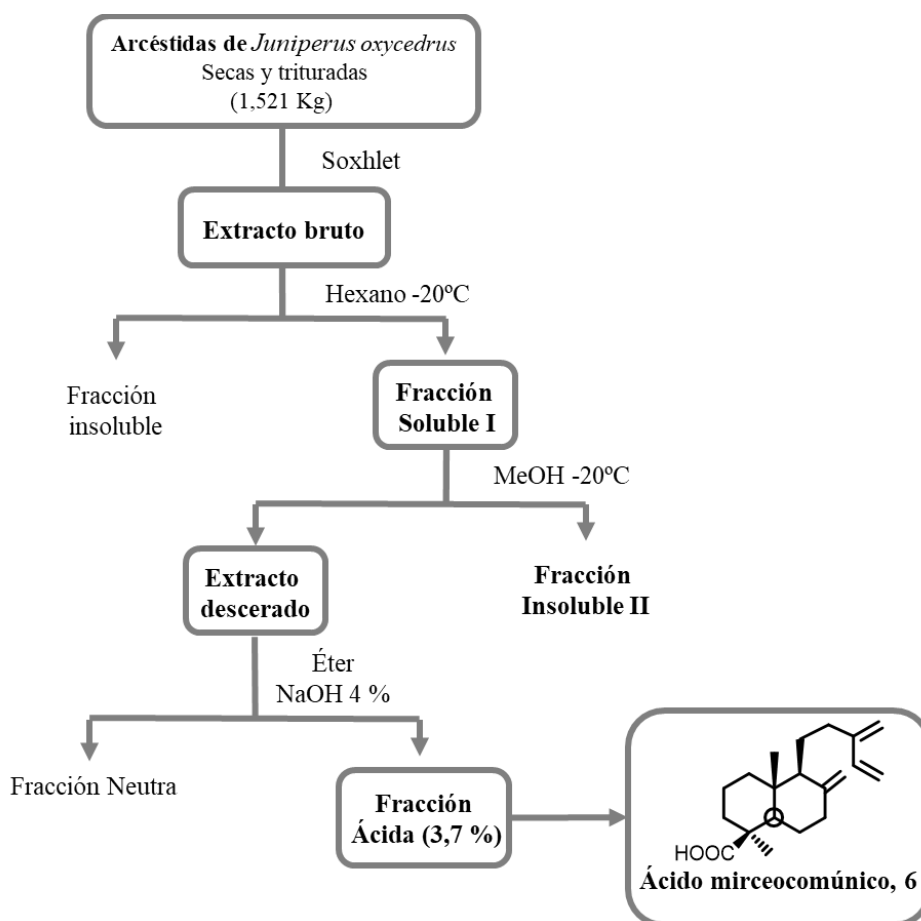


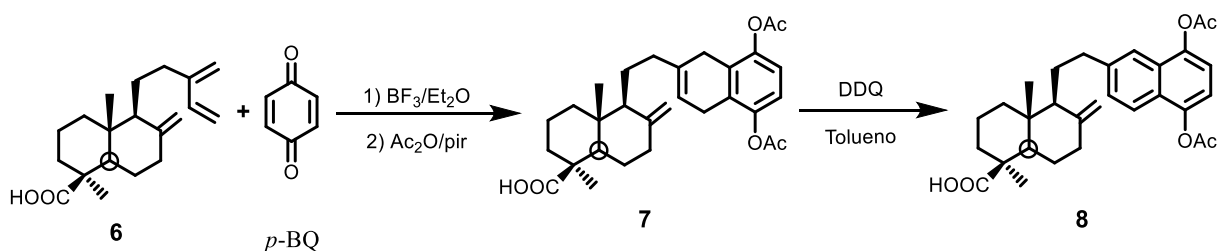
Figura 73: Aislamiento de ácido mirceocomúnico 6

La fracción ácida obtenida se cromatografió sobre gel de sílice, eluyéndose con una mezcla de Hex/AcOEt (9:1) 31,9 g (2,1 % respecto del peso de árcestidas extraídas) de ácido mirceocomúnico **6**.

RMN ¹H: tabla III, figura III

RMN ¹³C: tabla IV, figura III

2.1.2. Obtención de las diterpenilhidroquinonas **7** y **8**



A una disolución de *p*-benzoquinona (153 mg, 1,42 mmol) y ácido mirceocomúnico (457 mg, 1,52 mmol) disueltos en 20 mL de éter etílico seco en atmósfera inerte, temperatura ambiente y agitación se le adicionaron 15 μL de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$. La reacción se mantuvo en las condiciones indicadas anteriormente durante 24 h. Pasado ese tiempo se añadió éter y se lavó la fase orgánica con disolución acuosa saturada de NaCl, se secó con Na_2SO_4 anhidro y se evaporó el disolvente obteniéndose el producto de reacción correspondiente.

Este producto de reacción se disolvió en piridina (1 mL) y se hizo reaccionar con anhídrido acético (1 mL) en oscuridad durante 24 h. Pasado ese tiempo se hidrolizó el exceso de anhídrido acético añadiendo hielo picado. Se extrajo con AcOEt y se lavó sucesivamente la fase orgánica resultante con una disolución acuosa de HCl 2 N y una disolución acuosa saturada NaCl. La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se evaporó el disolvente y se obtuvieron, obteniendo 725 mg de producto de acetilación que se cromatografió sobre gel de sílice, eluyéndose con una mezcla de Hex:AcOEt (6:4) 564 mg (82%) de la diterpenilnaftohidroquinona acetilada **7**.

A una disolución de **7** (564 mg, 1,16 mmol) en tolueno seco (30 mL), se le añadió 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ) (527 mg, 2,32 mmol) y se mantuvo a temperatura ambiente y agitación constante durante 1 h. h. Transcurrido ese tiempo se evaporó el disolvente de la reacción, se extrajo con AcOEt y se lavó la fase orgánica con

una disolución acuosa saturada de NaHCO_3 y con una disolución acuosa saturada de NaCl . Se secó la fase orgánica con Na_2SO_4 anhidro y se evaporó el disolvente. El producto de reacción se cromatografió sobre gel de sílice, eluyéndose con una mezcla de Hex:AcOEt (6:4) 326 mg de la diterpenilnaftohidroquinona acetilada **8** (50 % respecto de la *p*-BQ de partida).

Compuesto **7**

RMN ^1H : tabla III, figura IV

RMN ^{13}C : tabla IV, figura IV

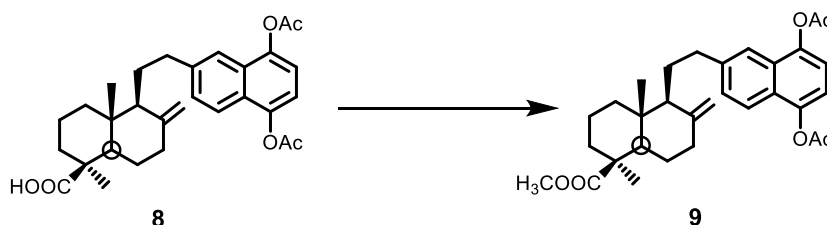
Compuesto **8**

RMN ^1H : tabla III, figura V

RMN ^{13}C : tabla IV, figura V

HRMS calculada para $\text{C}_{30}\text{H}_{16}\text{O}_6 + \text{H}^+$ 493,2590 u; encontrada 493,2576 *m/z*

2.1.3. Obtención de las diterpenilhidroquinona **9**



100 mg (0,20 mmol) de diterpenilhidroquinona **8** se hicieron reaccionar con una disolución de trimetilsilildiazometano 2 M en hexano (50 μL , 0,10 mmol) en una mezcla de tolueno: metanol (10 mL, 1:1) durante 14 h a temperatura ambiente y atmósfera inerte y oscuridad. Transcurrido ese tiempo, se evaporó el disolvente, obteniéndose 105 mg de un producto de reacción que contiene la diterpenilhidroquinona **9** (95 %) junto con restos del producto de partida.

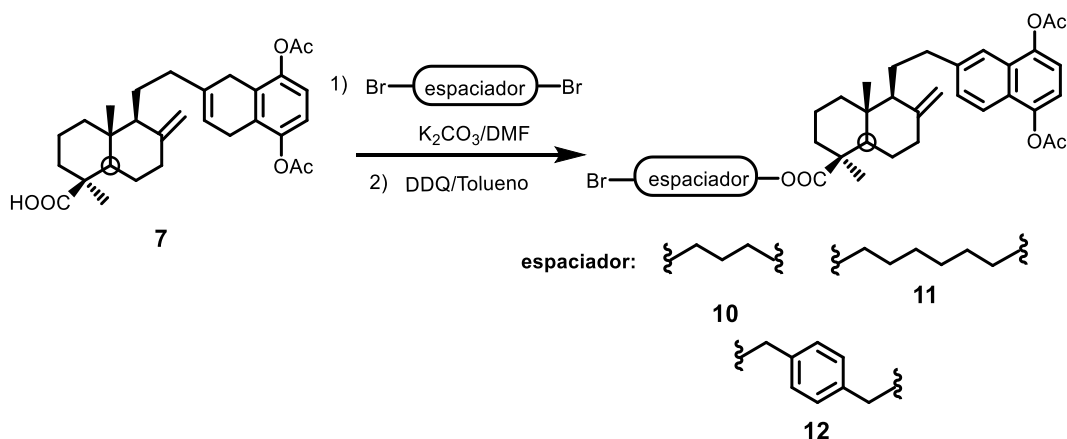
RMN ^1H : tabla III, figura IV

RMN ^{13}C : tabla IV, figura IV

HRMS calculada para $\text{C}_{31}\text{H}_{18}\text{O}_6 + \text{H}^+$ 507,2747 u; encontrada 507,2701 *m/z*

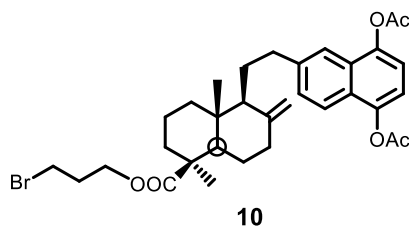
2.2. Obtención de las lignohidroquinonas 22-24

2.2.1. Unión de los espaciadores



A una disolución de **7** (0,30-0,77 mmol) en DMF (1,5 mL) se añadió K₂CO₃ (0,90-2,35) y se mantuvo en agitación durante 15 min. Transcurrido ese tiempo, se añadió el correspondiente derivado dibromado y se agitó la mezcla durante 2 h más. Finalizada la reacción, se añadió H₂O a la misma y se extrae con AcOEt. La fase orgánica se lavó con una disolución acuosa saturada de NaCl, se secó con Na₂SO₄ anhidro y se evaporó el disolvente obteniendo el producto de reacción. El producto sin purificar se disolvió en tolueno (10 mL), se añadió DDQ y se mantuvo en agitación constante y temperatura ambiente durante 1 h. Una vez finalizado el tiempo de reacción, se evaporó el disolvente y el crudo se disolvió en AcOEt, se lavó con una disolución saturada de NaHCO₃ y con una disolución acuosa saturada de NaCl. Se secó la fase orgánica con Na₂SO₄ anhidro y se evaporó el disolvente. El producto de reacción se cromatografió sobre gel de sílice, obteniendo la correspondiente diterpenilnaftohidroquinonas alquiladas (**10-12**).

- Compuesto **10**



A partir de **7** (189 mg, 0,39 mmol), K₂CO₃ (162 mg, 2,18 mmol), 1,3-dibromopropano (118 μL, 1,18 mmol) y DMF seguido de la oxidación con DDQ (133

mg, 0,59 mmol). El producto de reacción se eluyó con una mezcla de Hex/AcOEt (7:3) obteniendo el compuesto **10** (142 mg, 61 %).

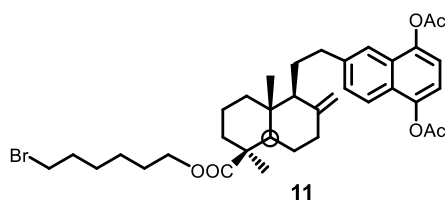
RMN ^1H : tabla V, figura VII

RMN ^{13}C : tabla VI, figura VII

IR (ν_{max}): 1764, 1710 (COOR) cm^{-1}

HRMS calculada para $\text{C}_{33}\text{H}_{41}\text{BrO}_6 + \text{NH}_4^+$ 630,2424 u; encontrada 630,2414 m/z

- **Compuesto 11**



A partir de **7** (375 mg, 0,77 mmol), K_2CO_3 (323 mg, 2,35 mmol), 1,6-dibromopropano (235 μL , 1,18 mmol) y DMF seguido de la oxidación con DDQ (247 mg, 1,15 mmol). El producto de reacción se eluyó con una mezcla de Hex/AcOEt (6:4) obteniendo el compuesto **11** (271 mg, 55 %).

RMN ^1H : tabla V, figura VIII

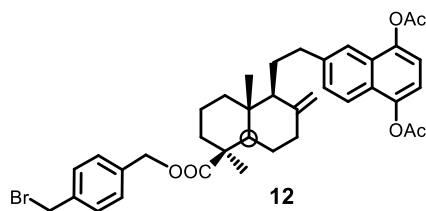
RMN ^{13}C : tabla VI, figura VII

IR (ν_{max}): 1765, 1720 (COOR) cm^{-1}

HRMS calculada para $\text{C}_{36}\text{H}_{47}\text{BrO}_6 + \text{NH}_4^+$ 672,2894 u; encontrada 672,2895 m

Compuesto 11 también se obtuvo: a partir de **8** (135 mg, 0,49 mmol), K_2CO_3 (202 mg, 1,47 mmol), 1,6-dibromopropano (147 μL , 1,47 mmol) y DMF seguido de la oxidación con DDQ (157 mg, 0,73 mmol). El producto de reacción se eluyó con una mezcla de Hex/AcOEt (6:4) obteniendo el compuesto **11** (125 mg, 51 %).

- **Compuesto 12**



A partir de **7** (144 mg, 0,30 mmol), K₂CO₃ (123 mg, 0,90 mmol), α,α'-dibromo-*p*-xileno (238 mg, 0,90 mmol) y DMF seguido de la oxidación con DDQ (97 mg, 0,45 mmol). El producto de reacción se eluyó con una mezcla de Hex/AcOEt (6:4) obteniendo el compuesto **12** (88 mg, 43 %).

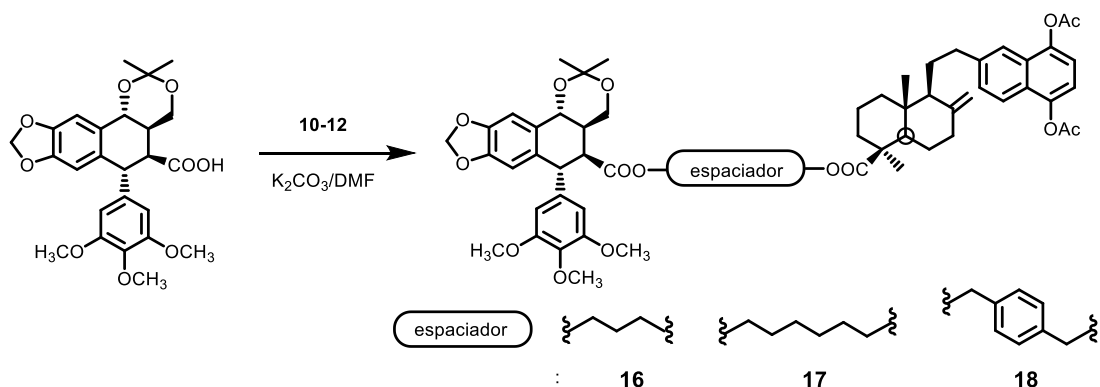
RMN ¹H: tabla V, figura IX

RMN ¹³C: tabla VI, figura IX

IR (ν_{max}): 1764, 1710 (COOR) cm⁻¹

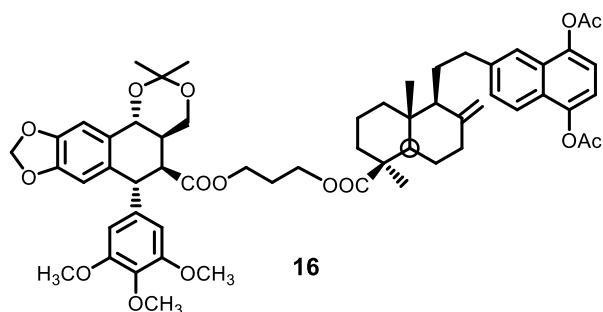
HRMS calculada para C₃₈H₄₃BrO₆+NH₄⁺ 692,2541 u; encontrada 692,2573 *m/z*

2.2.2. Obtención de las lignohidroquinonas 16-18



A una disolución del ácido **3** en DMF seca (1,5 mL) se le añadió K₂CO₃ y se mantuvo en agitación durante 15 min. A continuación, se añadió el correspondiente derivado bromado (**10-12**) disuelto en DMF (1 mL), manteniendo la mezcla en agitación durante 3 h. El crudo de reacción, se diluyó en AcOEt y agua, y la fase orgánica se lavó con una disolución acuosa saturada de NaCl. Se secó la fase orgánica con Na₂SO₄ anhidro y se evaporó el disolvente. El producto de reacción se cromatografió sobre gel de sílice, obteniendo las lignohidroquinonas correspondientes (**16-18**).

- Compuesto **16**:

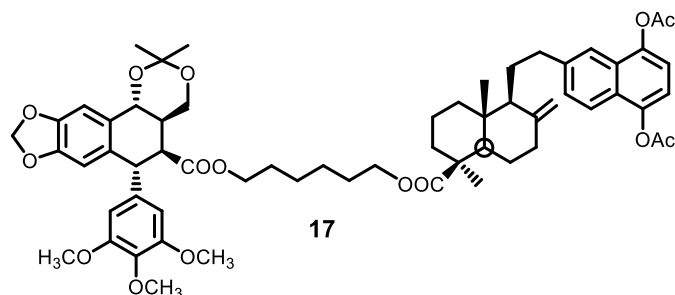


A partir de **3** (113 mg, 0,24 mmol), K_2CO_3 (99 mg, 0,72 mmol), **10** (126 mg, 0,20 mmol) en DMF seca (2,5 mL). El producto de reacción se eluyó con una mezcla de Hex/AcOEt (1:1) obteniendo el compuesto **16** (120 mg, 58 %).

RMN 1H : tabla VII, figura X

RMN ^{13}C : tabla VIII, figura X

- Compuesto **17**

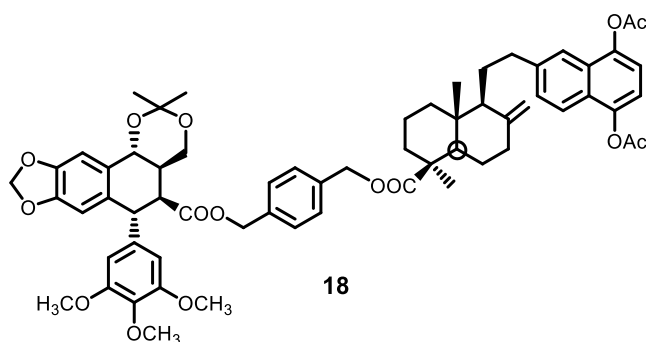


a partir de **3** (152 mg, 0,32 mmol), K_2CO_3 (127 mg, 0,92 mmol), **11** (165 mg, 0,32 mmol) en DMF seca (2,5 mL) utilizando el método general durante 3 h. El producto de reacción se eluyó con una mezcla de Hex/AcOEt (6:4) obteniendo el compuesto **17** (174 mg, 55 %).

RMN 1H : tabla VII, figura XI

RMN ^{13}C : tabla VIII, figura XI

• **Compuesto 18**

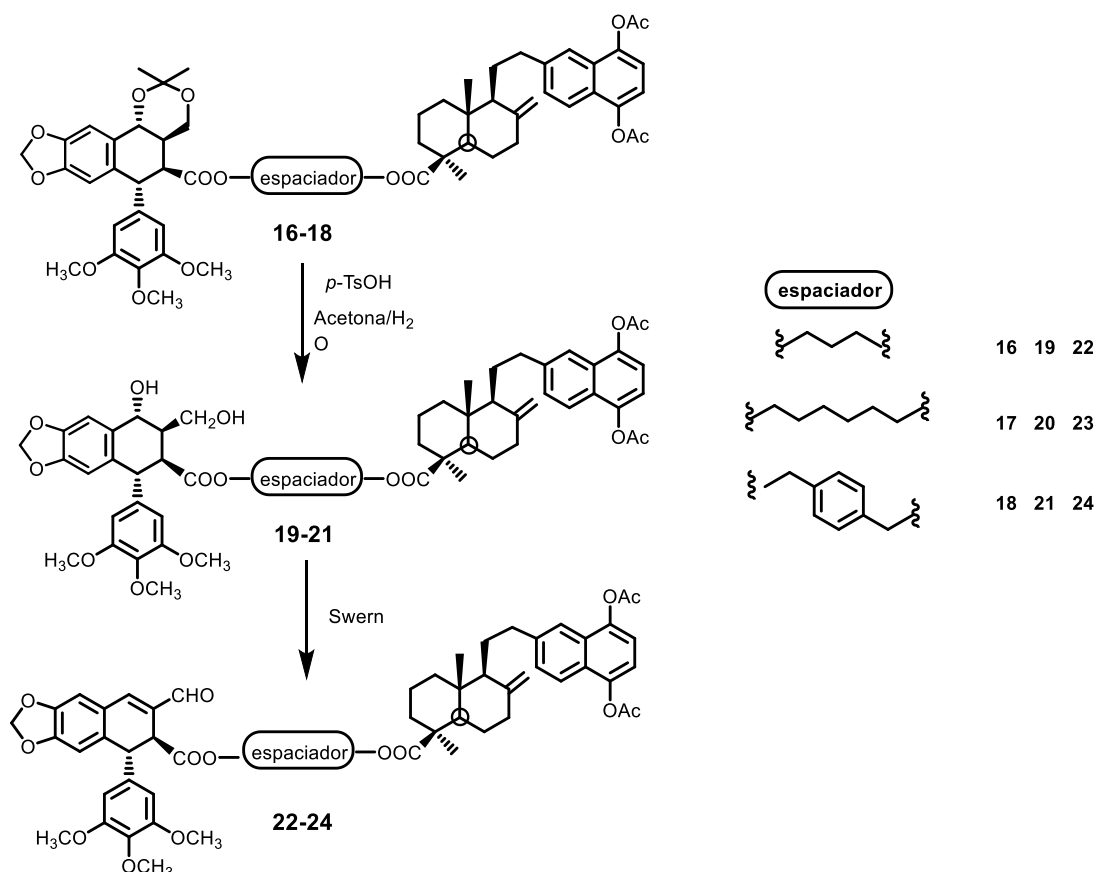


A partir de **3** (86 mg, 0,13 mmol), K_2CO_3 (54 mg, 0,39 mmol), **12** (84 mg, 0,13 mmol) en DMF seca (2,5 mL) utilizando el método general durante 3 h. El producto de reacción se eluyó con una mezcla de Hex/AcOEt (1:1) obteniendo el compuesto **17** (70 mg, 51 %).

RMN 1H : tabla VII, figura XII

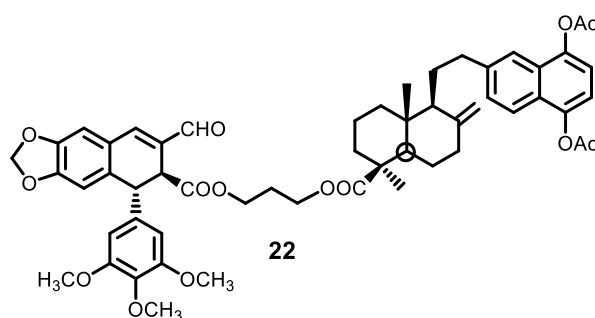
RMN ^{13}C : tabla VIII, figura XII

2.2.3. Obtención de aldehídos 22-24



Los acétonidos-lignoquinónicos (**16-18**) se disolvieron en una mezcla de acetona/agua (8:2) (10 mL) a la que se añadió ácido *p*-toluensulfónico (10 mg, 0,01 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se evaporó la acetona a vacío, se añadió AcOEt y el crudo se lavó con una disolución saturada acuosa de NaCl, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se evaporó el disolvente. Los dihidroxiésteres obtenidos (**19-21**) se oxidaron bajo las condiciones de Swern descritas en la metodología general. Finalizada la reacción, el producto se cromatografió sobre gel de sílice, eluyéndose con una mezcla de CH₂Cl₂/ AcOEt (8:2) los correspondientes aldehídos lignohidroquinónicos (**22-24**).

- Compuesto **22**



A partir de **16** (155 mg, 0,15 mmol) siguiendo la desprotección descrita y la metodología general para las reacciones de Swern, obteniendo el **22** (75 mg, 51 %)

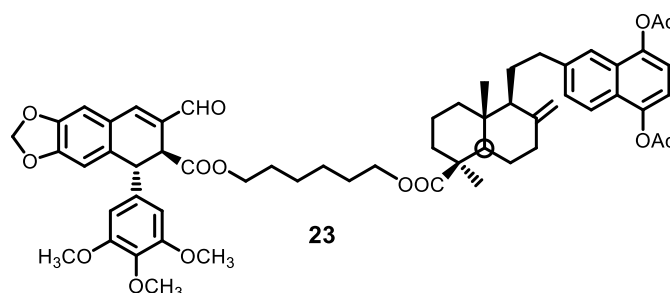
RMN ¹H: tabla IX, figura XIII

RMN ¹³C: tabla X, figura XIII

IR (ν_{max}): 1671 (CHO), 1764, 1723 (COOR) cm⁻¹

HRMS calculada para C₅₅H₆₀O₁₄+Na⁺ 967,3875 u; encontrada 967,3884 *m/z*

- Compuesto **23**



A partir de **17** (140 mg, 0,15 mmol) siguiendo la desprotección descrita y la metodología general para las reacciones de Swern, obteniendo el **23** (70 mg, 50 %).

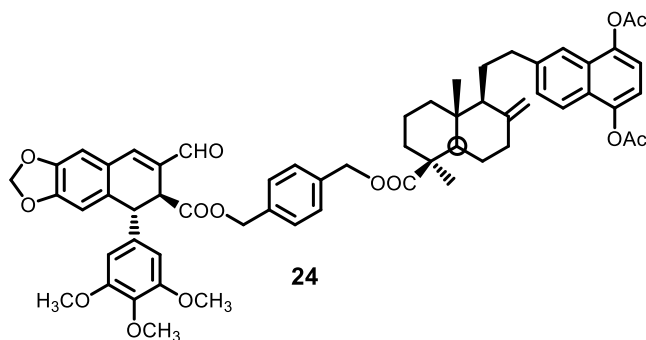
RMN ¹H: tabla IX, figura XIV

RMN ¹³C: tabla X, figura: XIV

IR (ν_{max}): 1672 (CHO), 1765, 1717 (COOR) cm⁻¹

HRMS calculada para C₅₈H₆₆O₁₄+Na⁺ 1009,4344 u; encontrada 1009,4346 m/z

- Compuesto **24**



A partir de **18** (158 mg, 0,15 mmol) siguiendo la desprotección descrita y la metodología general para las reacciones de Swern, obteniendo el **24** (73 mg, 48 %).

RMN ¹H: tabla IX, figura XV

RMN ¹³C: tabla X, figura XV

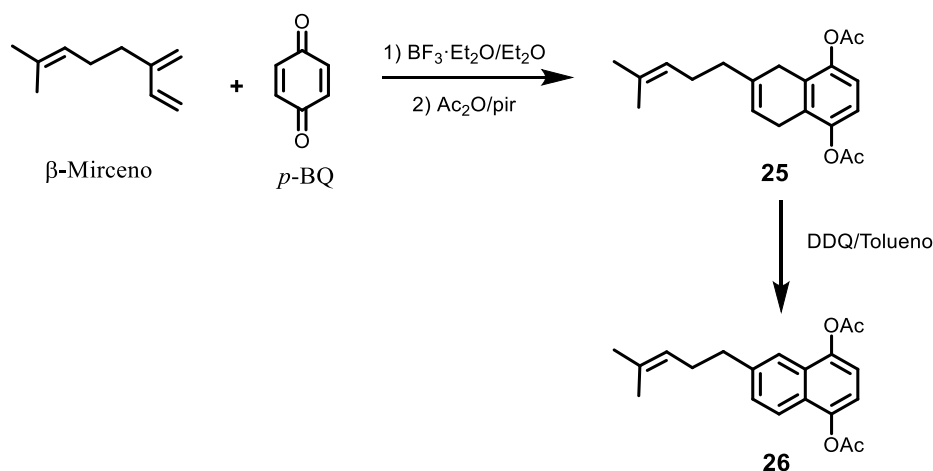
IR (ν_{max}): 1671 (CHO), 1764, 1723 (COOR) cm⁻¹

HRMS calculada para C₆₀H₆₂O₁₄+Na⁺ 1029,4032 u; encontrada 1029,4029 m/z

3. Lignohidroquinonas a partir de derivados monoterpénicos

3.1. Obtención de precursores monoterpenilhidroquinónicos

3.1.1. Obtención de la monoterpenilhidroquinona 26



A una disolución de *p*-benzoquinona (1,16 g, 10,7 mmol) y β -mirceno (1,87 mL, 11,7 mmol) disueltos en 40 mL de éter etílico seco en atmósfera inerte, temperatura ambiente y agitación se le adicionaron 100 μL de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$. La reacción se mantuvo en las condiciones indicadas durante 36 h. Pasado ese tiempo se añadió éter y se lavó la fase orgánica con disolución acuosa saturada de NaCl, se secó con Na_2SO_4 anhidro y se evaporó el disolvente obteniéndose un producto de reacción que se disolvió en piridina (5 mL) y se hizo reaccionar con anhídrido acético (5 mL) en oscuridad durante 24 h. Pasado ese tiempo se hidrolizó el exceso de anhídrido acético añadiendo hielo picado. Se extrajo con AcOEt y se lavó sucesivamente la fase orgánica resultante con una disolución acuosa de HCl 2 N, disoluciones acuosas saturadas de NaHCO_3 y NaCl. La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se evaporó el disolvente y se obtuvieron 3,03 g del compuesto **25**.

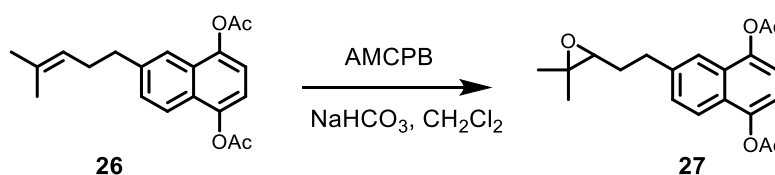
A una disolución de **25** (2,02 g, 6,11 mmol) en benceno seco (50 mL) se añadió DDQ (2,12 g, 9,25 mmol) y se mantuvo a temperatura ambiente y agitación constante durante 1 h. Trascorrido ese tiempo se evaporó el disolvente de la reacción, se extrajo con AcOEt y se lavó esa fase orgánica con una disolución acuosa saturada de NaHCO_3 y con una

disolución acuosa saturada de NaCl. Se secó la fase orgánica con Na₂SO₄anhidro y se evaporó el disolvente. El producto de reacción se cromatografió sobre gel de sílice, eluyéndose con una mezcla de Hex/AcOEt (8:2) 1,54 g (78 %) de la naftohidroquinona acetilada **26**.

RMN ¹H: tabla XI, figura XVII

RMN ¹³C: tabla XII.

3.1.2. Obtención del epóxido **27**



Una disolución del diacetato **26** (418 mg, 1,27 mmol) disuelto en 20 mL CH₂Cl₂ se hizo reaccionar con ácido *m*-cloroperbenzoico (AMCPB) (360 mg, 1,92 mmol) en presencia de NaHCO₃ (164 mg, 19,92 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente y agitación durante 20 min. Trascorrido ese tiempo se añadió CH₂Cl₂ y una disolución acuosa saturada de Na₂S₂O₄ hasta prueba negativa de oxidantes. La fase orgánica se lavó con disoluciones acuosas saturadas de NaHCO₃ y NaCl, se secó con Na₂SO₄ anhidro y se evaporó el disolvente. El producto de reacción se cromatografió sobre gel de sílice, eluyéndose con una mezcla de Hex:AcOEt (7:3) 434 mg (97 %) del epóxido **27**.

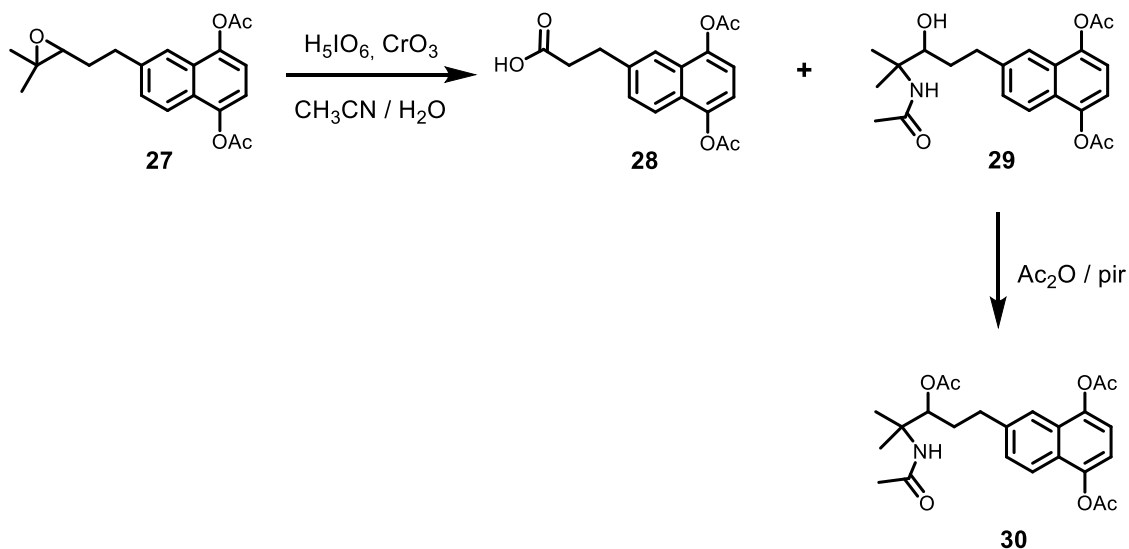
RMN ¹H: tabla XI, figura XVIII

RMN ¹³C: tabla XII.

IR (ν_{max}): 1765 (COOR) cm⁻¹.

3.1.3. Obtención del ácido 28

Utilizando acetonitrilo como disolvente



Una disolución de epóxido ... (200 mg, 0,63 mmol) en acetonitrilo (10 mL) se hicieron reaccionar con una disolución* de H_5IO_6 y CrO_3 en $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (7 mL) durante 1 h en agitación y temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, se añadió agua y AcOEt , y la fase orgánica se extrajo con una disolución acuosa saturada de NaHCO_3 . La fase acuosa resultante se aciduló con HCl 2N y se extrajo con AcOEt . Esta última fase orgánica se lavó con una disolución acuosa saturada de NaCl , se secó con Na_2SO_4 y se evaporó el disolvente, obteniendo 92 mg (54 %) de la naftoquinona **28**

Por otro lado, la fase orgánica neutra se lavó con una disolución acuosa saturada de NaCl , se secó con Na_2SO_4 y se evaporó el disolvente, obteniendo 82 mg (32 %) del compuesto **29**. Este compuesto **29** que fue tratado con anhídrido acético (2 mL) y piridina (2 mL) en oscuridad durante 12 h. Finalizado ese tiempo se hidrolizó el exceso de anhídrido acético añadiendo hielo picado. Se extrajo con AcOEt y se lavó sucesivamente la fase orgánica resultante con una disolución acuosa de HCl 2 N y disoluciones acuosas saturadas de NaHCO_3 y NaCl . La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se evaporó

* H_5IO_6 (11,4 g, 50 mmol) y CrO_3 (23 mg, 0,23 mmol) en una mezcla de CH_3CN y H_2O (14 mL, 0,75 % H_2O). La disolución permaneció 24 h en oscuridad hasta ser utilizada para la reacción.

el disolvente y se obtuvieron 85 mg de producto de reacción que se cromatografió sobre gel de sílice eluyéndose con una mezcla de Hex:AcOEt (6:4) 65 mg (23 % respecto al epóxido **27**) de compuesto **30**.

Compuesto **28**:

RMN ^1H : tabla XI, figura XIX

RMN ^{13}C : tabla XII

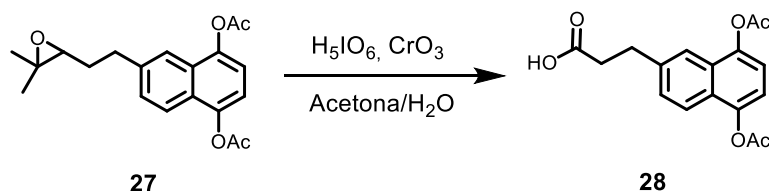
IR (ν_{max}): 1761 (COOH) cm^{-1} .

Compuesto **30**:

RMN ^1H : tabla XI, figura XX

RMN ^{13}C : tabla XII, figura XX

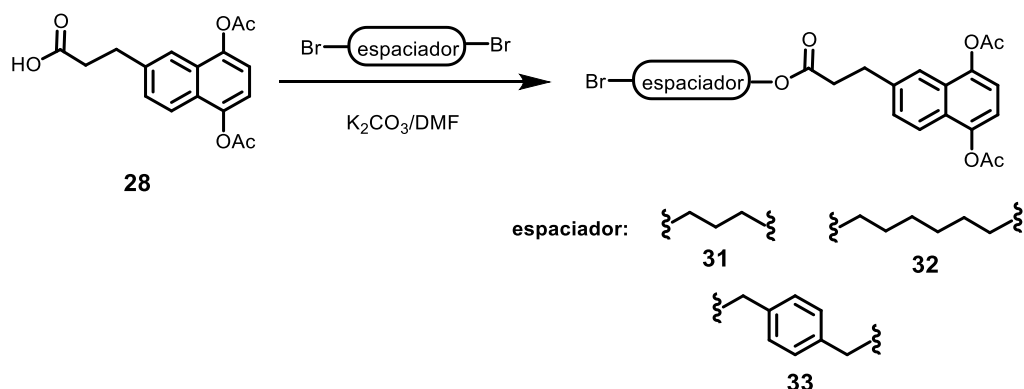
Utilizando acetona como disolvente



A una disolución del epóxido **27** (122 mg, 0,45 mmol) en acetona (4,5 mL) se le añadió gota a gota una disolución previamente preparada de CrO_3 (90 mg, 0,90 mmol) y H_5IO_6 (411 mg, 1,8 mmol) en agua (4,5 mL). La mezcla de reacción de color naranja intenso permaneció en agitación constante y temperatura ambiente durante 1 h, tiempo en el cual la disolución pasó a tener un color verde. A la mezcla de reacción se le añadió una disolución acuosa de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ al 20% hasta prueba negativa de oxidantes y se evaporó el disolvente de la reacción. La fase acuosa se extrajo con AcOEt y la fase orgánica resultante se lavó con una disolución acuosa saturada de NaCl hasta pH neutro, se secó con Na_2SO_4 anhidro y se evaporó el disolvente, obteniéndose 118 mg (98 %) de ácido **28**.

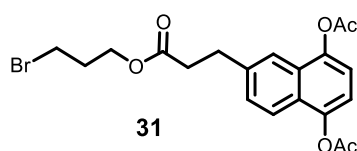
3.2. Obtención de las lignohidroquinonas 44-46

3.2.1. Obtención de las monoterpenilhidroquinonas 31-33



A una disolución de **28** en DMF (1,0 mL) se añadió K₂CO₃ y se mantuvo en agitación durante 15 min. Transcurrido ese tiempo, se añadió el correspondiente derivado dibromado y se agitó la mezcla durante 2 h más. Finalizada la reacción, se realizó el procesamiento indicado en la metodología general para las esterificaciones. El producto de reacción se purificó sobre gel de sílice, obteniendo las correspondientes monoterpenilnaftohidroquinonas alquiladas (**31-33**)

- **Compuesto 31**



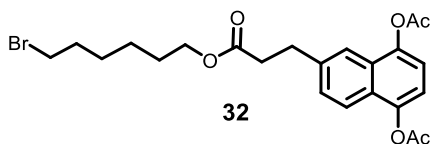
A partir de **28** (189 mg, 0,71 mmol), K₂CO₃ (293 mg, 2,13 mmol), 1,3-dibromopropano (231 μ L, 2,13 mmol) y DMF. El producto de reacción se cromatografió con una mezcla de Hex/AcOEt (7:3) eluyéndose el compuesto **31**. (162 mg, 52 %).

RMN ¹H: tabla XIII, figura XXI

RMN ¹³C: tabla XIV, figura XXI

HRMS calculada para C₂₀H₂₁O₆Br+NH₄⁺ 454,0870 u; encontrada 454,0851 m/z

- Compuesto **32**



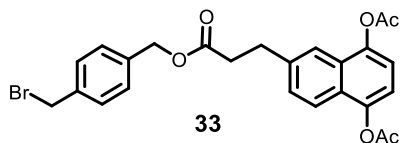
A partir de **28** (100 mg, 0,38 mmol), K₂CO₃ (157 mg, 1,14 mmol), 1,6-dibromopropano (294 µl, 1,14 mmol) y DMF. El producto de reacción se cromatografió con una mezcla de Hex/AcOEt (6:4) eluyéndose el compuesto **32** (115 mg, 72 %).

RMN ¹H: tabla XIII, figura XXII

RMN ¹³C: tabla XIV, figura XXII

HRMS calculada para C₂₃H₂₇O₆Br+NH₄⁺ 496.1329 u; encontrada 496.1322 *m/z*

- Compuesto **33**



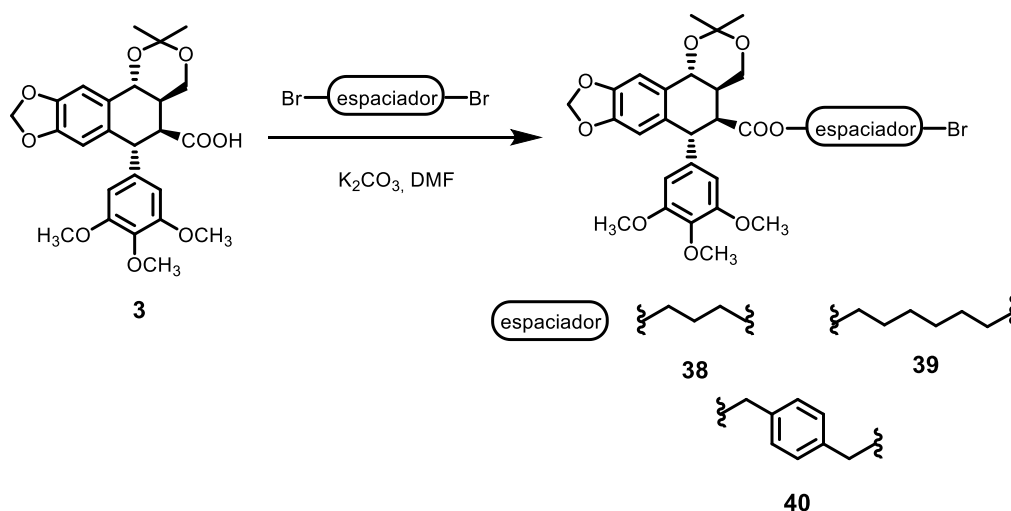
A partir de **28** (121 mg, 0,45 mmol), K₂CO₃ (185 mg, 1,35 mmol), α,α'-dibromo-*p*-xileno (356 mg, 1,53 mmol) y DMF. El producto de reacción se cromatografió con una mezcla de Hex/AcOEt (7:3) eluyéndose el compuesto **33** (75 mg, 35 %).

RMN ¹H: tabla XIII, figura XXIII

RMN ¹³C: tabla XIV, figura XXIII

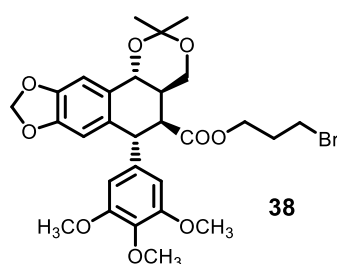
HRMS calculada para C₂₅H₂₃O₆Br+NH₄⁺ 516,1016 u; encontrada 516,1010 *m/z*

3.2.2. Obtención de los ciclolignanos 38-40



A una disolución de **28** en DMF (1,0 mL) se añadió K_2CO_3 y se mantuvo en agitación durante 15 min. Transcurrido ese tiempo, se añadió el correspondiente derivado dibromado y se agitó la mezcla durante 2 h más. Finalizada la reacción, se realizó el procesado indicado en la metodología general para las esterificaciones. El producto de reacción se purificó sobre gel de sílice, obteniendo las correspondientes monoterpenilnaftohidroquinonas alquiladas (**31-33**)

- Compuesto **38**

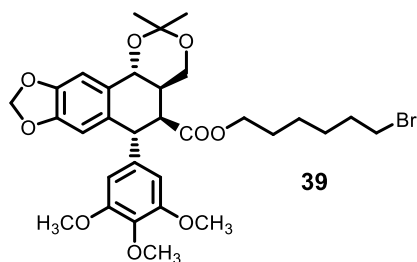


A partir de **3** (200 mg, 0,42 mmol), K_2CO_3 (174 mg, 1,26 mmol), 1,3-dibromopropano (136 μL , 1,26 mmol) y DMF. El producto de reacción se cromatografió con una mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt}$ (7:3) eluyéndose el compuesto **38**. (136 mg, 55 %).

RMN ^1H : figura XXVII

RMN ^{13}C : figura XXVII

- Compuesto **39**

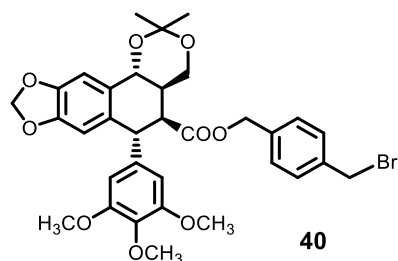


A partir de **3** (150 mg, 0,31 mmol), K_2CO_3 (131 mg, 0,93 mmol), 1,6-dibromopropano (240 μ l, 0,93 mmol) y DMF. El producto de reacción se cromatografió con una mezcla de CH_2Cl_2 :AcOEt (7:3) eluyéndose el compuesto **39** (112 mg, 57 %).

RMN 1H : tabla XV, figura XXVII

RMN ^{13}C : tabla XVI, figura XXVII

- Compuesto **40**



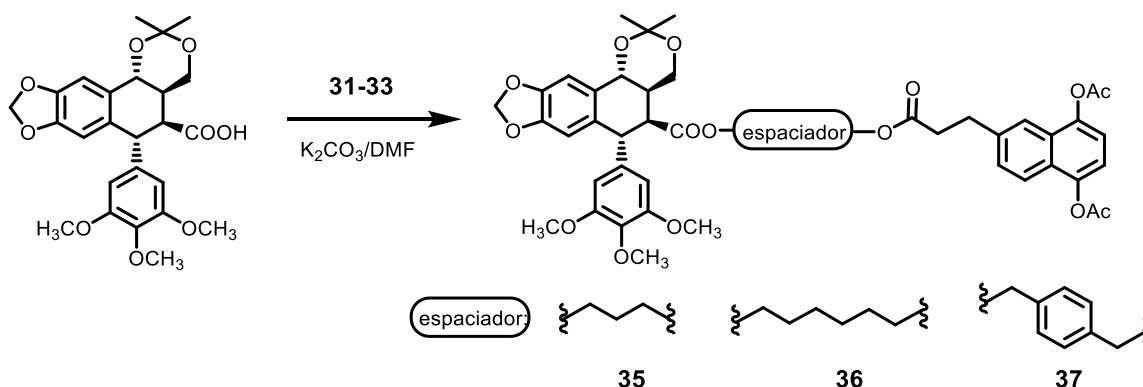
A partir de **3** (200 mg, 0,42 mmol), K_2CO_3 (174 mg, 1,26 mmol), α,α' -dibromo-*p*-xileno (293 mg, 1,53 mmol) y DMF. El producto de reacción se cromatografió con una mezcla de CH_2Cl_2 :AcOEt (7:3) eluyéndose el compuesto **40** (138 mg, 51 %).

RMN 1H : tabla XV, figura XXVIII

RMN ^{13}C : tabla XVI, figura XXVIII

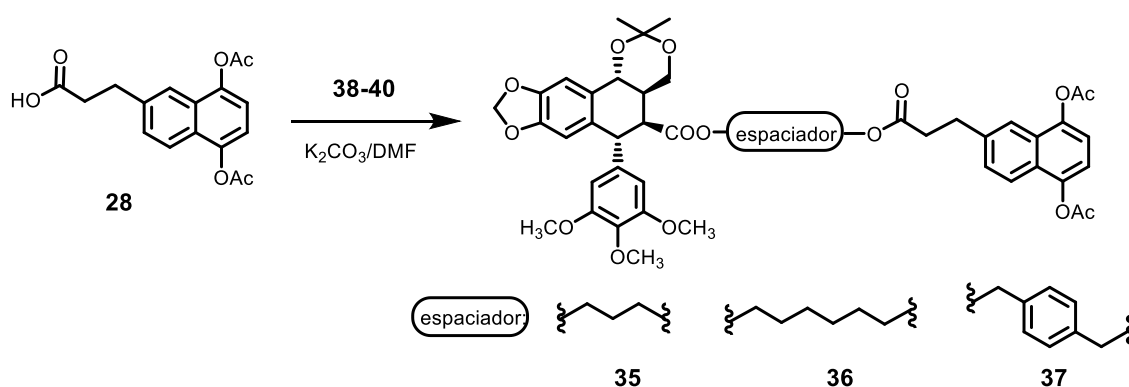
3.2.3. Obtención de las lignohidroquinonas 35-37

Ruta A



A una disolución del ácido **3** en DMF seca (1,5 mL) se le añadió K_2CO_3 y se mantuvo en agitación durante 15 min. A continuación, se añadió la correspondiente monoterpenilhidroquinona (**31-33**) disuelta en DMF (1 mL), manteniendo la mezcla en agitación durante 3-4 h. El crudo de reacción, se diluyó en AcOEt y agua, y la fase orgánica se lavó con una disolución acuosa saturada de NaCl. Se secó la fase orgánica con Na_2SO_4 anhidro y se evaporó el disolvente. El producto de reacción se purificó sobre gel de sílice, eluyéndose la correspondiente lignoquinona (**35-37**).

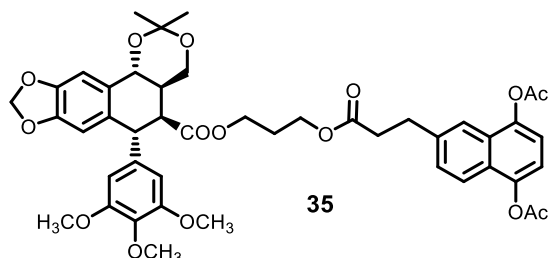
Ruta B



A una disolución del ácido **28** en DMF seca (1,5 mL) se le añadió K_2CO_3 y se mantuvo en agitación durante 15 min. A continuación, se añadió el correspondiente ciclolignano (**38-40**) disuelta en DMF (1 mL), manteniendo la mezcla en agitación durante 3-4 h. El crudo de reacción, se diluyó en AcOEt y agua, y la fase orgánica se lavó con una disolución acuosa saturada de NaCl. Se secó la

fase orgánica con Na_2SO_4 anhidro y se evaporó el disolvente. El producto de reacción se purificó sobre gel de sílice, eluyéndose la correspondiente lignoquinona (**35-37**).

- **Compuesto 35**



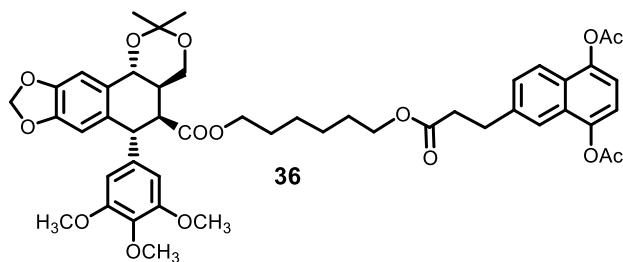
Ruta A: a partir de **3** (189 mg, 0,40 mmol), K_2CO_3 (165 mg, 1,2 mmol), **31** (176 mg, 0,40 mmol) en DMF seca (2,0 mL) durante 3 h. El producto de reacción se cromatografió con una mezcla de Hex/AcOEt (1:1) eluyéndose el compuesto **35** (234 mg, 70 %).

Ruta B: a partir de **28** (100 mg, 0,38 mmol), K_2CO_3 (157 mg, 1,14 mmol), **38** (236 mg, 0,40 mmol) en DMF seca (2,0 mL) durante 3 h. El producto de reacción se cromatografió con una mezcla de Hex/AcOEt (1:1) eluyéndose el compuesto **35** (138 mg, 44 %).

RMN ^1H : tabla XVII, figura XXIV

RMN ^{13}C : tabla XVII, figura XXIV

- **Compuesto 36:**



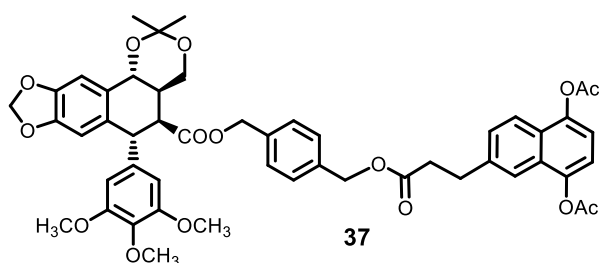
Ruta A. a partir de **3** (137 mg, 0,29 mmol), K₂CO₃ (120 mg, 0,87 mmol), **32** (140 mg, 0,29 mmol) en DMF seca (2,0 mL) utilizando el método general durante 3 h. El producto de reacción se cromatografió con una mezcla de CH₂Cl₂:AcOEt (9:1) eluyéndose el compuesto **36** (101 mg, 42 %).

Ruta B: a partir de **28** (150 mg, 0,57 mmol), K₂CO₃ (235 mg, 1,71 mmol), **39** (361 mg, 0,57 mmol) en DMF seca (2,0 mL) durante 3 h. El producto de reacción se cromatografió con una mezcla de Hex/AcOEt (1:1) eluyéndose el compuesto **35** (268 mg, 54 %)

RMN ¹H: tabla XVII, figura XXV

RMN ¹³C: tabla XVII, figura XXV

- Compuesto **37**:



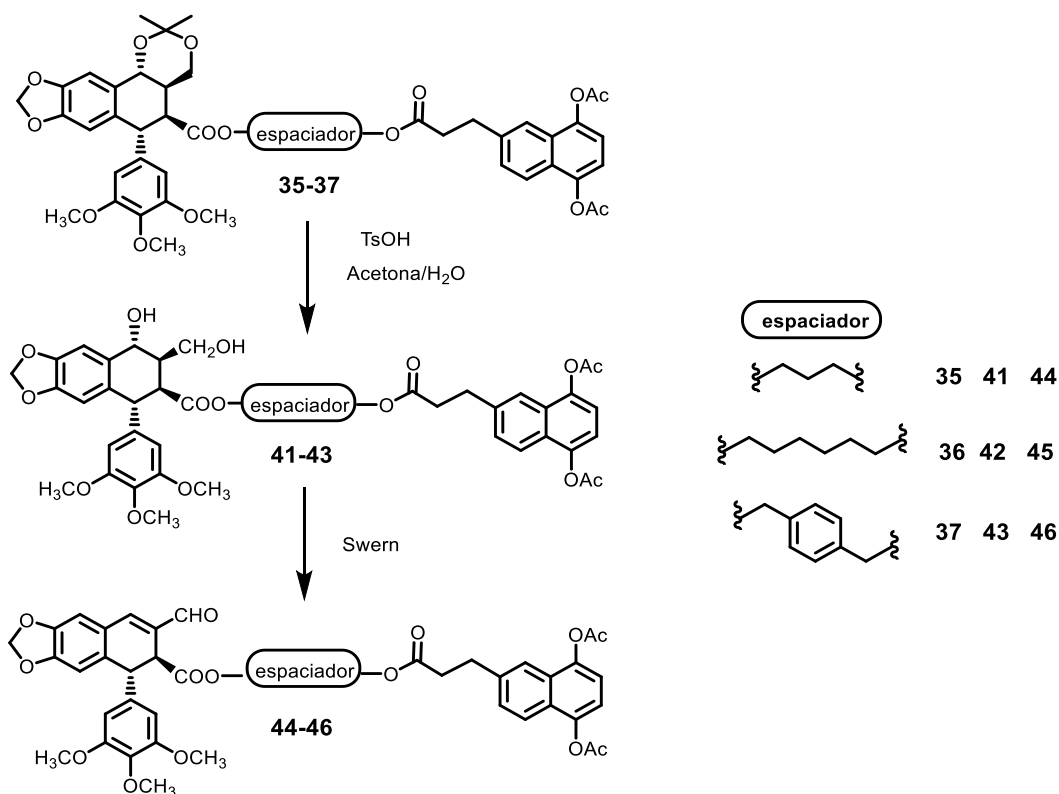
Ruta A. a partir de **3** (154 mg, 0,33 mmol), K₂CO₃ (161 mg, 1,17 mmol), **33** (155 mg, 0,33 mmol) en DMF seca (2,0 mL) utilizando el método general durante 4 h. El producto de reacción se cromatografió con una mezcla de CH₂Cl₂:AcOEt (7:3) eluyéndose el compuesto **37** (125 mg, 42 %).

Ruta B: a partir de **28** (60 mg, 0,23 mmol), K₂CO₃ (47 mg, 0,35 mmol), **40** (153 mg, 0,23 mmol) en DMF seca (2,0 mL) durante 3 h. El producto de reacción se cromatografió con una mezcla de Hex/AcOEt (1:1) eluyéndose el compuesto **37** (104 mg, 51 %)

RMN ¹H: tabla XVII, figura XXVI

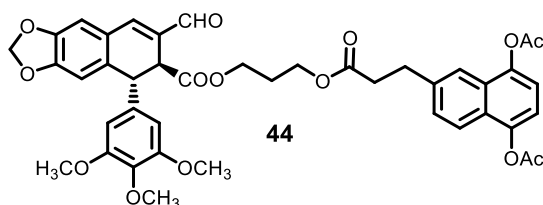
RMN ¹³C: tabla XVII, figura XXVI

3.2.4. Obtención de los aldehídos híbridos



Los acetonidos-híbridos (**35-37**) se disolvieron en una mezcla de acetona/agua (8:2) (10 mL) y se añadió ácido *p*-toluensulfónico (10 mg, 0,05 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se evaporó la acetona a vacío, se añadió AcOEt y el crudo se lavó con una disolución acuosa saturada de NaCl, se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se evaporó el disolvente. Los hidroxieésteres (**41-43**) se oxidaron bajo las condiciones de Swern descritas en la metodología general. Finalizada la reacción, los productos se cromatografiaron sobre gel de sílice, eluyéndose con una mezcla de DCM/ AcOEt (8:2), obteniéndose los correspondientes aldehídos.

- **Compuesto 44:**



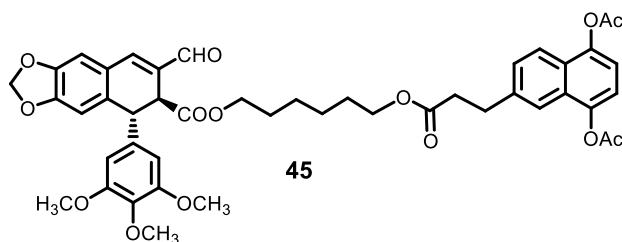
A partir de **35** (210 mg, 0,26 mmol) siguiendo la desprotección descrita y la metodología general para las reacciones de Swern, obteniendo el compuesto **44** (99 mg, 49 %)

RMN ¹H: tabla XIX, figura XXX

RMN ¹³C: tabla XX, figura XXX

HRMS calculada para C₄₂H₄₀O₁₄+NH₄⁺ 786,2756 u; encontrada 786,2758 m/z

• **Compuesto 45**



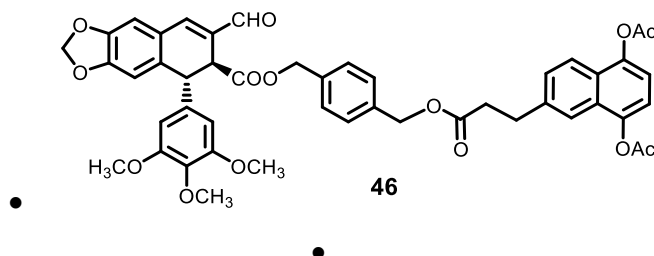
A partir de **36** (465 mg, 0,53 mmol) siguiendo la desprotección descrita y la metodología general para las reacciones de Swern, obteniendo el compuesto **45** (290 mg, 67 %)

RMN ¹H: tabla XIX, figura XXXI

RMN ¹³C: tabla XX, figura XXXI

HRMS calculada para C₄₅H₄₆O₁₄+NH₄⁺ 828,3225 u; encontrada 828,3224 m/z

• **Compuesto 46:**



A partir de **37** (152 mg, 0,17 mmol) siguiendo la desprotección descrita y la metodología general para las reacciones de Swern, obteniendo el compuesto **46** (63 mg, 48 %).

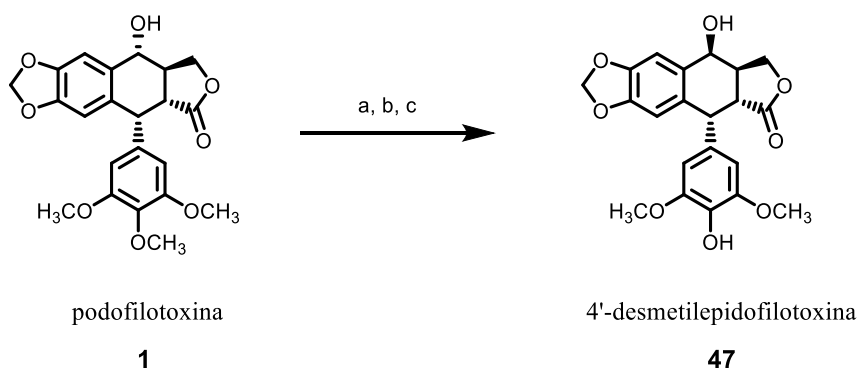
RMN ¹H: tabla XIX, figura XXXII

RMN ¹³C: tabla XX, figura XXXII

HRMS calculada para C₄₇H₄₂O₁₄+NH₄⁺ 848,2912 u; encontrada 848,2915 m/z

4. Obtención de 7 β ,9-bisciclolignanos

4.1. Obtención de 4'-desmetilepodofilotoxina 47



- a) A una disolución de podofilotoxina (200 mg, 0,48 mmol), **1**, en CH₂Cl₂ seco (25 mL) se le añadió HBr-AcOH 33% (5 mL). La mezcla se mantuvo en agitación y temperatura ambiente durante 14 h. Finalizada la reacción se añadió una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ y hielo, Una vez fundido éste, se evaporó el disolvente, se extrajo con AcOEt y la fase orgánica se lavó con una disolución acuosa saturada de NaCl, se secó con Na₂SO₄ anhidro y se evaporó el disolvente. El producto de reacción se cromatografía sobre gel de sílice eluyéndose con una mezcla de CH₂Cl₂:AcOEt (7:3) 107 mg (56%) de 4'-desmetilepodofilotoxina **47**.
- b) A una disolución de podofilotoxina (200 mg, 0,48 mmol), **1**, en CH₂Cl₂ seco (5 mL) se le añadió NaI (320 mg, 2,16 mmol) y se mantuvo en agitación y atmósfera inerte durante 15 minutos. Transcurrido ese tiempo, se colocó un baño de hielo y se añadió gota a gota ácido metanosulfónico (MeSO₃H) (70 μ L, 2,16 mmol). La reacción permaneció en agitación y temperatura ambiente durante 5 h más, tras las cuales se burbujeó N₂ en la disolución para eliminar los restos de HI y se evaporó el disolvente. El crudo de reacción se redisolvió en acetona (6 mL), se añadió BaCO₃ (190 mg, 0,96 mmol) y H₂O (0.4 mL) y se mantuvo en agitación durante 30 minutos. Finalizada la reacción, se filtró la disolución sobre un filtro

de pliegues, se añadió una disolución saturada de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ hasta prueba negativa de oxidantes y se evaporó el disolvente de reacción. Posteriormente, se extrajo con AcOEt y la fase orgánica se lavó con una disolución acuosa saturada de NaCl Se, secó con Na_2SO_4 anhidro y se evaporó el disolvente. El producto de reacción se cromatografió sobre gel de sílice eluyéndose con una mezcla de CH_2Cl_2 :AcOEt (7:3) 155 mg (81%) de 4'-desmetilepipodofilotoxina **47**

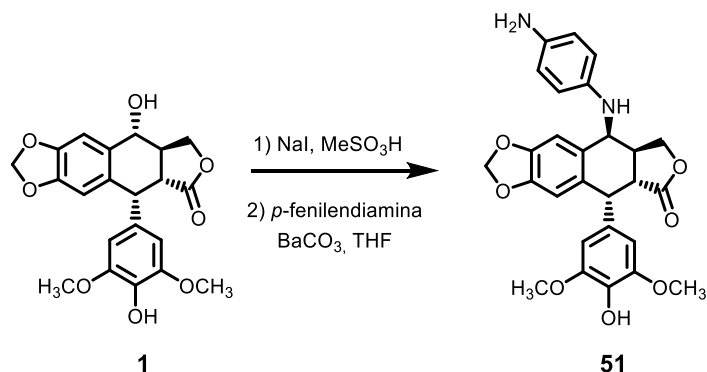
- c) A una disolución de podofilotoxina (200 mg, 0,48 mmol), **1**, en CH_2Cl_2 seco (5 mL) se le añadió NaI (320 mg, 2,16 mmol) y se mantuvo en agitación y atmósfera inerte durante 15 minutos. Transcurrido ese tiempo, se colocó un baño de hielo y se añadió gota a gota cloruro de trimetilsilano (TMSCl) (242 μL , 2,16 mmol). La reacción permaneció en agitación y temperatura ambiente durante 5 h más, tras las cuales se burbujeó N_2 en la disolución para eliminar los restos de HI y se evaporó el disolvente. El crudo de reacción se redisolvió en acetona (6 mL), se añadió BaCO_3 (190 mg, 0,96 mmol) y H_2O (0.4 mL) y se mantuvo en agitación durante 30 minutos. Finalizada la reacción, se filtró la disolución sobre un filtro de pliegues, se añadió una disolución saturada de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ hasta prueba negativa de oxidantes y se evaporó el disolvente de reacción. Posteriormente, se extrajo con AcOEt y la fase orgánica se lavó con una disolución acuosa saturada de NaCl Se, secó con Na_2SO_4 anhidro y se evaporó el disolvente. El producto de reacción se cromatografió sobre gel de sílice eluyéndose con una mezcla de CH_2Cl_2 :AcOEt (7:3) 76 mg (40%) de 4'-desmetilepipodofilotoxina **47**.

RMN ^1H : tabla XXI, figura XXXIII

RMN ^{13}C : tabla XXII, figura XXXIII

4.2. Obtención del 7β-aminociclolignano 51.

- Utilizando *p*-fenilendiamina como nucleófilo

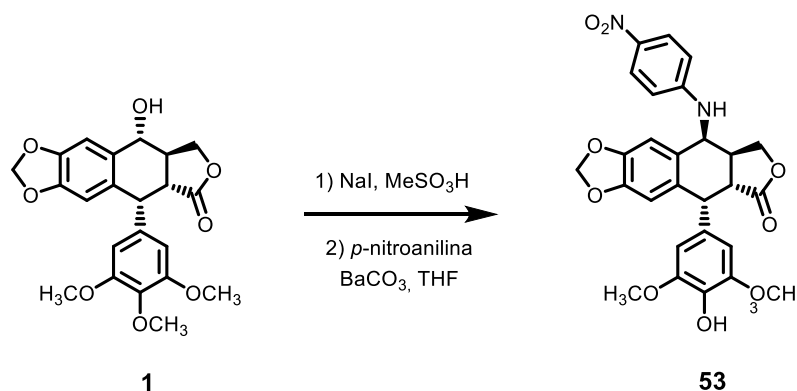


A una disolución de podofilotoxina, **1**, (100 mg, 0,24 mmol), en CH₂Cl₂ seco (2,5 mL) se le añadió NaI (160 mg, 1,08 mmol) y se mantuvo en agitación y atmósfera inerte durante 15 minutos. Transcurrido ese tiempo, se colocó un baño de hielo y se añadió gota a gota MeSO₃H (35 μL, 1,1 mmol). La reacción permaneció en agitación y temperatura ambiente durante 5 h más, tras las cuales se burbujó N₂ en la disolución para eliminar los restos de HI y se evaporó el disolvente. El crudo de reacción se redisolvió en THF seco (6 mL) y se añadió *p*-fenilendiamina (108 mg, 0,96 mmol) y Et₃N (348 μL, 1,23 mmol) y se mantuvo en agitación durante 19 h. Se añadió agua y se evaporó el disolvente de reacción. Posteriormente, se extrajo con AcOEt y la fase orgánica se lavó con una disolución acuosa saturada de NaCl. Se secó con Na₂SO₄ anhidro y se evaporó el disolvente. El producto de reacción se cromatografió sobre gel de sílice eluyéndose con una mezcla de CH₂Cl₂:AcOEt (3:7) 24 mg (20%) del ciclolignano **51**.

RMN ¹H: tabla XXI, figura XXXIV

HRMS calculada para C₂₇H₂₆N₂O₇+H⁺ 491,1813 u; encontrada 491,1836 m/z

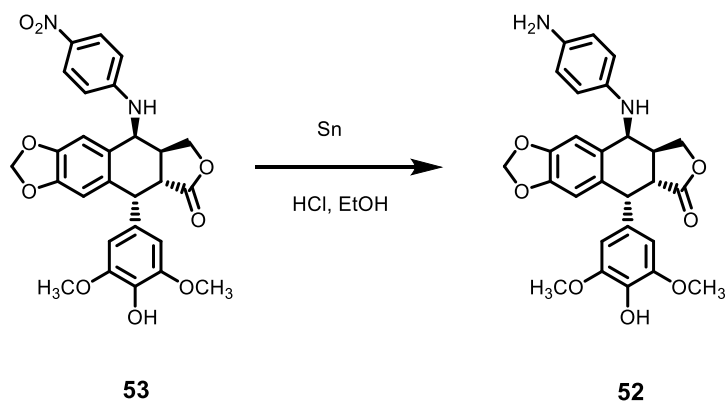
• Utilizando *p*-nitroanilina como nucleófilo



A una disolución de podofilotoxina (200 mg, 0,48 mmol), **1**, en CH_2Cl_2 seco (5 mL) se le añadió NaI (320 mg, 2,16 mmol) y se mantuvo en agitación y atmósfera inerte durante 15 minutos. Transcurrido ese tiempo, se colocó un baño de hielo y se añadió gota a gota MeSO_3H (70 μL , 2,16 mmol). La reacción permaneció en agitación y temperatura ambiente durante 5 h más, tras las cuales se burbujeo N_2 en la disolución para eliminar los restos de HI y se evaporó el disolvente. El crudo de reacción se redisolvió en THF seco (6 mL) y se añadió *p*-nitroanilina (89 mg, 0,58 mmol) y BaCO_3 (190 mg, 0,96 mmol), manteniéndose en agitación durante 19 h. Finalizada la reacción, se filtró la disolución sobre un filtro de pliegues, se añadió agua y se evaporó el disolvente de reacción. Posteriormente, se extrajo con AcOEt y la fase orgánica se lavó con una disolución acuosa saturada de NaCl. Se secó con Na_2SO_4 anhidro y se evaporó el disolvente. El producto de reacción se cromatografía sobre gel de sílice eluyéndose con una mezcla de CH_2Cl_2 :AcOEt (9:1) 130 mg (50%) del ciclolignano **53**

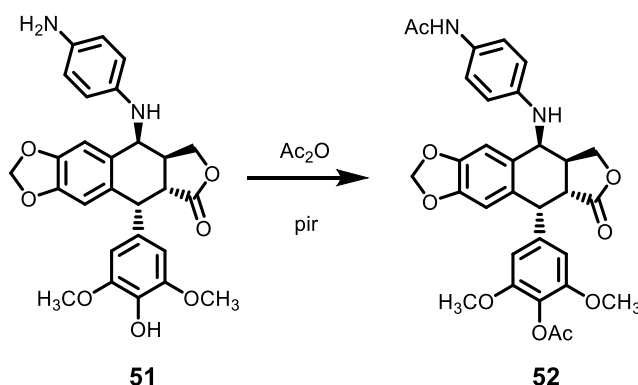
RMN ^1H : tabla XXI, figura XXXVI

RMN ^{13}C : tabla XXII, figura XXXVI



A una disolución del ciclolignano **53** (78 mg, 0,15 mmol) en una mezcla de EtOH:H₂O (10 mL) se añadió estaño (53 mg, 0,45 mmol) y HCl concentrado (3 mL). La mezcla se mantuvo en agitación y reflujo durante 24 h. Transcurrido ese tiempo, se filtró la mezcla para eliminar los restos de estaño y se añadió NaOH 4 % y la fase acuosa se extrajo con AcOEt, y la fase orgánica se lavó con una disolución acuosa saturada de NaCl. Se secó con Na₂SO₄ anhidro y se evaporó el disolvente, obteniéndose 68 mg de un producto de reacción que contenía el compuesto **52** en proporción 1:1 con el producto de partida **53**.

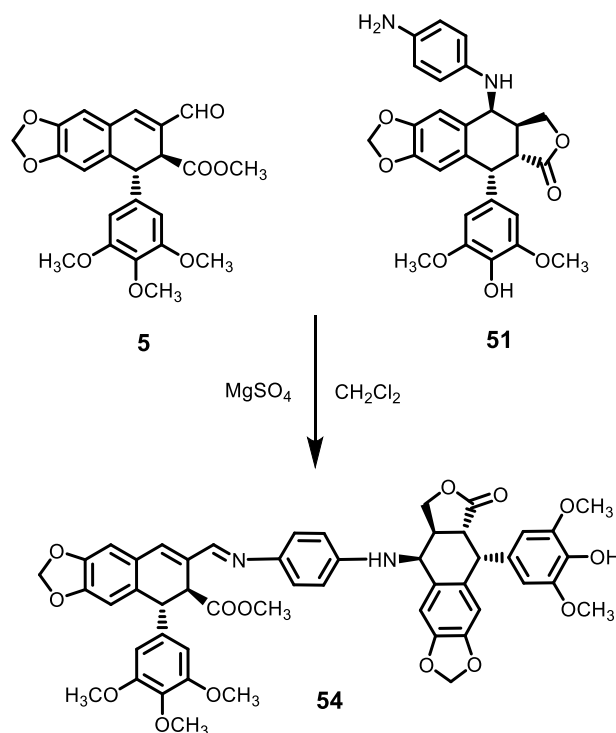
Acetilación del ciclolignano **51**



El compuesto **51** fue tratado con anhídrido acético (2 mL) y piridina (2 mL) en oscuridad durante 12 h. Finalizado ese tiempo se hidrolizó el exceso de anhídrido acético añadiendo hielo picado. Se extrajo con AcOEt y se lavó sucesivamente la fase orgánica resultante disoluciones acuosas saturadas de NaHCO₃ y NaCl. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se evaporó el disolvente y se obtuvieron 85 mg de producto de reacción que se cromatografió sobre gel de sílice eluyéndose con una mezcla de Hex:AcOEt (6:4) 60 mg (46 % respecto de **1**) de compuesto **52**.

RMN ¹H: tabla XXI, figura XXXV

4.3. Obtención del 7β,9-bisciclolignano **54**



Una disolución de una mezcla que contiene el ciclolignano **51** (182 mg) en CH_2Cl_2 seco (4 mL) se hizo reaccionar con **5** (200 mg, 0,46 mmol) y MgSO_4 anhidro (553 mg, 4,60 mmol) a temperatura ambiente durante 6 d. Finalizada la reacción, se filtró y se evaporó el disolvente. El producto de reacción se cromatografió sobre gel de sílice eluyéndose con una mezcla de CH_2Cl_2 :AcOEt (8:2) 157 mg (38 %) del ciclolignano **54**.

RMN ^1H : tabla XXIII, figura XXXVII

RMN ^{13}C : tabla XXIII, figura XXXVII

HRMS calculada para $\text{C}_{50}\text{H}_{46}\text{NaO}_{14}+\text{H}^+$ 899,3022 u; encontrada 899,3031 m/z

5. Materiales y Métodos biológicos

5.1. Materiales

Tabla 16: Materiales empleados en los ensayos de evaluación biológica.

Reactivo	Casa Comercial
Azul de tripano	Sigma-Aldrich
DMEM con L-glutamina	Sigma Life Science
DMSO	Sigma-Aldrich
Eppendorf transparentes 1,5 mL	Fischer
Frasco Roux de 25 cm ² estéril	Fischer
Frasco Roux de 75 cm ² estéril	Fischer
Kit de detección de apoptosis (anexina V-FITC y IP)	ImmunoStep
L-glutamina 200mM estéril	Gibco®
Línea celular MCF-7 (cáncer de mama, MCF7, ATCC HTB-22)	IBMCC
Línea celular MG-63 (osteosarcoma, ATCC CRL-1427)	IBMCC
Línea celular HT-29 (carcinoma de colón, ATCC HTB-38)	IBMCC
MTT	Sigma-Aldrich
PBS (phosphate buffered saline) estéril	CIC
Penicilina- Estreptomicina estéril	Gibco®
Placas de 96 pocillos	Corning Inc.
Placas Petri 35 mm	Falcon
Pipetas estériles 2 mL, 5 mL, 10 mL y 25 mL	Fischer
Puntas estériles 10 µL, 100 µL y 1000 µL	Fischer
Solución de marcaje de ADN (Ioduro de propidio, detergente y RNAsa)	Cytognos
RPMI-1640 con L-glutamina	Sigma Life Science

Suero bovino fetal inactivado	Gibco®
Tripsina-EDTA (0,25 %)	Promega
Tubos de criopreservación	Corning Inc.
Tubos falcon 10 mL estériles	Falcon
Tubos falcon 50 mL estériles	Falcon

5.1 Métodos

5.1. Cultivos celulares

El mantenimiento de estas líneas se realiza a través del medio de cultivo RPMI-1640 para MG-G3 y, DMEM con L-glutamina para MCF-7 y HT-29, en ambos casos suplementados con un 1% (v/v) penicilina/estreptomicina, 1% (v/v) L-glutamina y 10% (v/v) suero bovino fetal (SBF) inactivado. Todo este procedimiento se lleva a cabo en campana de flujo laminar tipo II para evitar contaminaciones, fundamentalmente por *Mycoplasma sp*, y mantener la máxima esterilidad posible.



Figura 74: Medios de cultivo

Las líneas celulares crecieron en mono capas adherentes y se doblaron cuando existía aproximadamente un 80 % de confluencia en la placa (48- 72 h). Se eliminó el medio de cultivo con una pipeta estéril, se añadió una solución de tripsina-EDTA y se incubó durante 2 minutos. A continuación, se añadió el medio correspondiente para cada línea celular, se recoge la suspensión en un falcon y se centrifuga la suspensión celular a 1280 rpm durante 5 min sin freno. De las dos fases resultantes, sobrenadante (SN) y *pellet*, se descarta el SN mediante una bomba de vacío y se resuspende el *pellet* celular en medio

de cultivo nuevo. Una vez cambiado el medio, se introducen en el incubador (37°C y 5% (v/v) de CO₂) para favorecer el crecimiento celular.

5.2. Recuento celular.

El contaje celular se llevó a cabo mediante una cámara de Nuebauer. Para ello, se toma la cámara de Nuebauer y, humedeciendo los bordes, se fija el cubreobjetos a la cámara. Se resuspenden las células en un volumen de buffer conocido (el volumen depende de la cantidad de células que se tenga). Se toma un eppendorff de 1,0 mL y se diluye (con un factor conocido) con una solución de azul de tripano. Se carga la cámara de Nuebauer colocando la punta de la pipeta en el borde del cubreobjetos y se pipetas despacio la suspensión de las células de forma que se llene la depresión del centro de la cámara. A continuación, se hace el recuento en el microscopio, contando dos cuadrados en diagonal (Figura 75)

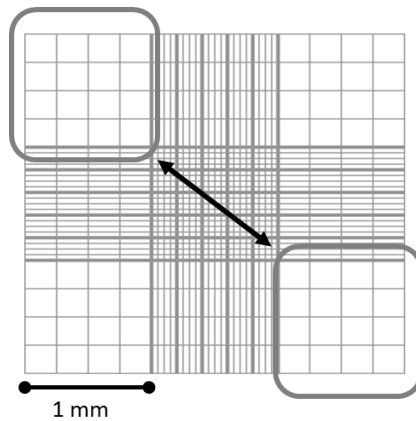


Figura 75: cámara de Nuebauer

Una vez contadas las células en la cámara, se calcula el número total de células a través de la fórmula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ total de células} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ células } 1 + \text{N}^{\circ} \text{ células } 2}{2} \cdot 10^4 \cdot \text{Volumen muestra} \cdot \text{Factor de dilución}$$

5.3. Preparación de las disoluciones de los compuestos ensayados

Se pesó una cantidad conocida de cada compuesto y se preparó una disolución madre con DMSO de concentración 10^{-2} M a partir de la siguiente fórmula:

$$mL (DMSO) = 10^2 \frac{mg}{PM}$$

mg: peso del compuesto

PM: peso molecular del compuesto

A partir de esta disolución, se prepararon diluciones seriadas de cada compuesto añadiendo medio y conservando solamente la disolución madre y preparando nuevas diluciones para cada ensayo llevado a cabo. Como controles, se prepararon las mismas diluciones con las concentraciones correspondiente de DMSO. El procedimiento para preparar las diluciones se representa en la figura siguiente.

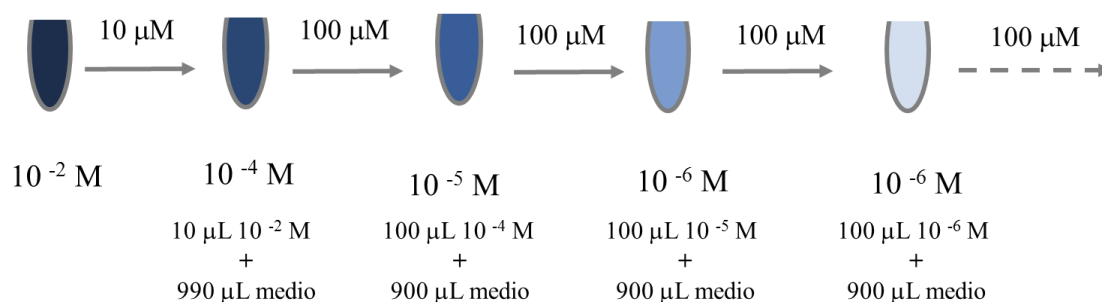


Figura 76: procedimiento de preparación de diluciones.

5.4. Ensayos de citotoxicidad

La citotoxicidad de los compuestos se determinó *in vitro* a través del método colorimétrico del MTT (2,5-difenil-3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-tetrazol): Se sembraron 2500 células de la correspondiente línea celular en 100 µL de medio en placas de 96

pocillos y se incubaron durante una noche. Una vez adheridas, se reemplaza el medio de cultivo por medio fresco con la correspondiente concentración de compuesto a ensayar. Pasado el tiempo de incubación con el compuesto (72 h), se retira el medio se añade medio fresco con 10 μ M de MTT en PBS (5 mg/mL) y se incubó durante 4 horas más. Transcurrido ese periodo, se retiró el medio sobrante y se solubilizaron los cristales de formazán en DMSO.

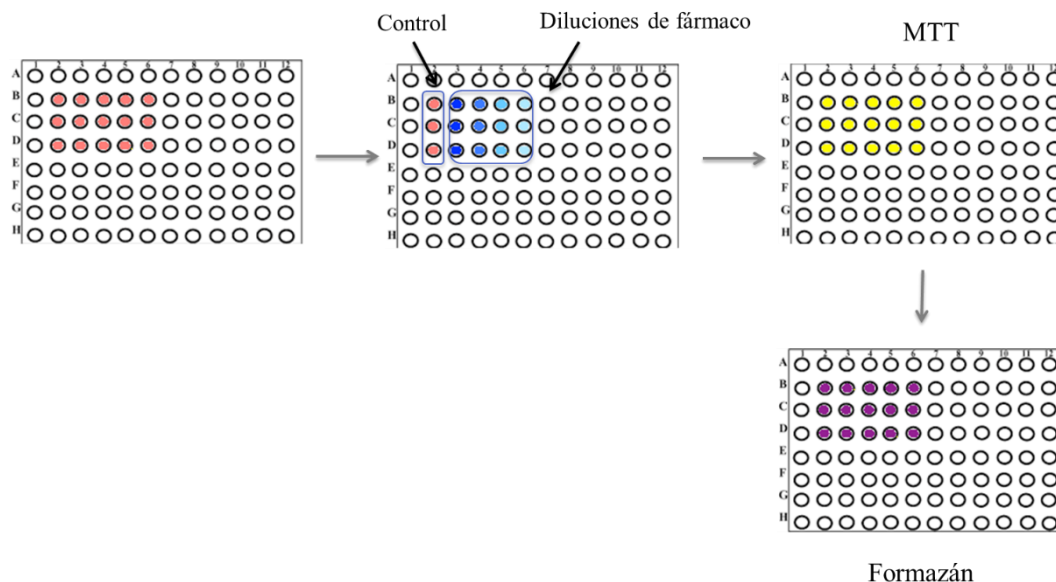


Figura 77: Ensayos de citotoxicidad con MTT

La densidad óptica (D.O.) se midió en un espectrofotómetro lector de microplacas automatizado (Synergy™ 4 Hybrid Microplate reader, BioTek Instruments) a una longitud de onda de 570 nm (con una longitud de onda de referencia de 690 nm) y se analizó usando el software “Gen5 Data Analysis” (BioTek Instruments).

Los valores de absorbancia de las diferentes diluciones de los compuestos se relacionaron con el valor del control (100% de crecimiento) obteniéndose el % de viabilidad para cada dilución mediante la siguiente ecuación.

$$\text{Viabilidad celular} = \frac{\text{D. O. (control)} \times 100}{\text{D. O. (Dilución)}}$$

Control: células sin estímulos

Dilución: células tratadas con compuesto

Al relacionar ese % con el logaritmo de la concentración se calculó el GI_{50} de cada compuesto a las 72 h de incubación (concentración del compuesto que inhibe el 50% del crecimiento celular).

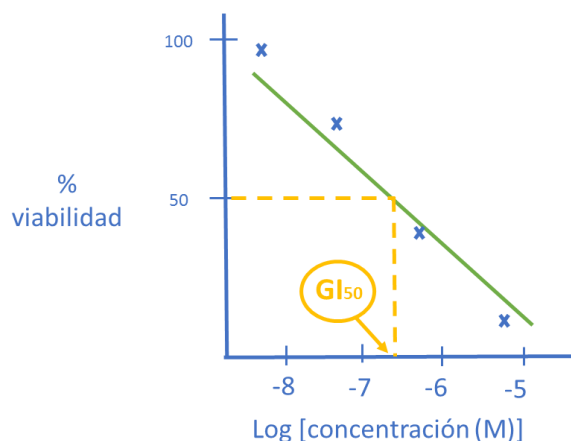


Figura 78: Determinación de GI_{50}

Estos valores de GI_{50} se han obtenido mediante la representación gráfica en el programa Microsoft Office Excel 2016 y se han expresado en μM como la media \pm desviación estándar (D.E.) de tres experimentos independientes.

5.5 Ensayos de citometría de flujo

Para llevar a cabo los ensayos de citometría de flujo se sembraron en una placa Petri de 35 mm un total de 300.000 células en el caso de MG-63 y 400.000 para HT-29 y MCF-7 en 5 mL de medio y se incubaron durante 24 h. Transcurrido ese tiempo, se retiró el medio y reemplazó por medio fresco con el correspondiente compuesto a una concentración determinada. Tras el tiempo de incubación (24 o 48 h) se tripsinizaron las células y se recogieron en tubos de citometría junto con los sobrenadantes. Se llevaron a cabo 3 lavados con PBS (1200 rpm, 3 min).



Figura 79: Placas Petri y tubos de citometría

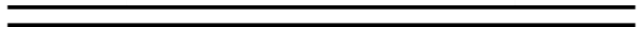
- Para determinar el efecto sobre la viabilidad celular, la apoptosis temprana y tardía, así como la muerte celular, se empleó el kit de detección de apoptosis (anexina V-FITC y IP). Tras el último lavado con PBS se añadió el buffer de unión de anexina para resuspender las células en una concentración de 1×10^6 células/mL. A continuación, se marcaron las células con $5 \mu\text{M}$ de anexina-V (FITC) y $5 \mu\text{M}$ de yoduro de propidio y se incubó a temperatura ambiente y oscuridad durante 15 min. Transcurrido ese tiempo, se añadieron $400 \mu\text{M}$ del buffer de unión de anexina

- Para el estudio del ciclo celular se añadieron $200 \mu\text{L}$ de solución de marcaje de ADN (yoduro de propidio, detergente y RNAsa) y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y oscuridad

En ambos experimentos los datos se adquirieron mediante un citómetro de flujo “FACSCanto II” (Becton Dickinson Biosciences, BD, San Jose/CA, USA), empleando el software “FACSDiva” (v6.1; BD). Para realizar el análisis de los datos, así como para obtener las figuras mostradas en esta memoria, se utilizó el software Infinicyt™ (Cytognos SL, Salamanca, Spain).



CONCLUSIONES



Del trabajo realizado en esta Tesis Doctoral sobre la síntesis y evaluación biológica de nuevos híbridos derivados del aldehído podofílico se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Se ha diseñado una nueva familia de híbridos, denominados lignohidroquinonas, formados por el aldehído podofílico unido a diterpenil/monoterpenil-hidroquinonas mediante espaciadores alifáticos y aromáticos por enlaces tipo éster.
2. Se ha optimizado la preparación del precursor ciclolignánico **3**, el acetónido del ácido picropodofílico, a partir del compuesto natural podofilotoxina aislado de la resina de podofilino.
3. Se ha sintetizado el precursor diterpenilhidroquinónico **8** a partir del compuesto natural ácido mirceocomúnico aislado de las arcéstidas de *J. oxycedrus*.
4. Las lignohidroquinonas derivadas de diterpenoides se han obtenido a partir de los precursores **3** y **8** unidos por el carbono C-9' del ciclolignano y la posición C-19 del resto diterpénico.
5. En esta familia, los espaciadores se unieron primero al resto diterpénico y posteriormente al precursor ciclolignánico. La unión del espaciador al precursor diterpenilhidroquinónico puede realizarse antes o después de la aromatización del anillo naftalénico, obteniéndose mejores resultados cuando la esterificación con el espaciador dibromado es previa a la aromatización.
6. Las lignohidroquinonas derivadas de monoterpenoides se han preparado a partir de los precursores ciclolignánico **3** e hidroquinónico **28**, éste último obtenido con buen rendimiento a partir del monoterpeno β -mirceno.
7. En esta familia de lignohidroquinonas, se han utilizado dos alternativas sintéticas dependiendo de que el espaciador se una primero al precursor ciclolignánico y después al monoterpenilhidroquinónico o viceversa, obteniéndose rendimientos variables dependiendo del espaciador.
8. Se ha iniciado la síntesis de una nueva familia de híbridos, denominados 7 β ,9-bisciclolignanos, por conjugación del aldehído podofílico con 4'-desmetilepipodofilotoxinas a través de un espaciador diaminado.

9. Partiendo de podofilotoxina, se han optimizado las reacciones de epimerización en C-7 y desmetilación en O-4' obteniéndose los mejores rendimientos con NaI y ácido metanosulfónico.
10. Se ha realizado la evaluación biológica de los precursores y de los híbridos finales de cada familia en tres líneas celulares tumorales humanas (MCF-7, MG-63 y HT-29), y aunque todos ellos han resultado citotóxicos se observan diferencias dependiendo de la familia analizada, del espaciador utilizado, de la línea celular considerada y del tiempo de duración del ensayo.
11. Del análisis de resultados de bioactividad mediante ensayos con MTT y citometría de flujo de los híbridos obtenidos, se pueden establecer las siguientes conclusiones:
 - a. En los ensayos de citotoxicidad con MTT a 72 h, se han obtenido valores de GI₅₀ comprendidos entre 2,34 μ M y 0,041 μ M, siendo los mejores resultados para las lignohidroquinonas **24** y **46** que presentan un espaciador aromático en su estructura.
 - b. La lignohidroquinona **24**, derivada de diterpenoides, ha mostrado selectividad frente a MG-63, mientras que la lignohidroquinona **46**, derivada de monoterpenoides, ha mostrado selectividad hacia la línea HT-29, manteniendo la potencia y la selectividad del ciclolignano precursor **5**.
 - c. Los ensayos de citometría de flujo indican que ambas lignohidroquinonas son capaces de inducir apoptosis y detener el ciclo celular en G2/M a tiempos cortos de incubación, de forma análoga al aldehído podofílico, por lo que previsiblemente podrían conservar su mismo mecanismo de acción.
 - d. La influencia del fragmento hidroquinónico en la actividad del híbrido final, es más manifiesta en **46** que en **24**.
 - e. Los ensayos de citometría de flujo para el 7 β ,9-bisciclolignano **54** han puesto de manifiesto su potencial citotóxico y la posible influencia de los dos mecanismos de acción de los fragmentos que conforman el híbrido.

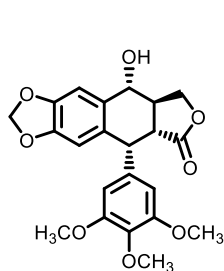
12. La hibridación ha resultado una estrategia bastante eficaz para obtener nuevos compuestos en los que se combinen las características farmacológicas de los fragmentos que forman el híbrido.



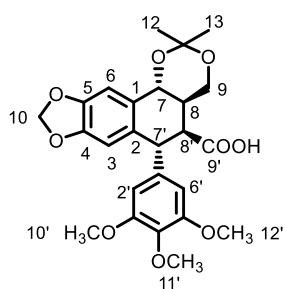
ESPECTROSCOPIA



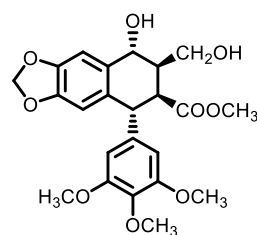
Tablas



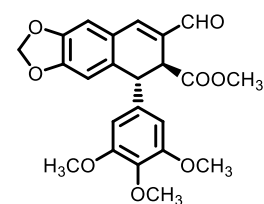
1



3



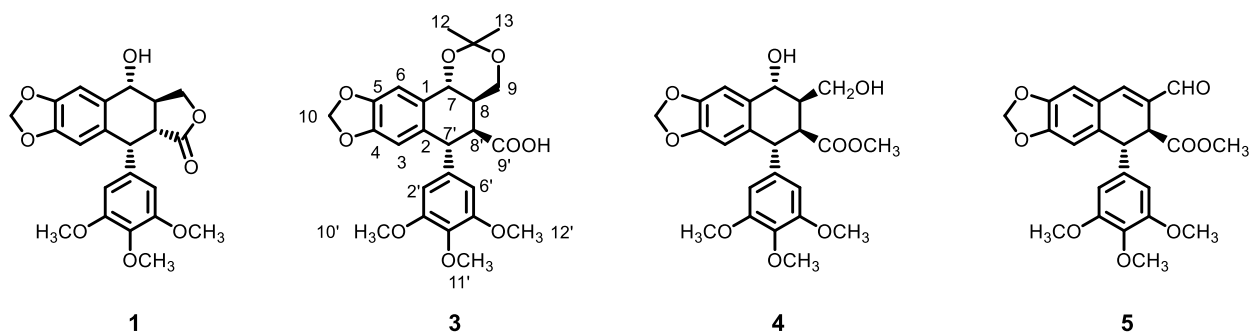
4



5

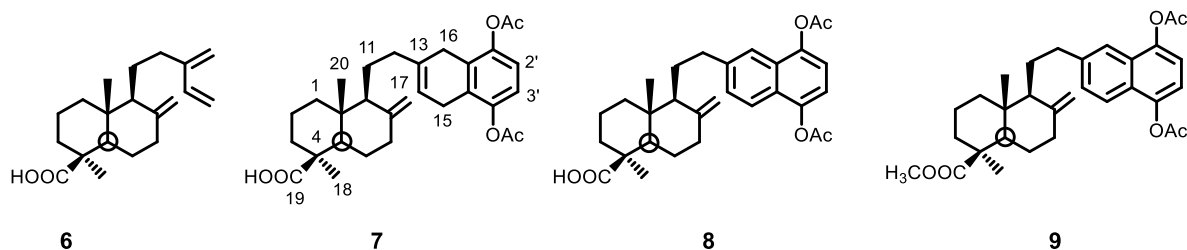
H	1	3	4	5
3	6,51 <i>s</i>	6,38 <i>s</i>	6,35 <i>s</i>	6,65 <i>s</i>
6	7,11 <i>s</i>	6,92 <i>s</i>	6,83 <i>s</i>	6,86 <i>s</i>
7	4,77 <i>d</i> (8)	4,92 <i>d</i> (10,8)	4,85 <i>d</i> (5,2)	7,34 <i>s</i>
8	2,80 <i>m</i>	2,25 <i>m</i>	2,40 - 2,54 <i>m</i>	
9	4,02 - 4,12 <i>m</i> 4,55 - 4,63 <i>m</i>	4,17 <i>t</i> (11,2) 3,63 <i>dd</i> (4,4, 11,2)	3,57 - 3,82 <i>m</i>	9,57 <i>s</i>
10	5,98 <i>d</i> (1,5) 5,97 <i>d</i> (1,5)	5,83 <i>d</i> (1,2) 5,85 <i>d</i> (1,2)	5,88 <i>s</i>	5,98 <i>s</i>
12, 13		1,43 <i>s</i> ; 1,54 <i>s</i>		
2'6'	6,37 <i>s</i>	6,29 <i>s</i>	6,37 <i>s</i>	6,18 <i>s</i>
7'	4,55 - 4,63 <i>m</i>	4,39 <i>bs</i>	4,25 <i>d</i> (8,0)	4,60 <i>d</i> (3,1)
8'	2,73 - 2,84 <i>m</i>	2,59 <i>dd</i> (1,6, 4,4)	3,37 <i>dd</i> (8,0; 3,7)	3,98 <i>d</i> (3,1)
10' 12'	3,75 <i>s</i>	3,77 <i>s</i>	3,76 <i>s</i>	3,70 <i>s</i>
11'	3,81 <i>s</i>	3,82 <i>s</i>	3,81 <i>s</i>	3,75 <i>s</i>
9'-OCH ₃			3,40 <i>s</i>	3,60 <i>s</i>

Tabla I: Datos de RMN de ^1H para los compuestos **1**, **3-5**. δ en ppm (J en Hz).



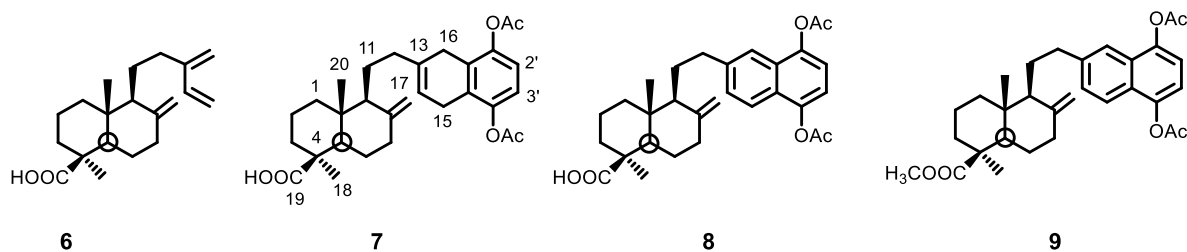
C	1	3	4	5
1	133,4	128,4	130,2	125,0
2	131,3	130,8	130,8	133,7
3	109,8	104,9	109,4	110,1
4	147,6	147,1	147,7	150,4
5	147,6	150,2	146,8	147,4
6	106,4	109,7	108,4	108,9
7	72,8	67,4	69,5	145,5
8	40,9	34,6	43,8	133,0
9	71,3	63,1	62,4	191,2
10	101,4	101,1	101,1	101,6
11		99,9		
12, 13		19,8; 30,0		
1'	135,4	140,7	140,2	137,0
2'6'	109,1	106,1	106,9	104,8
3'5'	153,8	153,2	153,1	153,2
4'	137,3	136,9	137,0	137,1
7'	44,2	46,8	45,5	46,2
8'	45,4	67,7	47,0	44,5
9'	174,3	178,1	174,9	172,0
10' 12'	56,5	59,3	56,3	56,2
11'	60,7	60,9	60,8	60,7
9'-OCH₃			51,9	52,5

Tabla II: Datos de RMN de ^{13}C para los compuestos **1, 3-5**. δ en ppm.



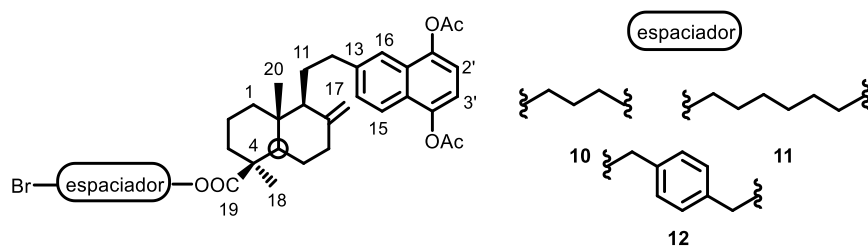
H	6	7	8	9
14	6,38 <i>dd</i> (17,5;11,0)	5,51 <i>m</i>	7,38 <i>d</i> (8,8;1,5)	7,39 <i>d</i> (8,8;1,6)
15	5,25 <i>d</i> (17,5) 5,06 <i>d</i> (11)		7,78 <i>d</i> (8,8)	7,78 <i>d</i> (8,8)
16	5,02 <i>m</i>		7,55 <i>s</i>	7,56 <i>d</i> (1,6)
17a	4,91 <i>sa</i>	4,86 <i>s</i>	4,97 <i>sa</i>	4,97 <i>s</i>
17b	4,60 <i>sa</i>	4,52 <i>s</i>	4,68 <i>sa</i>	4,68 <i>s</i>
18	1,27 <i>s</i>	1,19 <i>s</i>	1,20 <i>s</i>	1,16 <i>s</i>
20	0,63 <i>s</i>	1,17 <i>s</i>	0,61 <i>s</i>	0,51 <i>s</i>
2'		6,92 <i>s</i>	7,22 <i>d</i> (8,0)	7,21 <i>d</i> (8,0)
3'		6,92 <i>s</i>	7,17 <i>d</i> (8,0)	7,16 <i>d</i> (8,0)
-OAc		2,30 <i>s</i> , 2,32 <i>s</i>	2,45 <i>s</i> , 2,46 <i>s</i>	2,45 <i>s</i> , 2,46 <i>s</i>
19-OCH₃				3,60 <i>s</i>

Tabla III: Datos de RMN de ^1H para los compuestos **6-9**. δ en ppm (J en Hz).



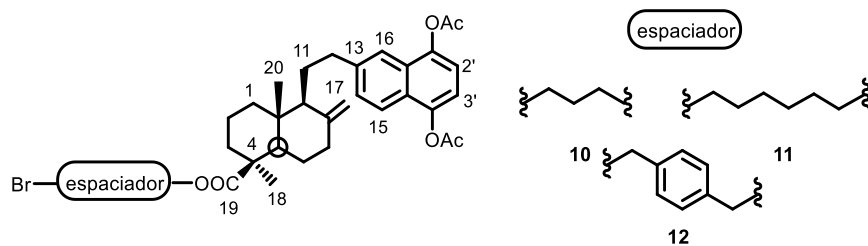
H	6	7	8	9
1	39,0	39,1	38,8	39,2
2	19,9	20,0	19,8	20,0
3	37,9	37,9	37,7	38,2
4	44,2	44,3	44,1	44,4
5	56,4	56,3	55,9	56,4
6	26,1	26,2	26,0	26,4
7	38,7	38,8	38,6	38,6
8	148,0	148,1	147,8	148,2
9	55,8	55,3	54,8	55,3
10	40,4	40,5	40,3	40,4
11	22,5	21,5	25,2	25,3
12	30,3	35,7	34,6	34,7
13	147,0	134,3	141,9	141,9
14	139,1	116,7	128,4	128,5
15	133,2	27,7	121,6	121,7
16	115,5	25,2	119,8	120,0
17	106,4	106,5	106,6	106,5
18	29,0	29,0	28,8	28,8
19	184,5	184,0	183,7	177,6
20	12,8	12,9	12,7	12,7
1', 4'		146,2	143,3; 144,2	144,1; 144,5
2', 3'		119,9	116,6; 117,6	116,7; 117,6
5', 6'		128,6	126,1; 127,7	126,3; 128,0
-OAc		20,3; 169,3	20,9; 169,4	20,9; 169,1
19-OCH ₃				51,0

Tabla IV: Datos de RMN de ¹³C para los compuestos 6-9. δ en ppm.



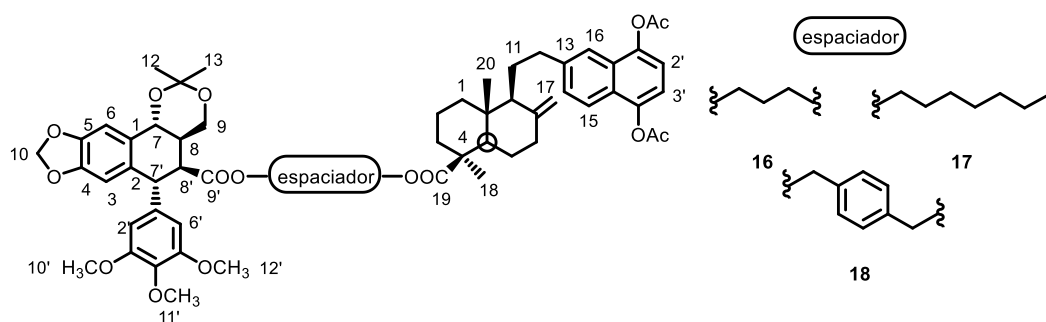
H	10	11	12
14	7,37 <i>dd</i> (1,6; 8,8)	7,37 <i>d</i> (1,6)	7,37 <i>dd</i> (1,6; 8,8)
15	7,76 <i>d</i> (8,8)	7,77 <i>d</i> (8,0)	7,76 <i>d</i> (8,8)
16	7,53 <i>d</i> (1,6)	7,48 <i>s</i>	7,51 <i>d</i> (1,6)
17a	4,67 <i>s</i>	4,52 <i>s</i>	4,67 <i>s</i>
17b	4,96 <i>s</i>	4,86 <i>s</i>	4,94 <i>s</i>
18	1,17 <i>s</i>	1,17 <i>s</i>	1,17 <i>s</i>
20	0,51 <i>s</i>	0,51 <i>s</i>	0,51 <i>s</i>
2'	7,15 <i>d</i> (8,2)	7,16 <i>d</i> (8,0)	7,15 <i>d</i> (8,0)
3'	7,19 <i>d</i> (8,2)	7,20 <i>d</i> (8,0)	7,18 <i>d</i> (8,0)
-OAc	2,44 <i>s</i> , 2,45 <i>s</i>	2,40 <i>s</i> , 2,44 <i>s</i>	2,40 <i>s</i> , 2,44 <i>s</i>
19-OOR	4,04 <i>m</i>	3,97 <i>m</i> 1,36 <i>m</i>	4,47 <i>s</i>
	2,10 <i>m</i>	1,89 <i>m</i> 1,60 <i>m</i>	5,10 <i>s</i>
	3,38 <i>t</i> (6,8)	1,44 <i>m</i> 3,38 <i>m</i>	7,26 <i>d</i> (8,4) 7,33 <i>d</i> (8,4)

Tabla V: Datos de RMN de ^1H para los compuestos **10-12**. δ en ppm (J en Hz).



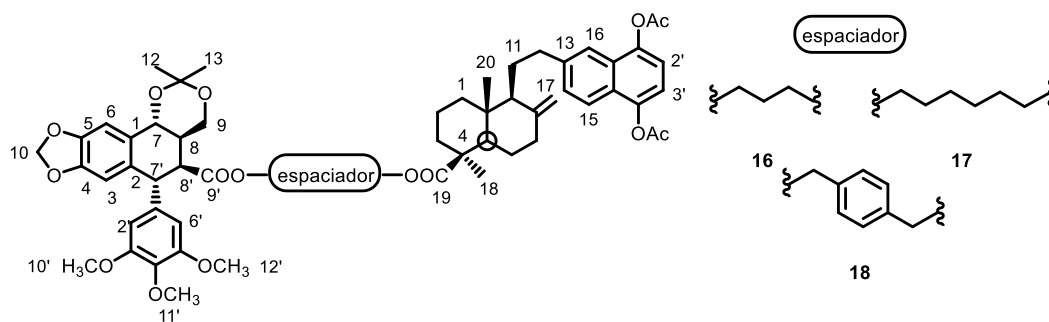
C	10	11	12
1	39,4	39,5	39,5
2	20,0	21,5	20,0
3	38,0	39,2	38,0
4	44,4	44,8	44,4
5	56,6	56,6	56,2
6	26,3	26,9	26,3
7	38,7	38,5	38,7
8	147,8	148,5	147,8
9	55,4	55,4	54,8
10	40,3	40,8	40,3
11	25,2	25,7	25,3
12	34,6	35,2	34,7
13	141,9	142,5	141,9
14	128,5	129,0	128,5
15	121,6	122,1	121,7
16	119,9	120,4	119,9
17	106,7	107,1	106,7
18	28,7	29,4	28,9
19	177,1	177,8	176,9
20	12,9	12,4	12,9
1', 4'	144,0 144,3	144,4 144,8	144,0 144,3
2' 3'	116,7 117,7	117,2 118,2	116,7 117,7
5' 6'	121,6 119,9	128,3 126,7	126,5 127,9
-OAc	21,0; 169,4	20,4; 170,0	21,0; 169,0
19-OOR	29,7	28,2 35,2	33,1 128,5
	31,4	28,8 38,6	65,4 129,2
	61,9	33,1 63,8	127,8 133,2
			128,4 136,4

Tabla VI: Datos de RMN de ^{13}C para los compuestos **10-12**, δ en ppm.



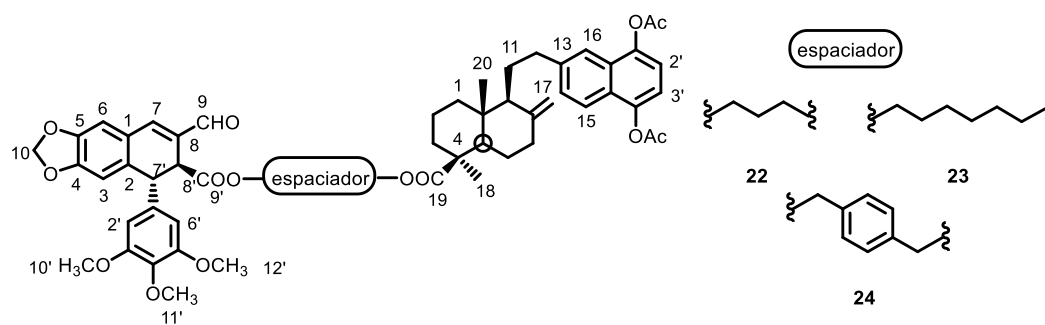
	H	16	17	18
Diterpeninaftohidroquinona	14	7,31 <i>dd</i> (1,6;8,8)	7,34 <i>d</i> (8,4)	7,36 <i>dd</i> (1,6, 8,0)
	15	7,71 <i>d</i> (8,8)	7,75 <i>d</i> (8,4)	7,77 <i>d</i> (8,0)
	16	7,47 <i>d</i> (1,6)	7,53 <i>d</i> (1,6)	7,54 <i>d</i> (1,6)
	17a	4,60 <i>s</i>	4,64 <i>s</i>	4,67 <i>s</i>
	17b	4,90 <i>s</i>	4,87 <i>s</i>	4,95 <i>s</i>
	18	1,19 <i>s</i>	1,23 <i>s</i>	1,24 <i>s</i>
	20	0,43 <i>s</i>	0,50 <i>s</i>	0,50 <i>s</i>
	2'	7,12 <i>d</i> (8,0)	7,15 <i>d</i> (8,0)	7,16 <i>d</i> (8,0)
	3'	7,14 <i>d</i> (8,0)	7,17 <i>d</i> (8,0)	7,18 <i>d</i> (8,0)
	-OAc	2,46 <i>s</i>	2,43 <i>s</i> , 2,45 <i>s</i>	2,46 <i>s</i>
espaciador		4,02 <i>m</i>	4,02 <i>m</i>	5,09 <i>m</i>
		3,95 <i>m</i>	3,99 <i>m</i>	5,12 <i>m</i>
		1,80 <i>m</i>	1,36-1,89 <i>m</i>	7,28 <i>d</i> (8,2) 7,29 <i>d</i> (8,2)
Ciclolignano	3	6,31 <i>s</i>	6,36 <i>s</i>	6,39 <i>s</i>
	6	6,99 <i>s</i>	6,95 <i>s</i>	6,95 <i>s</i>
	7	4,86 <i>d</i> (11,2)	4,92 <i>d</i> (14,0)	4,86 <i>d</i> (11,2)
	8	2,26 <i>m</i>	2,25 <i>m</i>	2,25 <i>m</i>
	9	4,02 <i>m</i>	3,67 <i>m</i>	4,00 <i>m</i>
	10	3,63 <i>dd</i> (4,8; 12,0)	3,96 <i>m</i>	3,62 <i>dd</i> (2,4; 11,2)
	12, 13	5,82 <i>s</i>	5,87 <i>s</i>	5,90 <i>s</i>
	12, 13	1,42 <i>s</i> ; 1,55 <i>s</i>	1,34 <i>s</i> ; 1,51 <i>s</i>	1,44 <i>s</i> ; 1,55 <i>s</i>
	2'6'	6,20 <i>s</i>	6,27 <i>s</i>	6,24 <i>s</i>
	7'	4,31 <i>sa</i>	4,37 <i>sa</i>	4,40 <i>sa</i>
	8'	2,71 <i>dd</i> (2,0; 4,8)	2,76 <i>m</i>	2,82 <i>dd</i> (2,0; 4,4)
10' 12'	3,76 <i>s</i>	3,74 <i>s</i>	3,75 <i>s</i>	
11'	3,71 <i>s</i>	3,70 <i>s</i>	3,72 <i>s</i>	

Tabla VII: Datos de RMN de ^1H para los compuestos **16-18**, δ en ppm (J en Hz)



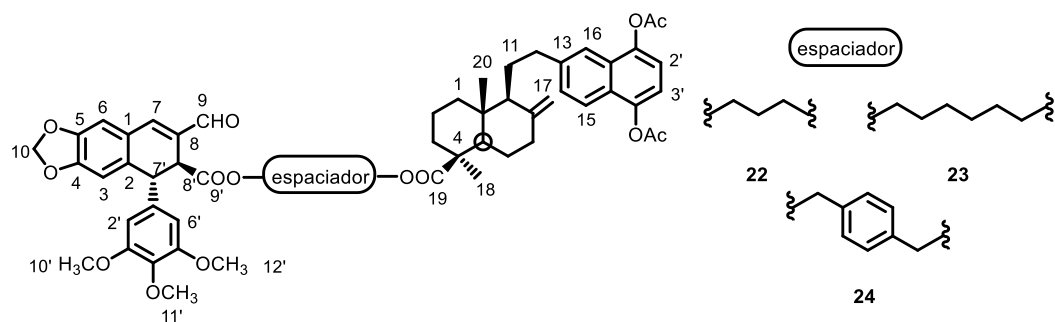
	C	16	17	18
Diterpenilquinona	1	38,6	38,9	38,7
	2	20,2	19,9	20,1
	3	38,5	38,2	38,5
	4	44,5	44,3	43,3
	5	55,9	56,1	56,1
	6	25,7	25,7	25,7
	7	38,7	38,6	38,6
	8	146,8	146,9	146,8
	9	55,0	54,8	54,8
	10	40,0	40,2	40,0
	11	26,0	25,5	25,8
	12	34,7	34,6	34,6
	13	141,7	141,6	141,7
	14	126,0	126,1	126,3
	15	121,8	121,6	121,6
	16	120,1	120,0	120,2
	17	106,6	106,5	106,6
	18	29,0	28,5	28,8
	19	177,4	177,2	177,1
20	12,9	12,8	12,7	
1', 4'	144,6	144,8	144,6	
2', 3'	117,3, 119,5	117,7, 119,9	117,3, 119,6	
5', 6'	126,5, 128,4	126,1, 128,1	126,3, 128,2	
-OAc	21,0; 169,5	21,0; 169,4	21,0; 169,3	
espaciador	39,2, 63,1, 65,0	28,3, 28,8, 35,3, 38,9, 63,1, 64,9	63,4, 65,7, 125,6, 125,8, 128,2, 128,7, 136,4, 136,7	
Ciclilignano	1	116,5	116,7	116,5
	2	130,6	130,8	130,8
	3	106,2	106,1	105,9
	4	147,4	147,1	147,3
	5	150,3	150,0	150,2
	6	109,3	109,5	109,6
	7	68,0	67,9	68,1
	8	29,0	28,9	28,7
	9	63,7	63,9	63,9
	10	101,0	100,9	100,7
	11	99,6	99,7	99,7
	12, 13	19,5, 29,7	19,5, 29,9	19,5, 29,8
	1'	140,8	140,6	140,6
	2'6'	104,8	104,7	104,6
3'5'	153,3	153,1	153,2	
4'	141,8	141,9	141,7	
7'	47,0	46,8	47,1	
8'	35,2	34,9	34,8	
9'	172,7	172,9	172,9	
10' 12'	59,7	59,7	59,7	
11'	60,9	60,8	61,0	

Tabla VIII: Datos de RMN de ^{13}C para los compuestos **16-18**. δ en ppm.



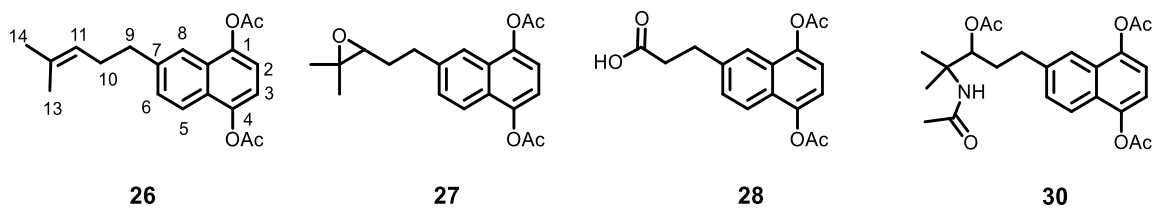
H		22	23	24
Diterpenilhidroquinona	14	7,37 <i>d</i> (8,4; 1,6)	7,37 <i>d</i> (8,8; 1,6)	7,36 <i>d</i> (8,8; 1,6)
	15	7,78 <i>d</i> (8,4)	7,78 <i>d</i> (8,8)	7,77 <i>d</i> (8,8)
	16	7,55 <i>d</i> (1,6)	7,55 <i>d</i> (1,6)	7,55 <i>d</i> (1,6)
	17a	4,67 <i>s</i>	4,67 <i>s</i>	4,66 <i>s</i>
	17b	4,95 <i>s</i>	5,00 <i>s</i>	4,96 <i>s</i>
	18	1,21 <i>s</i>	1,23 <i>s</i>	1,23 <i>s</i>
	20	0,50 <i>s</i>	0,50 <i>s</i>	0,50 <i>s</i>
	2'	7,16 <i>d</i> (8,0)	7,17 <i>d</i> (8,4)	7,16 <i>d</i> (8,0)
	3'	7,20 <i>d</i> (8,0)	7,21 <i>d</i> (8,4)	7,20 <i>d</i> (8,0)
	-OAc	2,45 <i>s</i>	2,45 <i>s</i> , 2,46 <i>s</i>	2,44 <i>s</i> , 2,45 <i>s</i>
espaciador		4,10 <i>m</i>	4,02 <i>m</i>	5,07 <i>m</i>
		3,82 <i>m</i>	3,97 <i>m</i>	5,09 <i>m</i>
		1,86 <i>m</i>	1,20-1,80 <i>m</i>	7,11 <i>d</i> (8,0) 7,25 <i>d</i> (8,0)
Ciclolignano	3	6,61 <i>s</i>	6,66 <i>s</i>	6,61 <i>s</i>
	6	6,87 <i>s</i>	6,88 <i>s</i>	6,89 <i>s</i>
	7	7,33 <i>s</i>	7,33 <i>s</i>	7,34 <i>s</i>
	9	9,59 <i>s</i>	9,60 <i>s</i>	9,60 <i>s</i>
	10	5,97 <i>s</i>	6,00 <i>s</i>	6,00 <i>s</i>
	2, 6'	6,20 <i>s</i>	6,21 <i>s</i>	6,21 <i>s</i>
	7'	4,60 <i>d</i> (3,2)	4,60 <i>d</i> (3,5)	4,60 <i>d</i> (5,2)
	8'	4,04 <i>d</i> (3,2)	3,97 <i>m</i>	4,06 <i>d</i> (5,2)
	10', 12'	3,72 <i>s</i>	3,73 <i>s</i>	3,72 <i>s</i>
11'	3,78 <i>s</i>	3,78 <i>s</i>	3,78 <i>s</i>	

Tabla IX: Datos de RMN de ^1H para los compuestos **22-24**. δ en ppm (J en Hz)



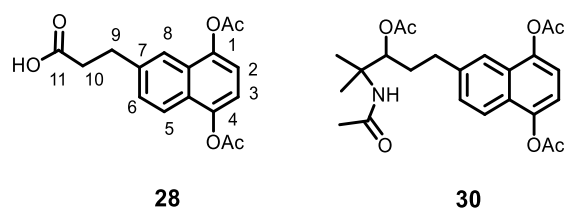
	C	22	23	24
Diterpenilquinona	1	38,6	38,9	38,7
	2	20,2	19,9	20,1
	3	38,5	38,2	38,5
	4	44,5	44,3	43,3
	5	55,9	56,1	56,1
	6	25,7	25,7	25,7
	7	38,7	38,6	38,6
	8	146,8	146,9	146,8
	9	55,0	54,8	54,8
	10	40,0	40,2	40,0
	11	26,0	25,5	25,8
	12	34,7	34,6	34,6
	13	141,7	141,6	141,7
	14	126,0	126,1	126,3
	15	121,8	121,6	121,6
	16	120,1	120,0	120,2
	17	106,6	106,5	106,6
	18	29,0	28,5	28,8
	19	177,4	177,2	177,1
	20	12,9	12,8	12,7
1', 4'	144,6	144,8	144,6	
2', 3'	117,3, 119,5	117,7, 119,9	117,3, 119,6	
5', 6'	126,5, 128,4	126,1, 128,1	126,3, 128,2	
-OAc	21,0; 169,5	21,0; 169,4	21,0; 169,3	
espaciador		34,6 60,7 61,8	25,2 28,4 38,0 39,0 63,9 65,1	65,5 66,6 127,6 127,8 128,0 128,3 136,0 136,3
Ciclignano	1	116,7	116,7	116,7
	2	133,1	133,3	133,3
	3	110,0	110,0	110,0
	4	147,3	147,2	147,5
	5	150,4	150,4	150,4
	6	108,8	108,8	108,8
	7	145,5	145,3	145,3
	8	133,6	133,7	133,8
	9	191,1	191,2	191,2
	10	101,7	101,6	101,8
	1'	137,1	137,2	137,2
	2', 6'	104,7	104,8	104,9
	3', 5'	153,2	153,2	141,9
	4'	141,9	141,9	153,2
7'	46,2	46,3	46,4	
8'	44,2	44,6	44,4	
9'	176,9	171,6	177,2	
10', 12'	56,1	56,8	56,2	
11'	60,2	60,7	60,7	

Tabla X: Datos de RMN de ^{13}C para los compuestos **22-24**. δ en ppm.



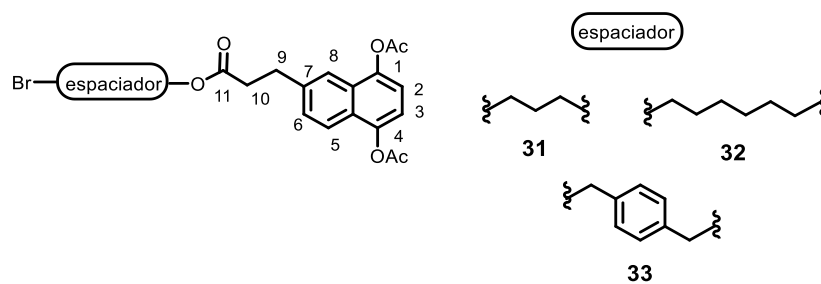
H	26	27	28	30
2	7,19 <i>d</i> (1,6)	7,19 <i>d</i> (4,4)	7,19 <i>d</i> (4,4)	7,25 <i>d</i> (8,4)
3	7,17 <i>d</i> (1,6)	7,22 <i>d</i> (4,4)	7,22 <i>d</i> (4,4)	7,17 <i>d</i> (8,4)
1-OAc	2,48 <i>s</i>	2,48 <i>s</i>	2,47 <i>s</i>	2,48 <i>s</i>
4-OAc	2,47 <i>s</i>	2,45 <i>s</i>	2,43 <i>s</i>	2,45 <i>s</i>
5	7,62 <i>d</i> (1,8)	7,80 <i>d</i> (7,2)	7,80 <i>d</i> (7,2)	7,79 <i>d</i> (8,6)
7	7,42 <i>dd</i> (1,8; 8,4)	7,41 <i>dd</i> (1,6; 7,2)	7,41 <i>dd</i> (1,6; 7,2)	7,37 <i>dd</i> (1,2; 8,6)
8	7,79 <i>d</i> (8,4)	7,66 <i>d</i> (1,6)	7,66 <i>d</i> (1,6)	7,61 <i>d</i> (1,2)
9	2,81 <i>t</i> (7,6)	2,79 <i>t</i> (7,6)	2,76 <i>t</i> (8)	2,77 <i>m</i>
10	2,42 <i>m</i>	1,91 <i>m</i>	3,14 <i>t</i> (8)	1,97 <i>m</i>
11	5,19 <i>m</i>	2,91 <i>m</i>		5,28 <i>m</i>
13	1,57 <i>s</i>	1,28 <i>s</i>		1,36 <i>s</i>
14	1,70 <i>s</i>	1,61 <i>s</i>		1,31 <i>s</i>
11-OAc				2,04 <i>s</i>
12-NHAc				1,90

Tabla XI: Datos de RMN de ^1H para los compuestos **26-28**. δ en ppm (J en Hz).



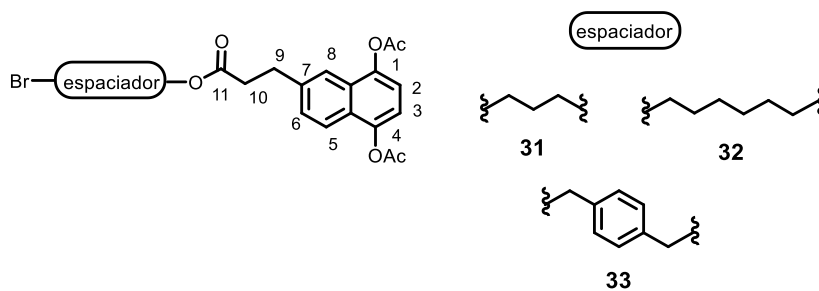
C	28	30
1	144,3	144,6
2	118,1	118,1
3	117,4	117,3
4	144,0	144,2
4a	126,7	126,5
1-OAc	21,4; 169,5	169,9
4-OAc	21,3; 169,5	169,7
5	122,2	122,2
6	128,0	128,4
7	137,1	140,5
8	120,2	120,5
8a	128,0	128,0
9	35,6	31,3
10	31,1	33,2
11	171,6	77,3
12		57,0
13		21,3 [#]
14		21,2 [#]
11-OAc		171,4; 24,8
12-NHAc		169,6; 22,4

Tabla XII: Datos de RMN de ^{13}C para los compuestos **28** y **30**. δ en ppm.



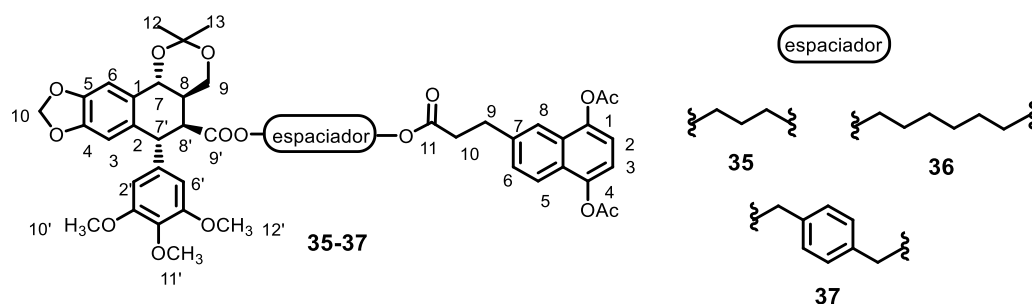
H	31	32	33
2	7,21 <i>d</i> (8,0)	7,21 <i>d</i> (8,0)	7,22 <i>d</i> (8,0)
3	7,17 <i>d</i> (8,0)	7,17 <i>d</i> (8,0)	7,20 <i>d</i> (8,0)
1-OAc	2,39 <i>s</i>	2,39 <i>s</i>	2,46 <i>s</i>
4-OAc	2,37 <i>s</i>	2,37 <i>s</i>	2,46 <i>s</i>
5	7,71 <i>d</i> (8,8)	7,71 <i>d</i> (8,8)	7,80 <i>d</i> (8,8)
7	7,32 <i>dd</i> (1,8; 8,8)	7,32 <i>dd</i> (1,8; 8,8)	7,38 <i>dd</i> (1,8; 8,8)
8	7,66 <i>d</i> (1,8)	7,66 <i>d</i> (1,8)	7,66 <i>d</i> (1,8)
9	3,03 <i>t</i> (8)	3,03 <i>t</i> (8)	3,15 <i>t</i> (7,6)
10	2,60 <i>t</i> (8)	2,60 <i>t</i> (8)	2,78 <i>t</i> (7,6)
<u>C₁₁OOR</u>		3,97 <i>t</i> (6,8)	
	4,04 <i>t</i> (7,2)	1,71 <i>m</i>	5,10 <i>s</i>
	1,96 <i>m</i>	1,27 <i>m</i>	7,33 <i>d</i> (8,4)
	3,22 <i>t</i> (6,4)	1,19 <i>m</i>	7,26 <i>d</i> (8,4)
		1,48 <i>m</i>	4,47 <i>s</i>
		3,28 <i>t</i> (7,2)	

Tabla XIII: Datos de RMN de ¹H para los compuestos **31-33**. δ en ppm (*J* en Hz).



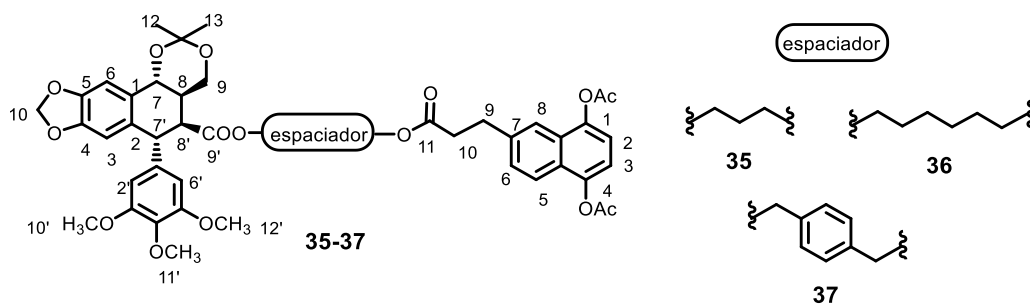
C	31	32	33
1	144,7	147,2	147,5
2	118,1	118,1	117,9
3	117,2	117,4	117,1
4	144,5	147,0	147,2
4a	126,7	126,4	127,1
1-OAc	21,5; 169,9	21,3; 169,6	20,0; 169,4
4-OAc	21,5; 169,9	21,2; 169,6	20,0; 169,6
5	122,9	122,2	122,3
6	129,0	128,3	129,2
7	142,5	140,9	140,5
8	120,4	120,2	120,3
8a	128,3	128,0	127,9
9	34,1	35,1	35,6
10	33,1	31,5	31,2
11	177,8	177,8	177,3
		27,4	
	29,1	27,7	33,1 129,4
11-OOR	35,5	28,4	127,0 133,3
	64,5	33,8	128,7 136,6
		64,8	

Tabla XIV: Datos de RMN de ^{13}C para los compuestos **31** y **33**, δ en ppm,



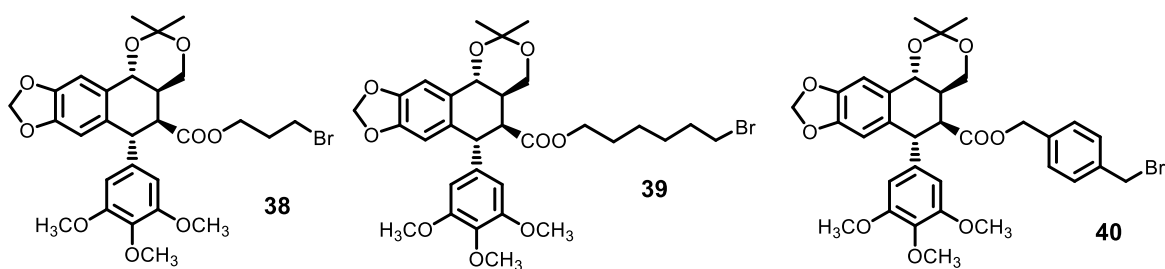
	H	35	36	37
Monoterpenilhidroquinona	2	7,21 <i>d</i> (8,0)	7,21 <i>d</i> (8,0)	7,22 <i>d</i> (8,0)
	3	7,17 <i>d</i> (8,0)	7,17 <i>d</i> (8,0)	7,18 <i>d</i> (8,0)
	5	4,90 <i>s</i>	7,78 <i>d</i> (8,8)	7,78 <i>d</i> (8,0)
	7	1,19 <i>s</i>	7,40 <i>dd</i> (2,0; 8,8)	7,39 <i>dd</i> (1,8; 8,0)
	8	0,43 <i>s</i>	7,64 <i>d</i> (2,0)	7,66 <i>d</i> (1,8)
	9	7,12 <i>d</i> (8,0)	3,11 <i>t</i> (7,6)	3,14 <i>t</i> (7,6)
	10	7,14 <i>d</i> (8,0)	2,66 <i>t</i> (7,6)	2,82 <i>t</i> (7,6)
	-OAc	2,44 <i>s</i> ; 2,45 <i>s</i>	2,44 <i>s</i> , 2,45 <i>s</i>	2,45 <i>s</i>
Ciclolignano	espaciador	4,02 <i>m</i> 1,80 <i>m</i> 1,25 <i>m</i>	4,02 <i>m</i> 3,99 <i>m</i> 1,25-1,80 <i>m</i>	5,19 <i>d</i> (10,4) 5,09 <i>d</i> (10,4) 7,24 <i>d</i> (7,6) 7,10 <i>d</i> (7,6)
	3	6,38 <i>s</i>	6,38 <i>s</i>	6,39 <i>s</i>
	6	6,97 <i>s</i>	6,97 <i>s</i>	6,95 <i>s</i>
	7	4,90 <i>d</i> (10,8)	4,90 <i>d</i> (10,8)	4,75 <i>d</i> (10,8)
	8	2,17 <i>m</i>	2,17 <i>m</i>	2,25 <i>m</i>
	9	4,04 <i>m</i> 3,68 <i>dd</i> (4,4; 11,2)	4,04 <i>m</i> 3,68 <i>dd</i> (4,4; 11,2)	3,96 <i>t</i> (11,6) 3,63 <i>dd</i> (3,6; 11,6)
	10	5,89 <i>s</i>	5,89 <i>s</i>	5,90 <i>s</i>
	12, 13	1,49 <i>s</i> ; 1,55 <i>s</i>	1,49 <i>s</i> ; 1,55 <i>s</i>	1,34 <i>s</i> ; 1,51 <i>s</i>
	2' 6'	6,25 <i>s</i>	6,25 <i>s</i>	6,24 <i>s</i>
	7'	4,72 <i>d</i> (10,2)	4,72 <i>d</i> (10,2)	4,74 <i>d</i> (10,8)
8'	2,78 <i>m</i>	2,78 <i>m</i>	2,25 <i>m</i>	
10' 12'	3,78 <i>s</i>	3,78 <i>s</i>	3,74 <i>s</i>	
11'	3,83 <i>s</i>	3,83 <i>s</i>	3,79 <i>s</i>	

Tabla XV: Datos de RMN de ^1H para los compuestos **35-37**, δ en ppm (J en Hz)



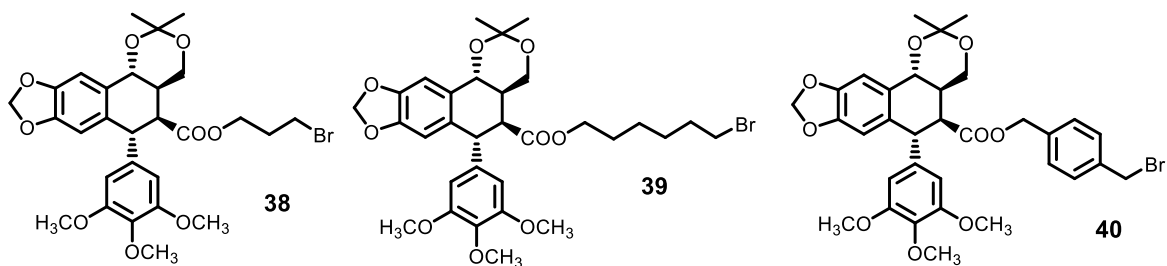
	C	35	36	37
Monoterpenilhidroquinona	1	147,0	147,2	147,5
	2	117,9	118,1	117,9
	3	117,2	117,4	117,1
	4	147,0	147,0	147,2
	4a	126,3	126,4	127,1
	1-OAc	21,0; 169,3	21,3; 169,6	20,0; 169,4
	4-OAc	21,0; 169,3	21,2; 169,6	20,0; 169,6
	5	122,0	122,2	122,3
	6	128,4	128,3	129,2
	7	140,5	140,9	140,5
	8	120,3	120,2	120,3
8a	128,0	128,0	127,9	
9	35,6	35,1	35,6	
10	31,6	31,5	31,2	
11	172,0	172,2	172,3	
	espaciador	35,2; 65,8; 66,3	65,0; 64,6; 35,1 28,7; 25,7; 25,6	136,2; 135,4; 128,7; 128,7; 67,2; 66,9
Ciclignano	1	126,3	126,6	128,0
	2	130,8	131,1	130,8
	3	105,1	105,0	104,7
	4	147,1	147,2	147,0
	5	150,0	147,2	146,9
	6	109,5	109,7	109,5
	7	67,9	68,1	67,8
	8	29,0	35,8	34,9
	9	63,7	63,3	62,9
	10	101,0	99,9	101,0
	11	99,6	98,7	99,6
	12, 13	30,0; 19,6	30,1; 19,8	29,9; 19,3
	1'	137,3	138,2	140,5
	2'6'	106,4	106,4	106,1
	3'5'	152,9	153,3	153,1
4'	137,9	137,7	136,8	
7'	46,8	47,0	46,6	
8'	68,0	68,1	67,8	
9'	172,1	173,1	172,4	
10' 12'	56,2	56,4	60,8	
11'	60,8	61,1	62,9	

Tabla XVI: Datos de RMN de ^{13}C para los compuestos **35-37**. δ en ppm.



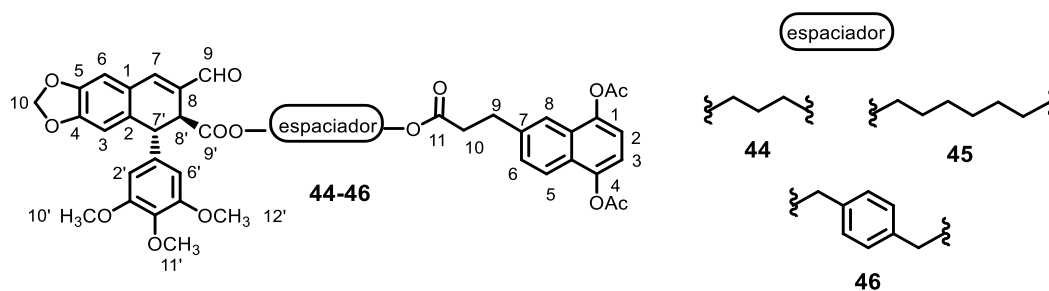
H	38	39	40
3	6,38 <i>s</i>	6,37 <i>s</i>	6,39 <i>s</i>
6	6,98 <i>s</i>	6,95 <i>s</i>	6,95 <i>s</i>
7	4,89 <i>d</i> (10,8)	4,88 <i>d</i> (11,2)	4,73 <i>d</i> (8,0)
8	2,25 <i>m</i>	2,25 <i>m</i>	2,38 <i>m</i>
9	4,10 <i>m</i> 3,68 <i>m</i>	4,08 <i>t</i> (11,2) 3,68 <i>dd</i> (4,4, 11,2)	4,01 <i>m</i> 2,82 <i>dd</i> (4,4; 11,2)
10	5,90 <i>d</i> (1,6) 5,89 <i>d</i> (1,6)	5,88 <i>s</i>	5,91 <i>s</i>
12, 13	1,49 <i>s</i> ; 1,58 <i>s</i>	1,47 <i>s</i> ; 1,56 <i>s</i>	1,44 <i>s</i> ; 1,54 <i>s</i>
2'6'	6,25 <i>s</i>	6,23 <i>s</i>	6,24 <i>s</i>
7'	4,37 <i>m</i>	4,37 <i>d</i> (1,2)	4,47 <i>d</i> (2,2)
8'	2,50 <i>m</i>	2,76 <i>dd</i> (2,0; 8,0)	2,75 <i>s</i>
10' 12'	3,77 <i>s</i>	3,74 <i>s</i>	3,75 <i>s</i>
11'	3,82 <i>s</i>	3,76 <i>s</i>	3,81 <i>s</i>
C ₉ OOR	2,13 <i>m</i>	1,28 <i>m</i> 1,77 <i>m</i>	4,47 <i>s</i>
	3,30 <i>m</i>	1,39 <i>m</i> 3,35 <i>t</i> (6,4)	5,09 <i>d</i> (12,0) 7,34 <i>d</i> (12,0)
	4,26 <i>m</i>	160 <i>m</i> 4,14 <i>m</i>	5,20 <i>d</i> (12,0) 7,38 <i>d</i> (12,0)

Tabla XVII: Datos de RMN de ^1H para los compuestos **38-40**, δ en ppm (J en Hz)



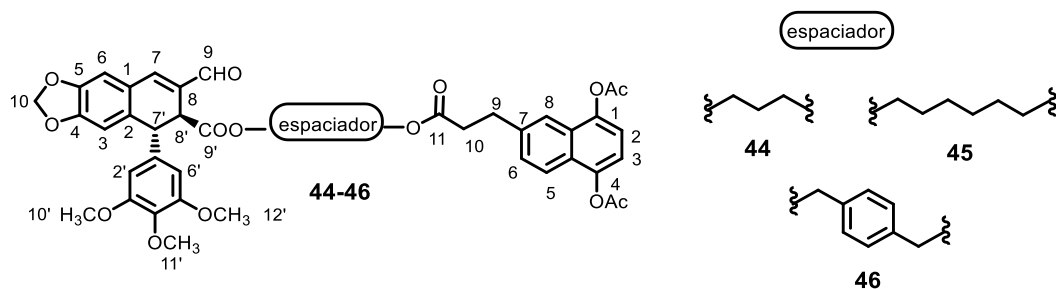
C	38	39	40
1	128,7	128,7	128,7
2	130,8	130,7	130,8
3	104,7	104,7	104,7
4	146,8	146,8	146,8
5	147,0	147,0	147,0
6	109,4	109,5	109,4
7	67,8	67,8	67,8
8	34,8	34,9	34,9
9	63,1	63,1	62,5
10	101,0	101,0	101,0
11	99,7	99,7	99,7
12, 13	19,5; 30,0	19,5; 29,9	19,8; 29,9
1'	140,4	140,6	140,4
2'6'	106,1	106,1	106,0
3'5'	153,2	153,1	153,1
4'	136,8	136,7	136,8
7'	46,7	46,7	46,6
8'	68,0	68,0	68,0
9'	172,7	172,9	172,7
10' 12'	56,2	56,3	56,1
11'	60,8	60,7	60,9
9'-OOR	29,1	27,4	33,1
	31,4	27,7	128,0
	62,5	28,4	133,8
		33,8	128,7
		64,8	136,0

Tabla XVIII: Datos de RMN de ^{13}C para los compuestos **38-40**, δ en ppm.



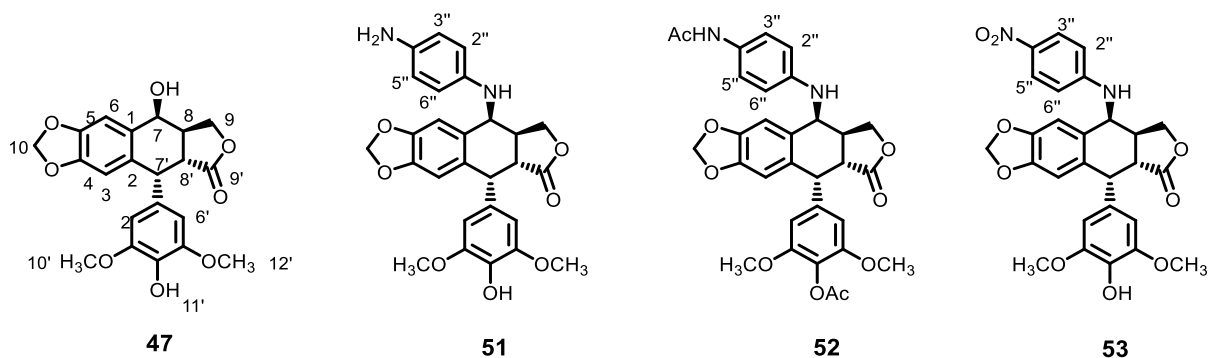
	H	44	45	46
Monoterpenilhidroquinona	2	7,21 <i>d</i> (8,0)	7,20 <i>d</i> (8,0)	7,22 <i>d</i> (8,0)
	3	7,18 <i>d</i> (8,0)	7,17 <i>d</i> (8,0)	7,18 <i>d</i> (8,0)
	5	7,78 <i>d</i> (8,0)	7,78 <i>d</i> (9,0)	7,78 <i>d</i> (8,0)
	7	7,39 <i>dd</i> (1,8; 8,0)	7,39 <i>dd</i> (0,8; 9,0)	7,39 <i>dd</i> (1,8; 8,0)
	8	7,64 <i>d</i> (1,8)	7,66 <i>d</i> (0,8)	7,66 <i>d</i> (1,8)
	9	3,08 <i>t</i> (8,0)	3,01 <i>t</i> (7,6)	3,13 <i>t</i> (7,6)
	10	2,66 <i>t</i> (8,0)	2,67 <i>t</i> (7,6)	2,74 <i>t</i> (7,6)
	-OAc	2,43 <i>s</i> ; 2,45 <i>s</i>	2,43 <i>s</i> , 2,45 <i>s</i>	2,44 <i>s</i> , 2,45 <i>s</i>
Ciclolignano	espaciador	4,06 <i>t</i> (6,0) 1,88 <i>m</i> 3,98 <i>t</i> (4,0)	4,02 <i>t</i> (6,8) 1,54 <i>m</i> 1,46 <i>m</i> 1,23 <i>m</i> 1,20 <i>m</i> 3,97 <i>m</i>	5,08 <i>d</i> (10,8) 5,06 <i>d</i> (10,8) 7,24 <i>d</i> (7,6) 7,10 <i>d</i> (7,6) 5,09 <i>m</i>
	3	6,47 <i>s</i>	6,50 <i>s</i>	6,61 <i>s</i>
	6	6,87 <i>s</i>	6,87 <i>s</i>	6,88 <i>s</i>
	7	7,33 <i>s</i>	7,41 <i>s</i>	7,38 <i>s</i>
	9	9,59 <i>s</i>	9,59 <i>s</i>	9,59 <i>s</i>
	10	5,98 <i>s</i>	5,98 <i>s</i>	6,00 <i>s</i>
	2, 6'	6,21 <i>s</i>	6,20 <i>s</i>	6,20 <i>s</i>
	7'	4,59 <i>d</i> (4,0)	4,59 <i>d</i> (3,2)	4,58 <i>d</i> (4)
	8'	2,82 <i>d</i> (3,6)	3,97 <i>m</i>	4,04 <i>d</i> (4)
	10',12'	3,73 <i>s</i>	3,73 <i>s</i>	3,76 <i>s</i>
11'	3,75 <i>s</i>	3,76 <i>s</i>	3,81 <i>s</i>	

Tabla XIX: Datos de RMN de ^1H para los compuestos 44-46, δ en ppm (J en Hz),



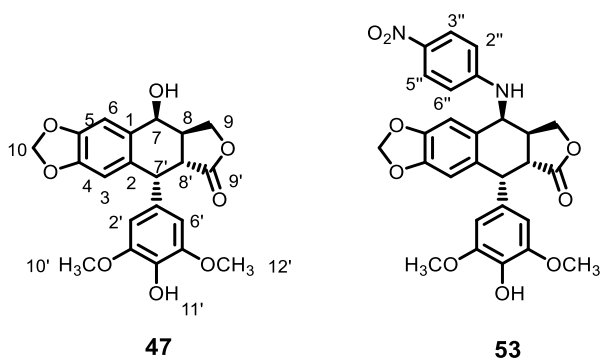
	C	44	45	46
Monoterpenhidroquinona	1	144,3	145,5	144,3
	2	117,9	119,4	118,1
	3	117,1	118,6	117,4
	4	144,0	145,5	144,0
	4a	126,4	129,7	122,2
	1-OAc	21,0; 169,4	22,6; 170,9	21,3; 169,5
	4-OAc	21,0; 169,4	22,6; 170,9	21,4; 169,6
	5	122,0	123,5	122,2
	6	128,0	129,3	128,0
	7	147,4	141,0	137,1
	8	120,1	121,7	120,2
8a	127,7	129,7	182,1	
9	31,1	37,2	35,6	
10	27,7	32,8	31,1	
11	171,6	173,2	171,6	
espaciador		35,5		133,7
		60,7	25,2 28,4 38,0	128,3
		61,6	39,0 63,9 65,1	127,8
				133,1
				66,0
Cicliignano	1	125,0	126,7	125,3
	2	133,1	135,3	133,8
	3	110,0	111,6	117,1
	4	150,5	151,9	150,4
	5	108,9	151,9	150,1
	6	147,4	110,4	110,0
	7	133,7	146,9	145,6
	8	191,2	134,8	133,1
	9	101,8	192,8	191,2
	10	125,0	103,3	101,8
	1'	137,0	35,6	135,7
	2', 6'	104,8	107,0	104,8
	3', 5'	153,2	154,7	153,2
	4'	139,4	138,7	136,9
	7'	46,4	47,8	46,4
8'	44,7	46,1	44,4	
9'	172,4	174,2	172,4	
10', 12'	60,7	57,7	56,1	
11'	56,1	62,3	60,7	

Tabla XX: Datos de RMN de ^{13}C para los compuestos **44-46**, δ en ppm,



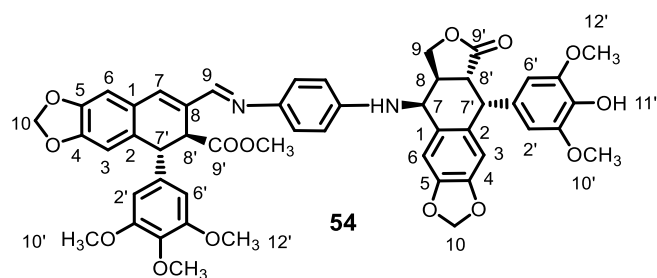
H	47	51	52	53
3	6,48 <i>s</i>	6,45 <i>s</i>	6,48 <i>s</i>	6,46 <i>s</i>
6	6,80 <i>s</i>	6,70 <i>s</i>	6,70 <i>s</i>	6,69 <i>s</i>
7	4,79 <i>d</i> (2,8)	4,53 <i>d</i> (4,8)	4,56 <i>d</i> (5,2)	4,51 <i>d</i> (4)
8	2,78 <i>m</i>	2,85 <i>m</i>	2,92 <i>m</i>	
9	4,29 <i>m</i>	4,29 <i>m</i>	4,34 <i>m</i>	2,99 <i>m</i>
	3,20 <i>m</i>	3,09 <i>m</i>	3,10 <i>dd</i> (5,4; 14)	
10	5,90 <i>d</i> (1,2)	5,90 <i>s</i>	5,90 <i>s</i>	5,88 <i>d</i> (4)
	5,93 <i>d</i> (1,2)			5,91 <i>d</i> (4)
2'6'	6,21 <i>s</i>	6,26 <i>s</i>	6,28 <i>s</i>	6,24 <i>s</i>
7'	4,55 <i>m</i>	4,39 <i>sa</i>	4,25 <i>m</i>	4,60 <i>m</i>
8'	2,84 <i>m</i>	2,79 <i>m</i>	2,73 <i>m</i>	2,77 <i>m</i>
10' 12'	3,70 <i>s</i>	3,72 <i>s</i>	3,63 <i>s</i>	3,70 <i>s</i>
-OAc			1,98 <i>s</i> , 2,24 <i>s</i>	
espaciador	2'', 6''	6,58 <i>d</i> (8)	6,24 <i>d</i> (8)	6,50 <i>d</i> (8)
	3'', 5''	6,36 <i>d</i> (8)	6,43 <i>d</i> (8)	8,04 <i>d</i> (8)

Tabla XXI: Datos de RMN de ^1H para los compuestos **47** y **51-53**, δ en ppm (J en Hz)



C	47	53
1	132,1	130,2
2	131,8	128,8
3	110,5	110,1
4	146,4	146,5
5	147,4	147,8
6	108,9	109,1
7	66,7	52,1
8	38,1	38,3
9	67,6	66,3
10	101,5	101,3
1'	132,0	132,3
2'6'	107,8	107,9
3'5'	148,6	148,6
4'	134,0	134,2
7'	43,7	43,4
8'	40,6	41,9
9'	175,1	174,2
10' 12'	56,5	56,5
espaciador	1''	152,6
	2'',6''	111,1
	3'', 5''	126,7
	4''	139,7

Tabla XXII: Datos de RMN de ^1H para los compuestos **47** y **53**, δ en ppm



H	54			H
	Fragmento aldehído podofílico	espaciador	Fragmento 4'-desmetilepodofilotoxina	
3	6,61 <i>s</i>	6,46 <i>d</i> (8,8)	6,46 <i>s</i>	3
6	6,73 <i>s</i>	7,03 <i>d</i> (8,8)	6,70 <i>s</i>	6
7	6,91 <i>s</i>		4,53 <i>d</i> (5,2)	7
8			2,85 <i>m</i>	8
9	8,18 <i>s</i>		4,30 <i>m</i>	9
10	5,91 <i>s</i>		3,09 <i>m</i>	10
2'6'	6,28 <i>s</i>		5,90 <i>s</i>	2'6'
7'	4,50 <i>d</i> (3,2)		6,26 <i>s</i>	7'
8'	4,36 <i>d</i> (3,2)		4,39 <i>sa</i>	8'
10' 12'	3,71 <i>s</i>		2,79 <i>m</i>	10' 12'
11'	3,74 <i>s</i>		3,72 <i>s</i>	
9'-OCH₃	3,60 <i>s</i>		3,40 <i>s</i>	

Tabla XXIII: Datos de RMN de ¹H para el compuesto **54**. δ en ppm-

Espectros

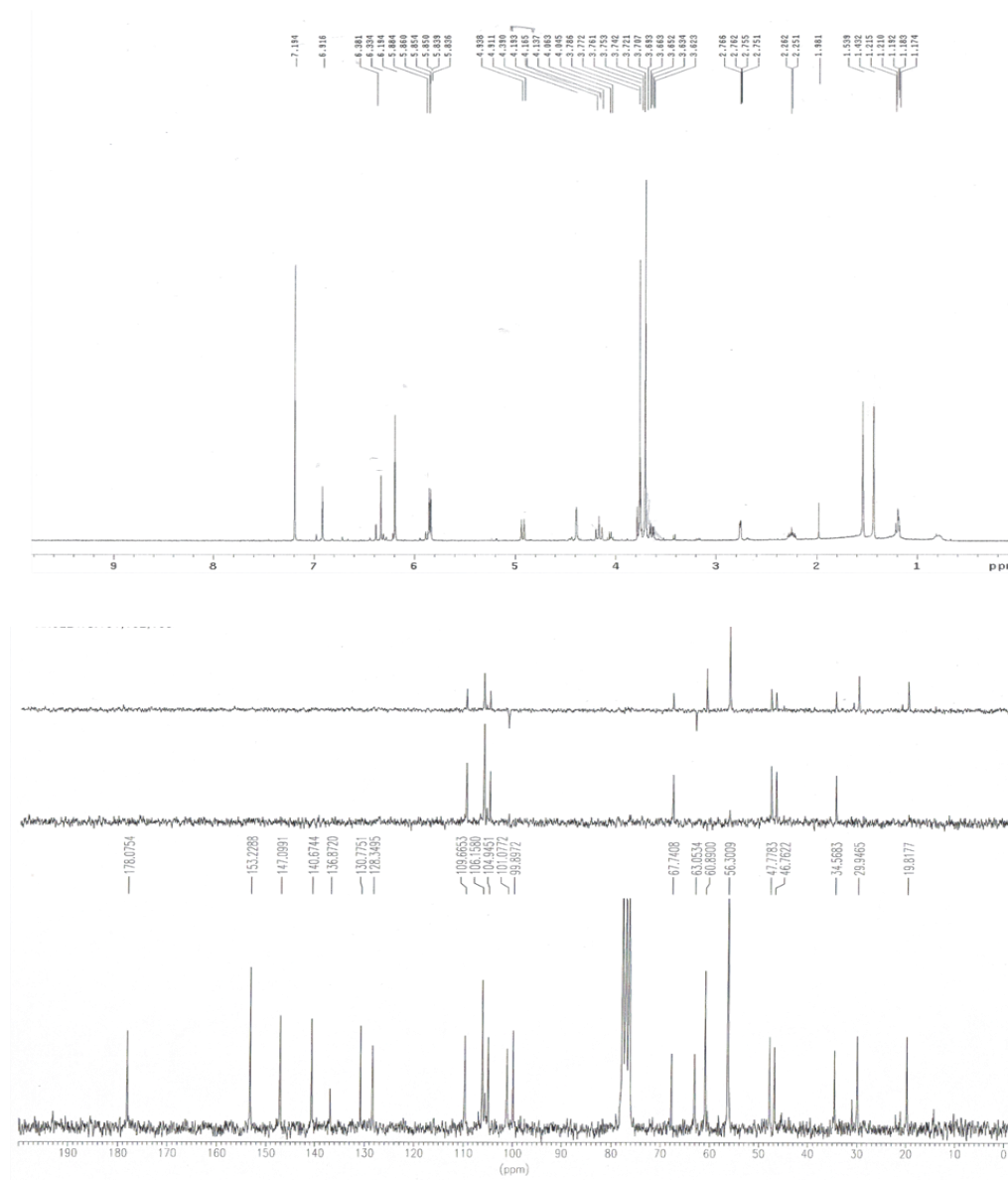
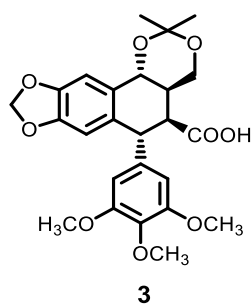
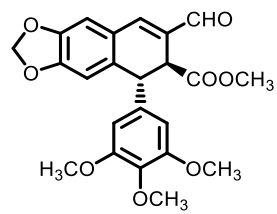


Figura I: Espectro de RMN de ¹H (200 MHz) y ¹³C (50,3 MHz) del compuesto **3***

* Se indica exclusivamente el uso del aparato Bruker Ac 200 MHz, el resto de espectros fueron realizados en un aparato de 400 MHz



5

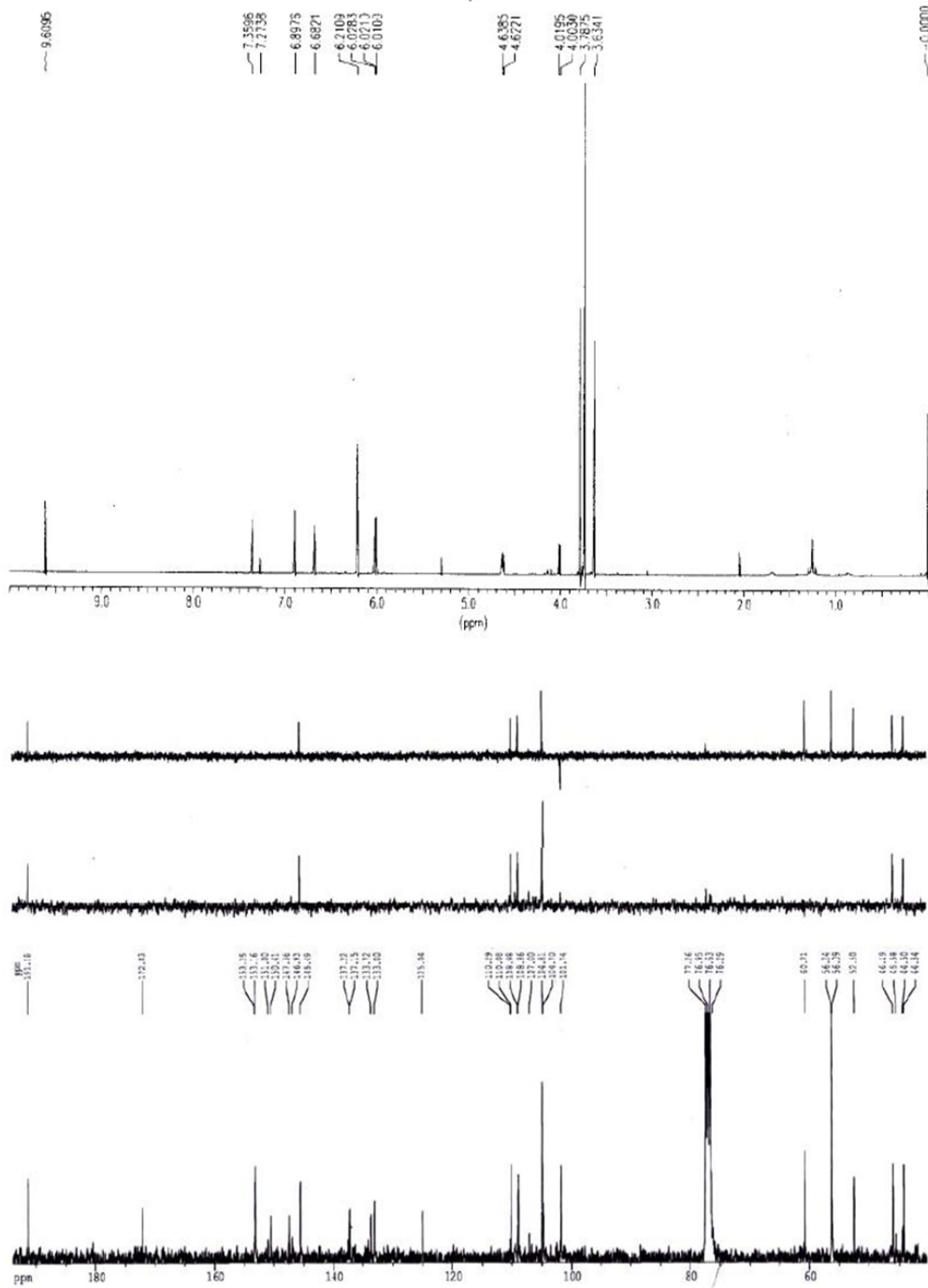
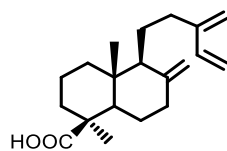


Figura II: Espectro de RMN de ¹H (200 MHz) y ¹³C (50,3 MHz) del compuesto 5



6

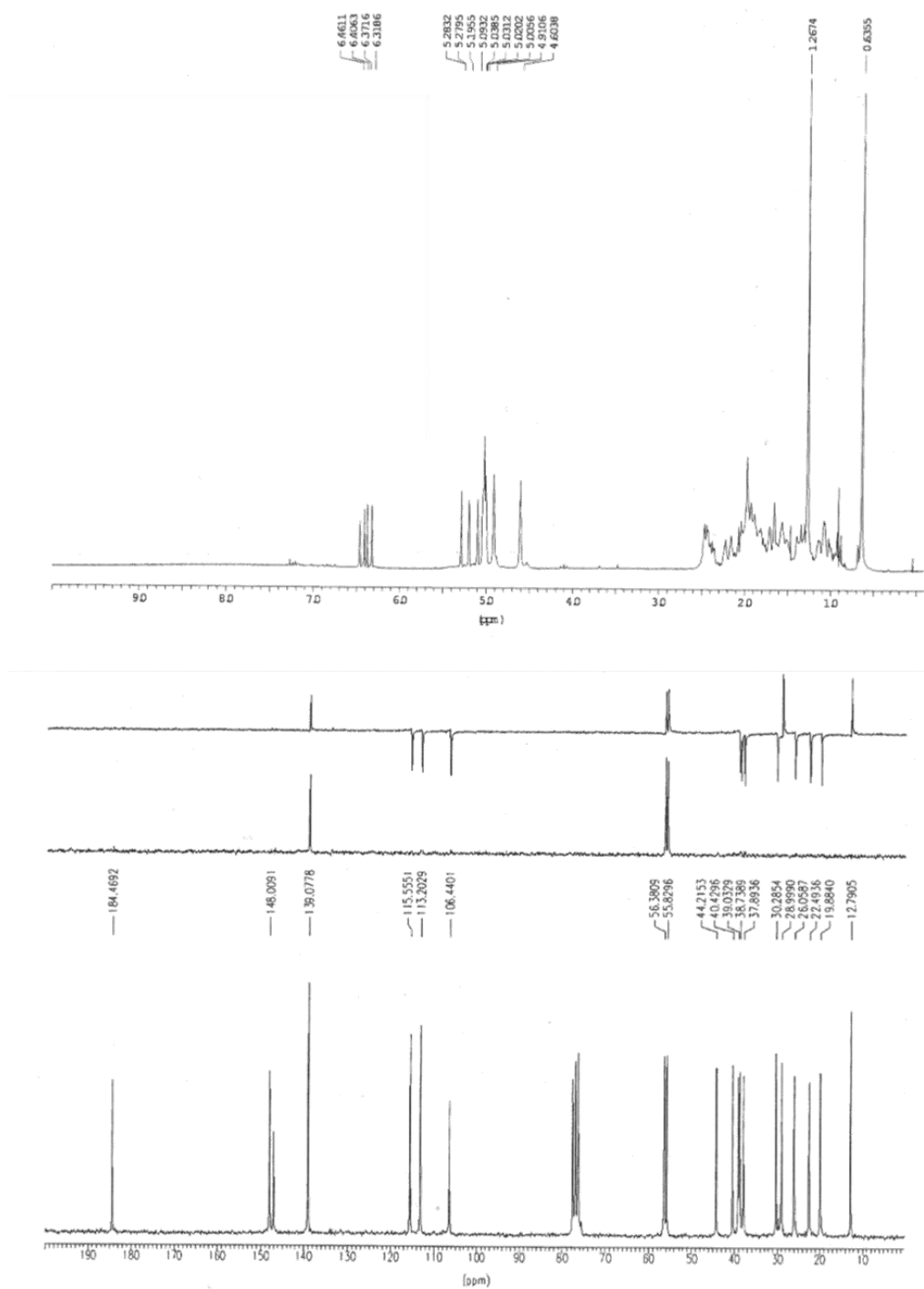


Figura III: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) y ^{13}C (50,3 MHz) del compuesto 6.

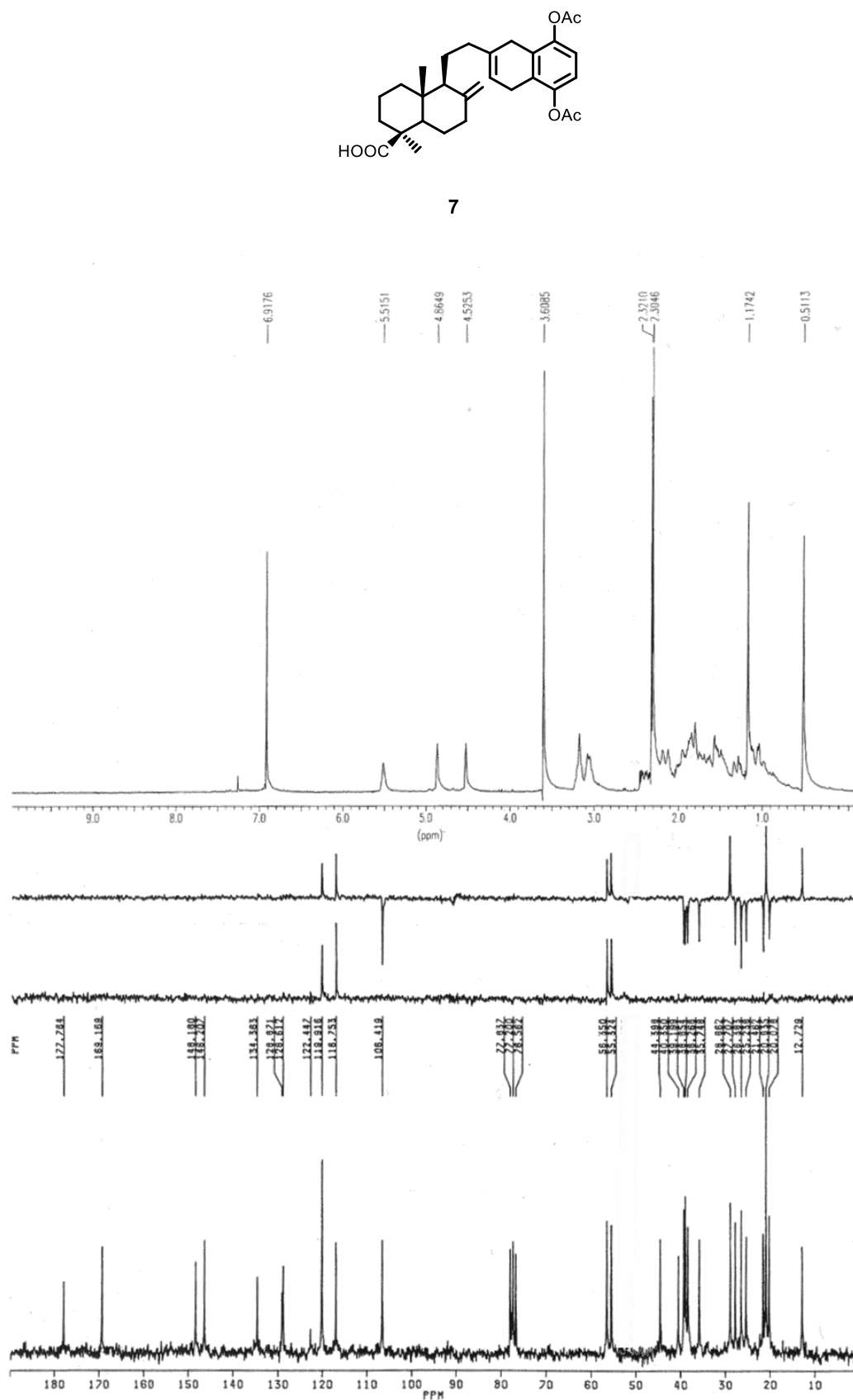
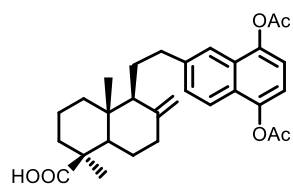


Figura IV: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) y ^{13}C (50,3 MHz) del compuesto 7.



8

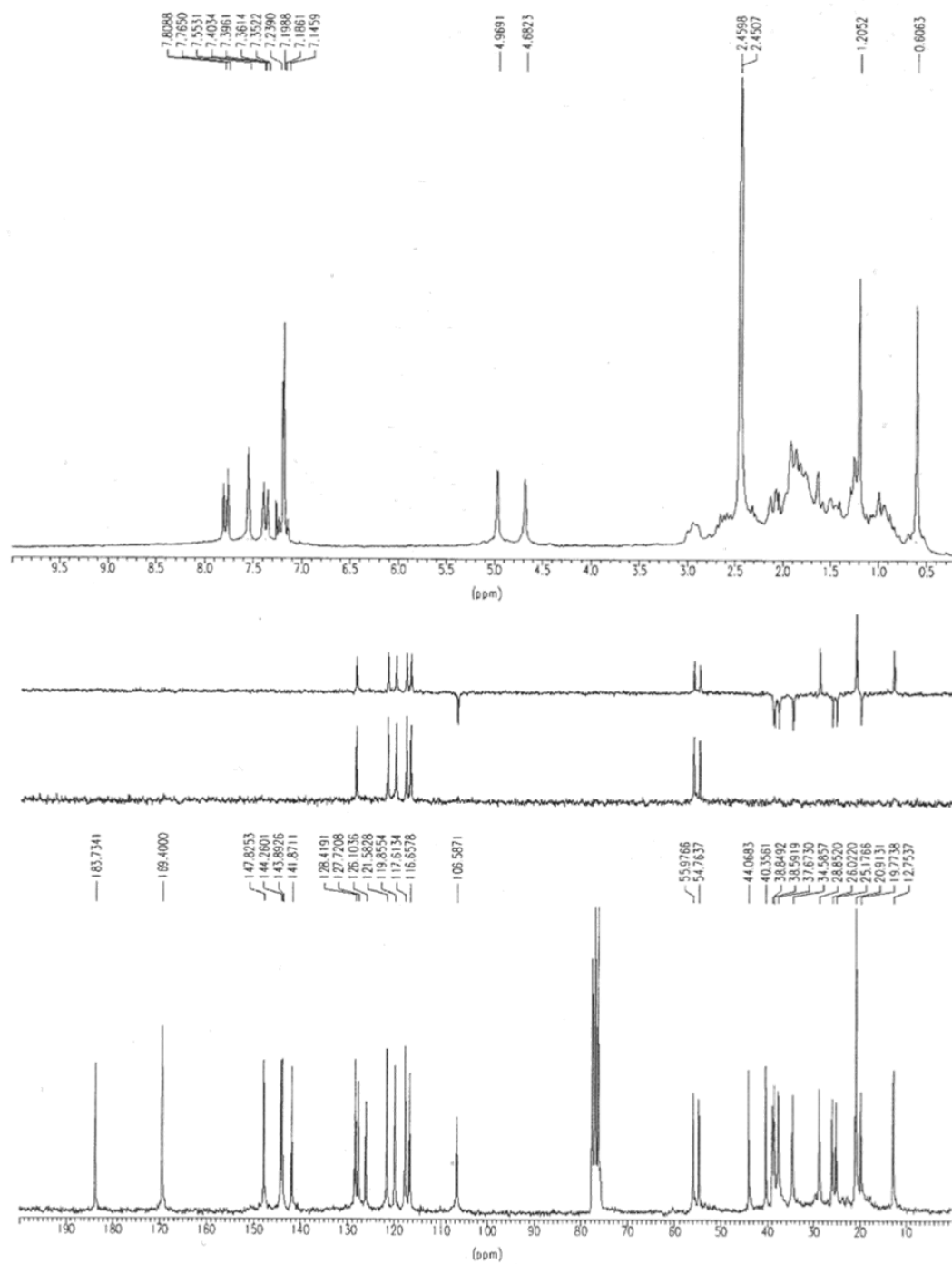


Figura V: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) y ^{13}C (50,3 MHz) del compuesto 8.

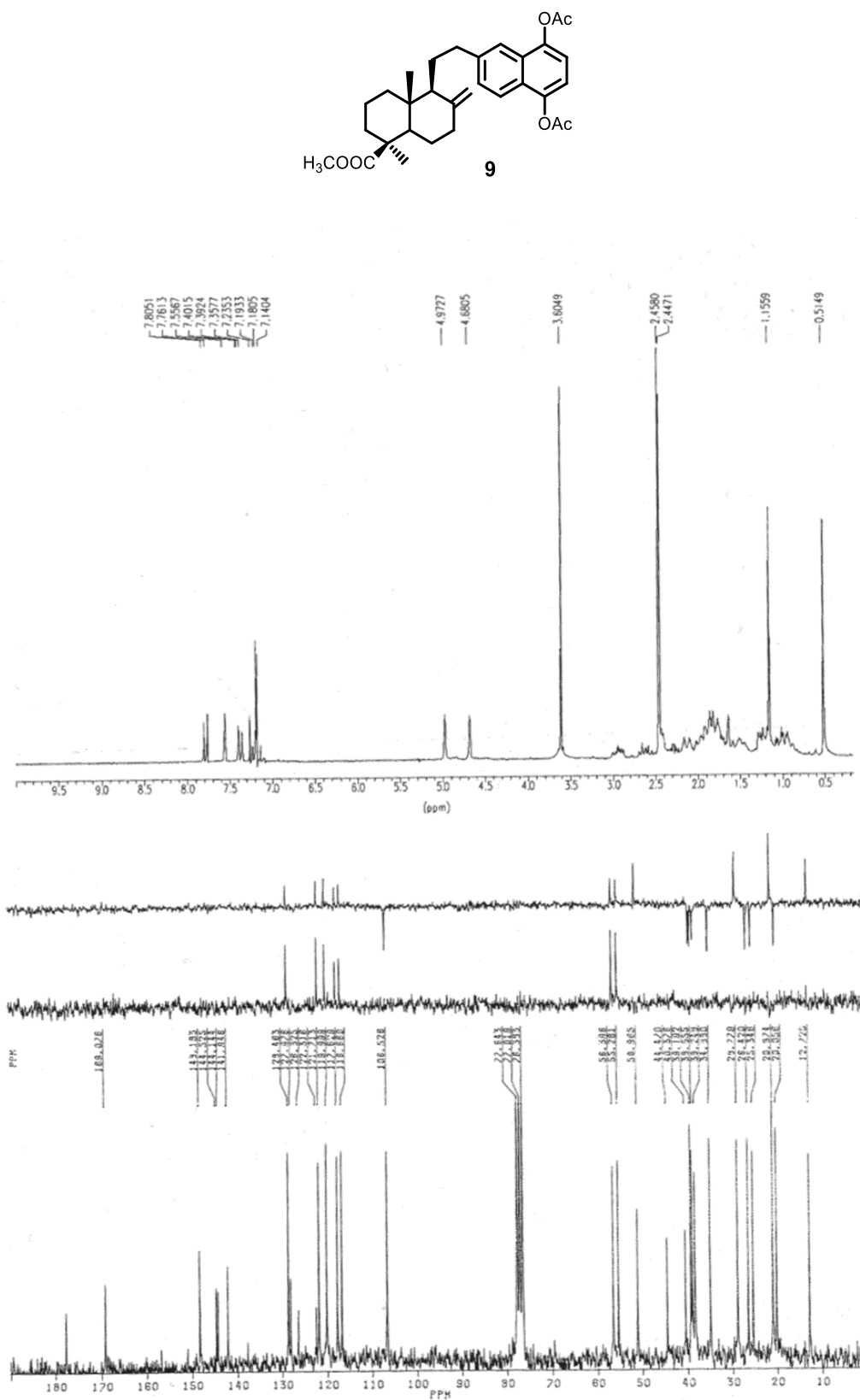


Figura VI: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz) y ^{13}C (50,3 MHz) del compuesto **9**.

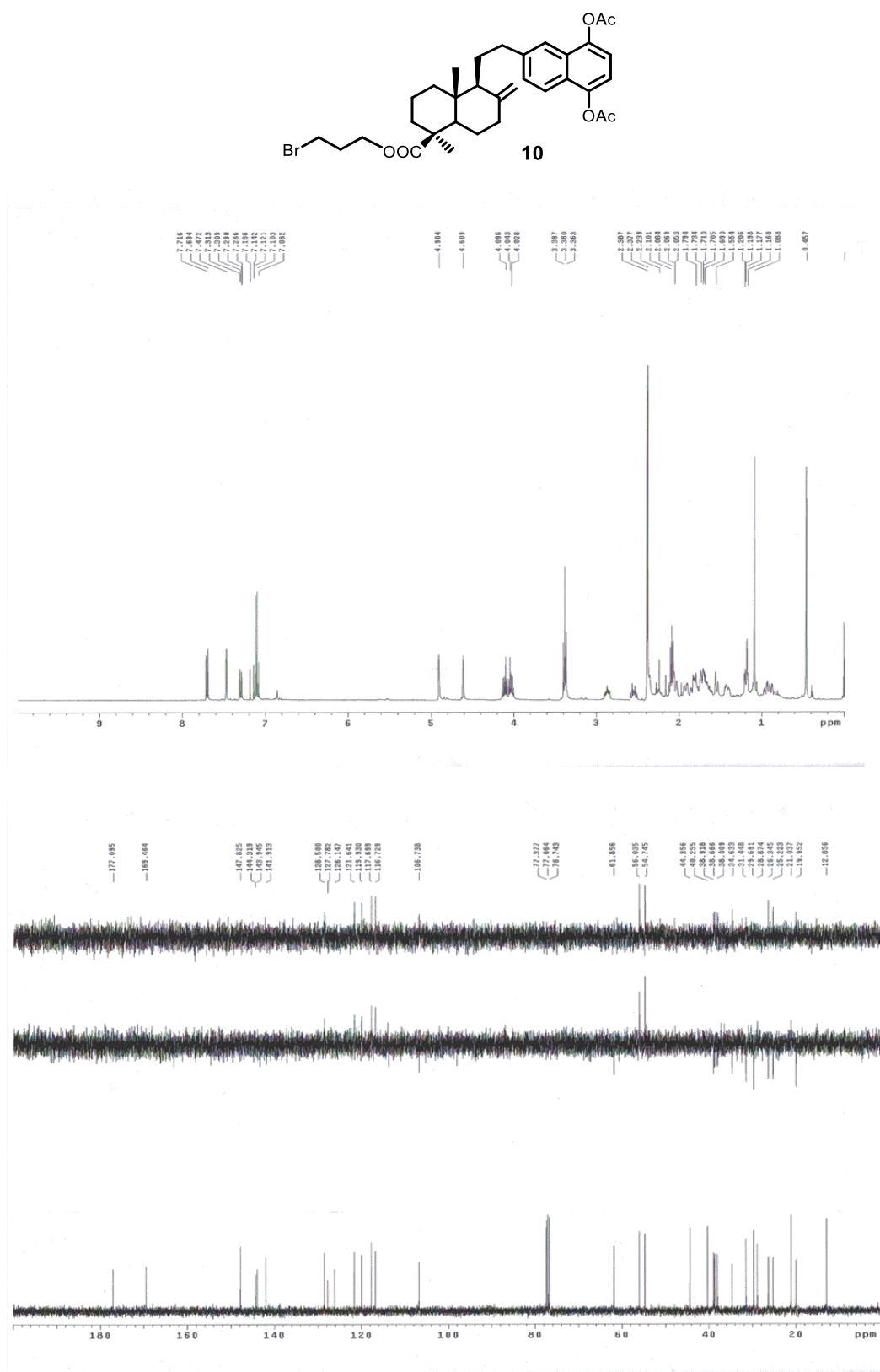


Figura VII: Espectro de RMN de ^1H y ^{13}C del compuesto 10

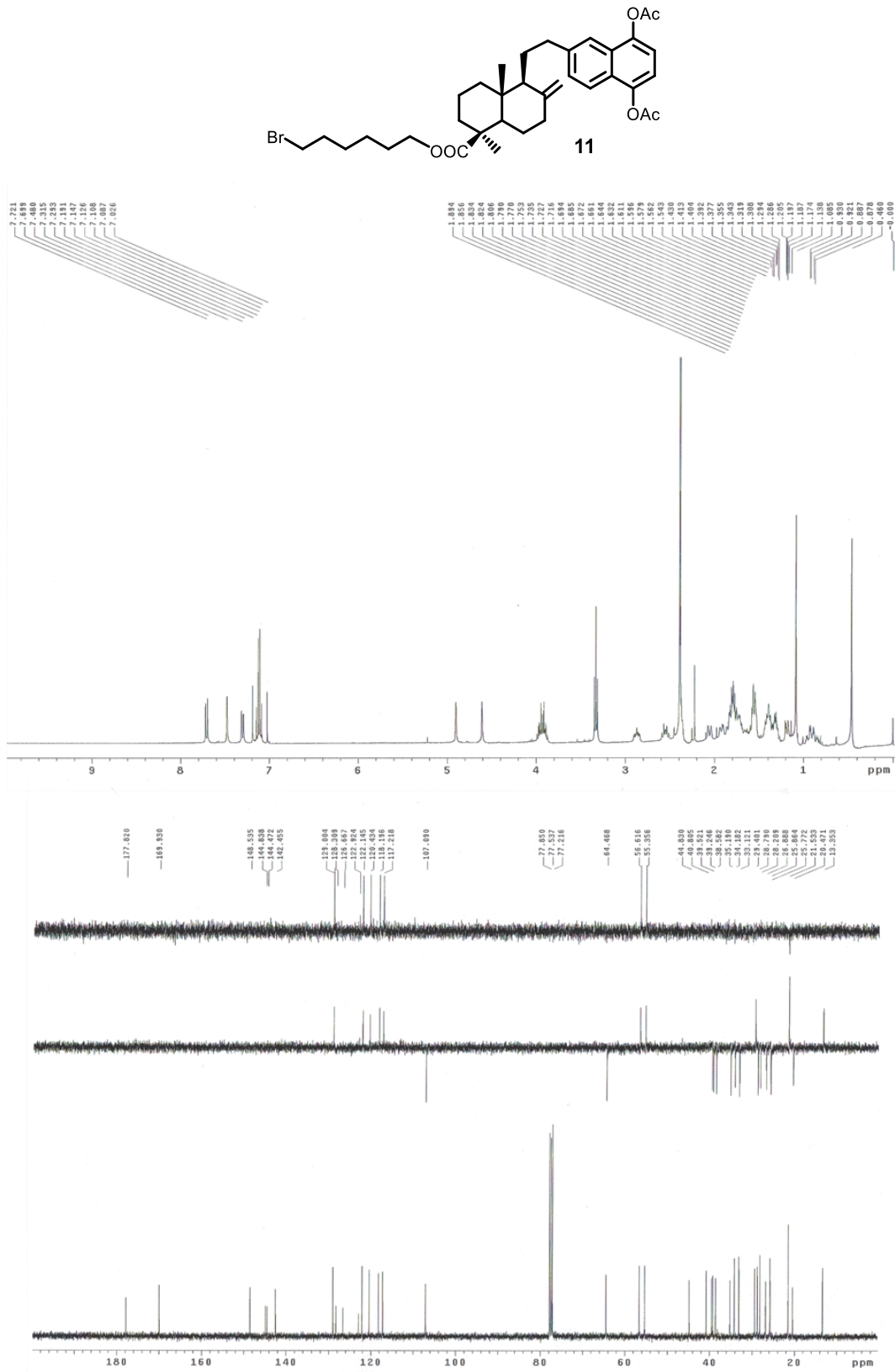


Figura VIII: Espectro de RMN de ^1H y ^{13}C del compuesto **11**

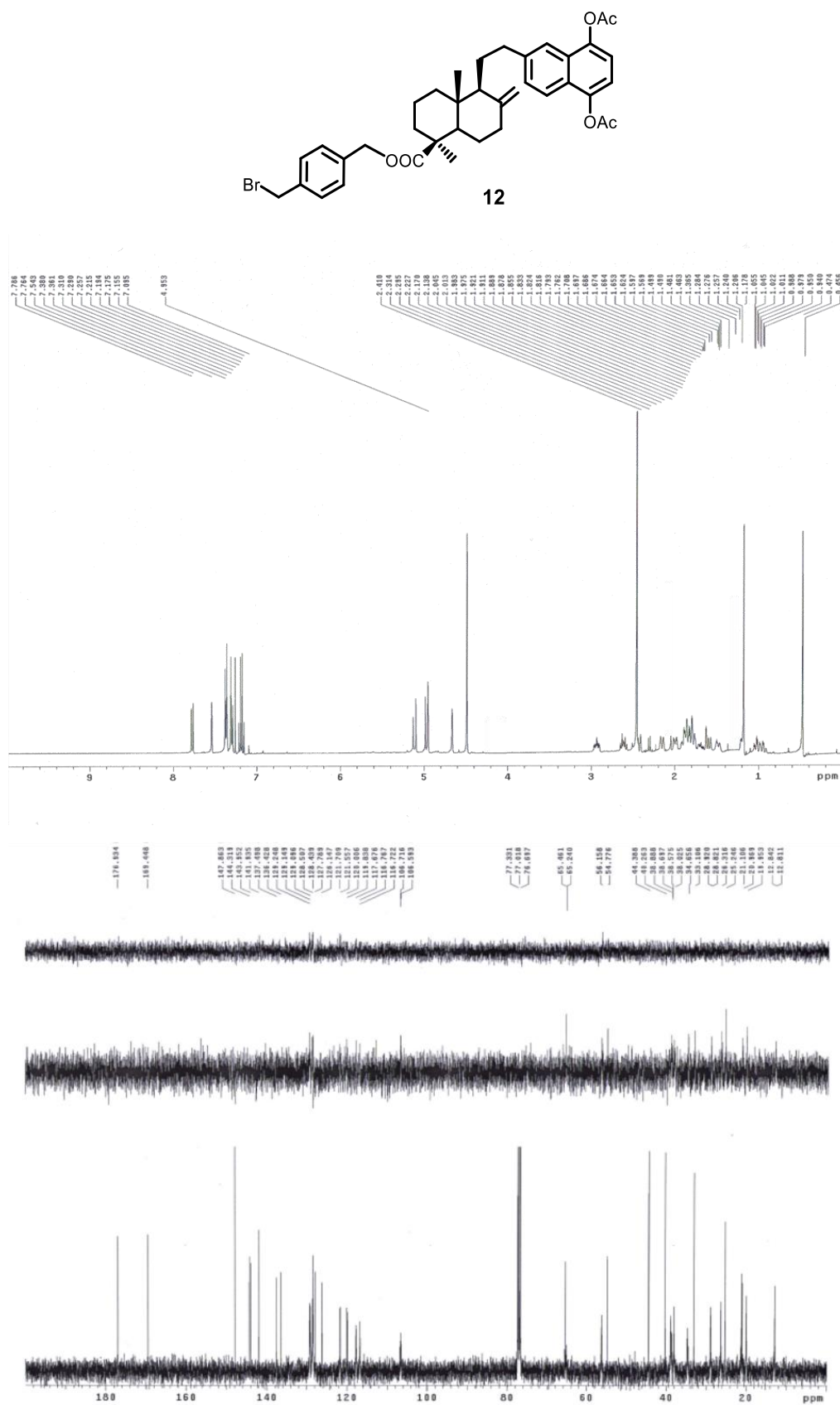


Figura IX: Espectro de RMN de ¹H y ¹³C del compuesto 12

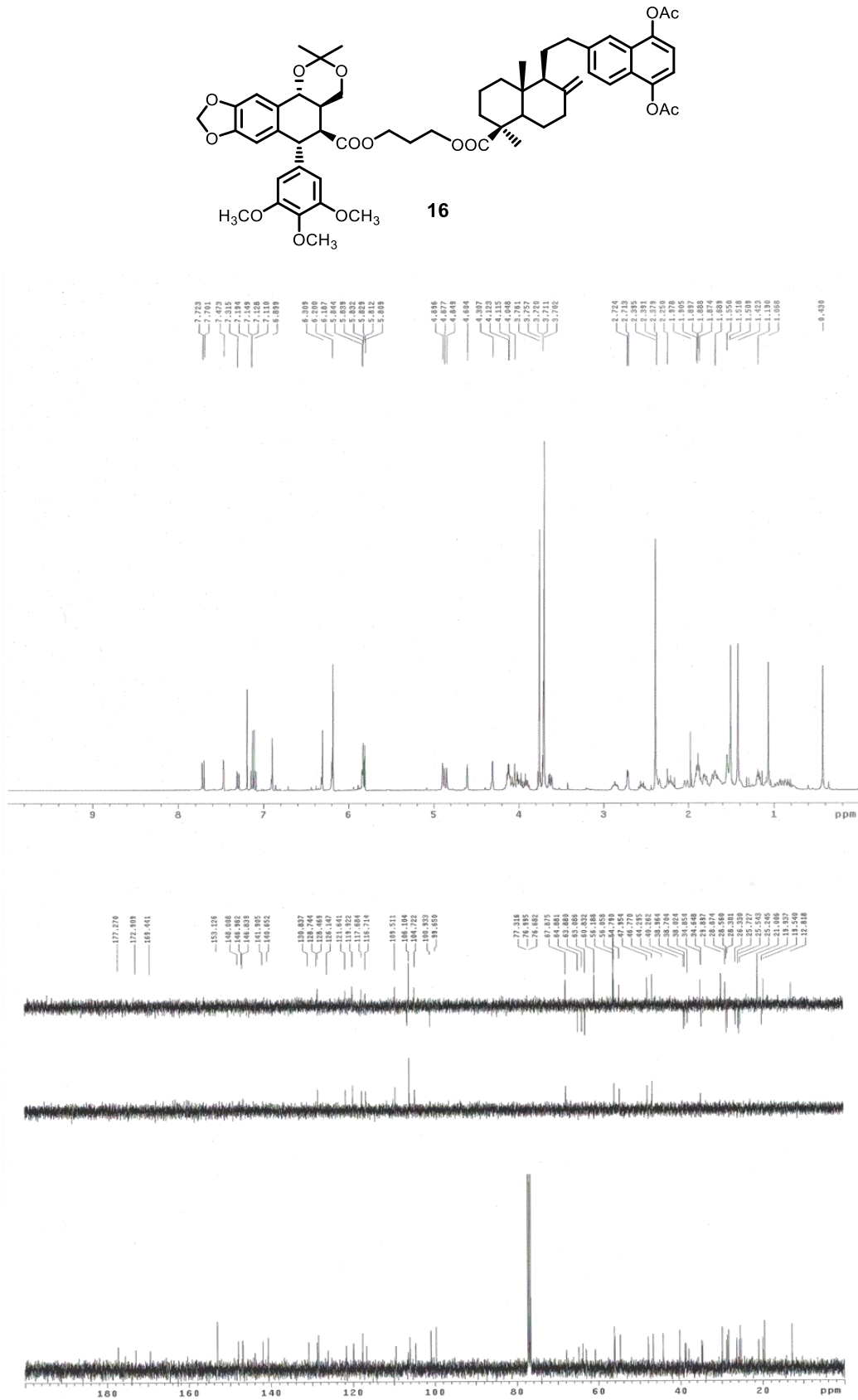


Figura X: Espectro de RMN de ^1H y ^{13}C del compuesto 16

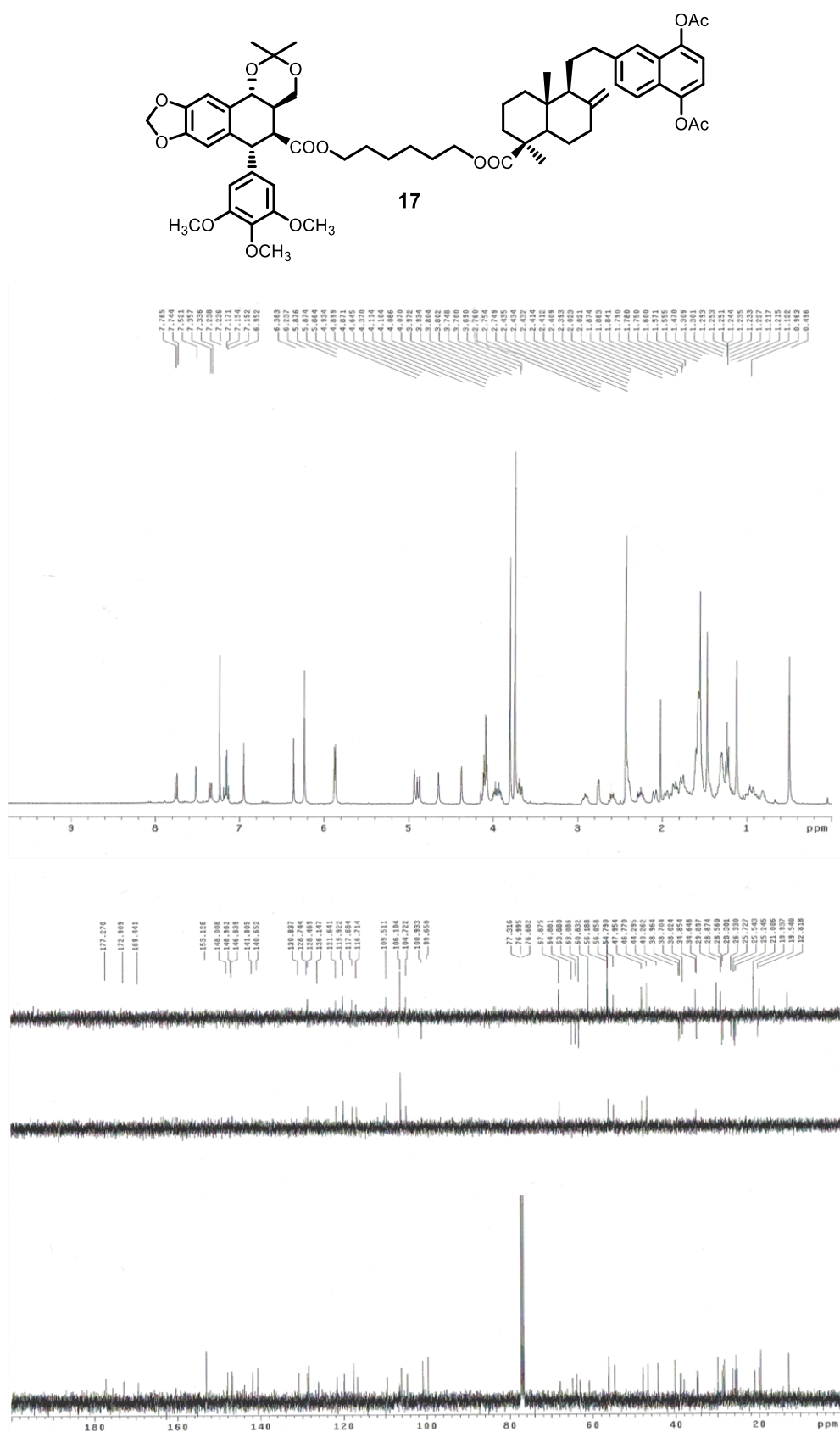


Figura XI: Espectro de RMN de ^1H y ^{13}C del compuesto **17**

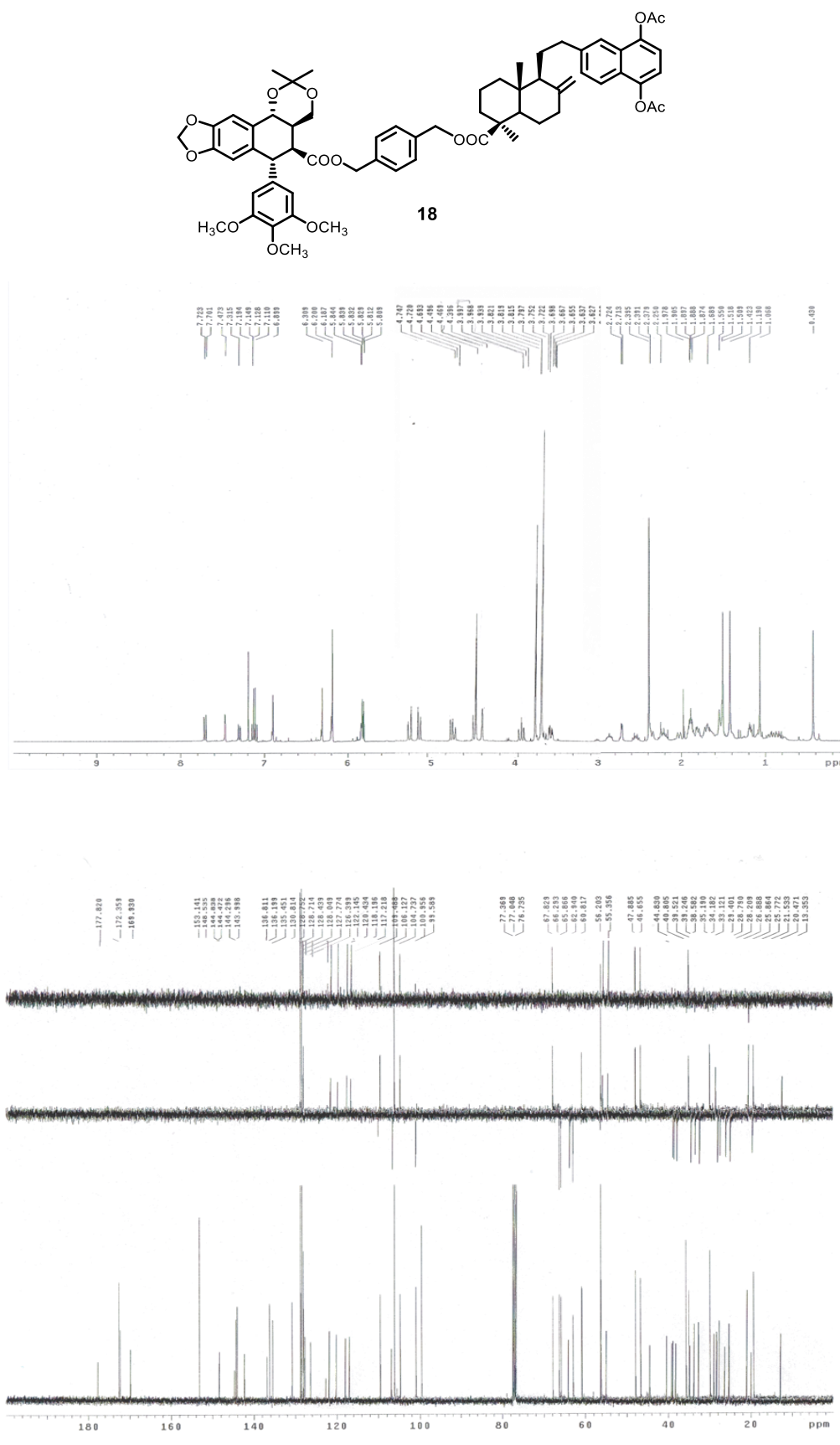


Figura XII: Espectro de RMN de ^1H y ^{13}C del compuesto **18**

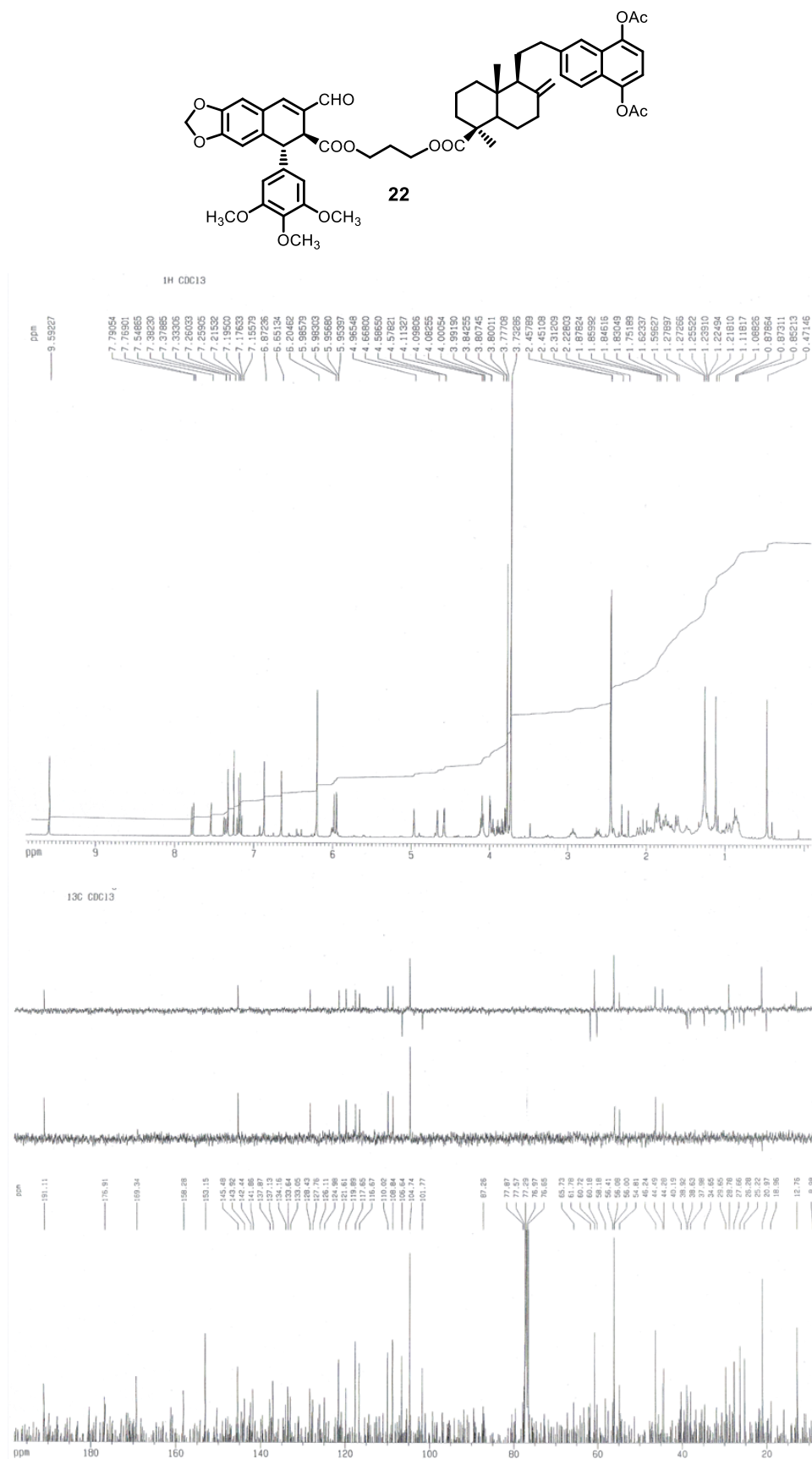


Figura XIII: Espectro de RMN de ¹H y ¹³C del compuesto 22

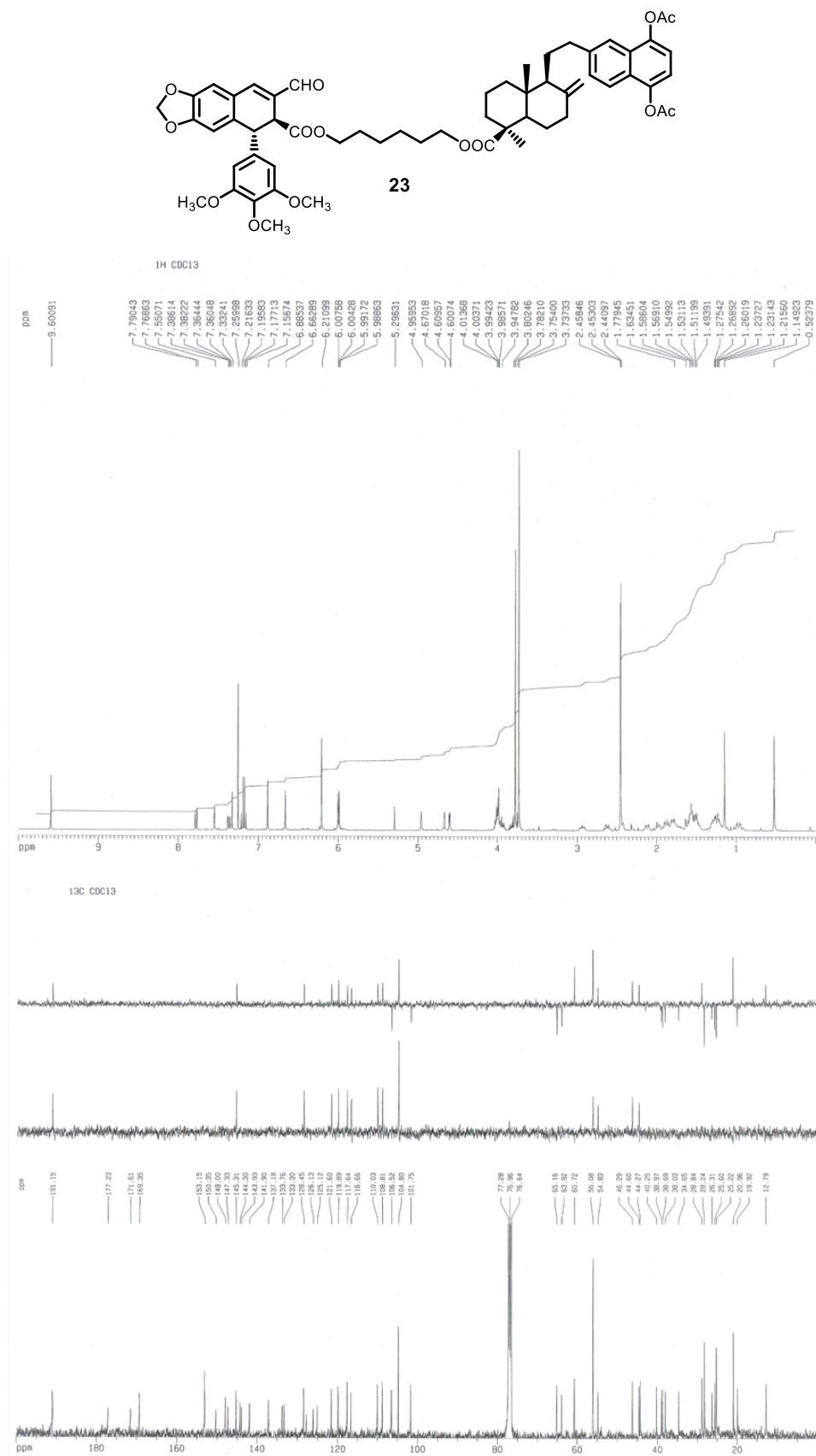


Figura XIV: Espectro de RMN de ^1H y ^{13}C del compuesto **23**

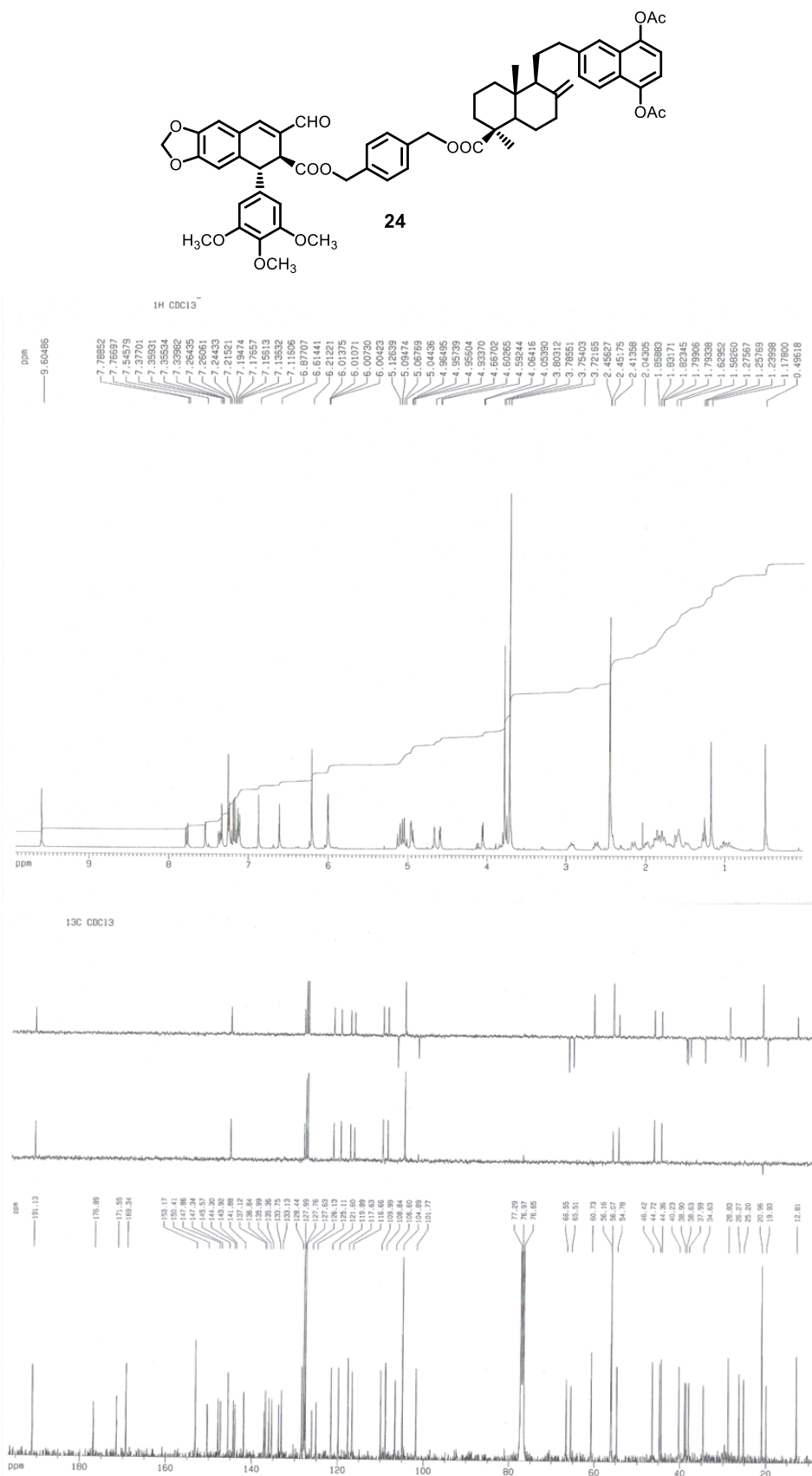
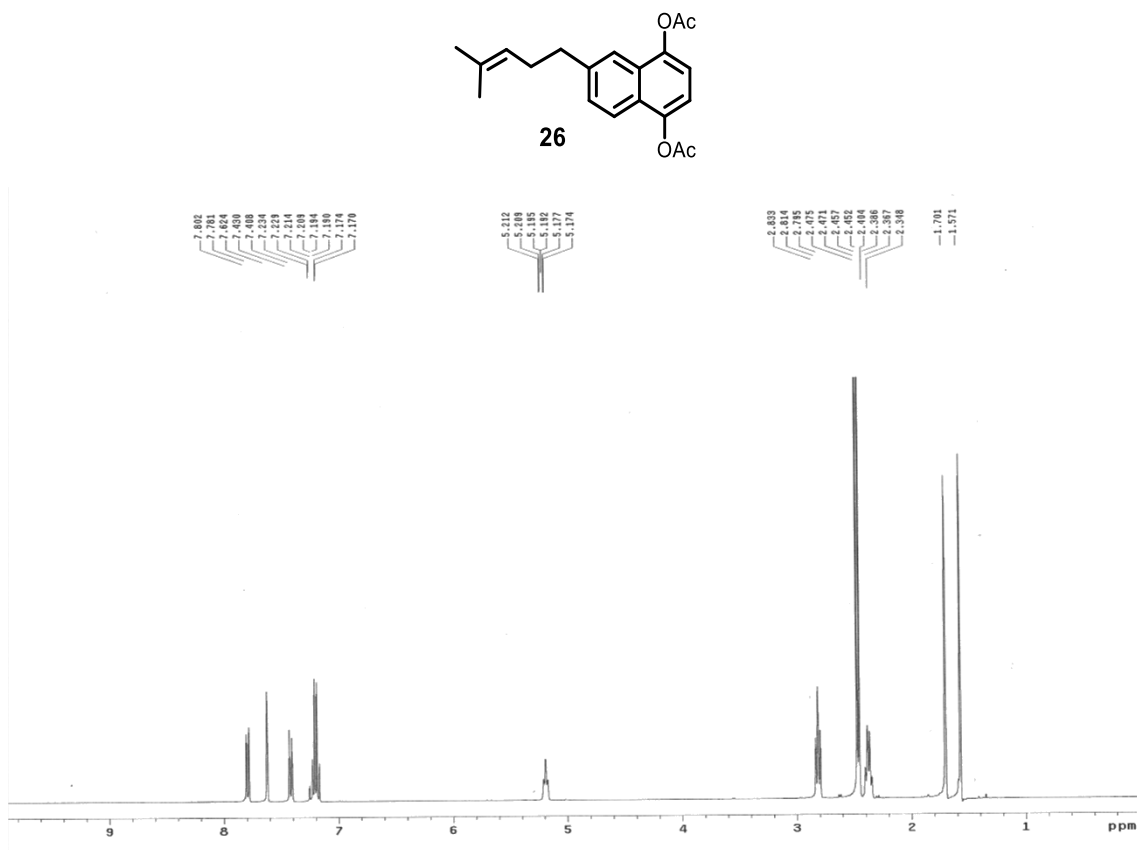
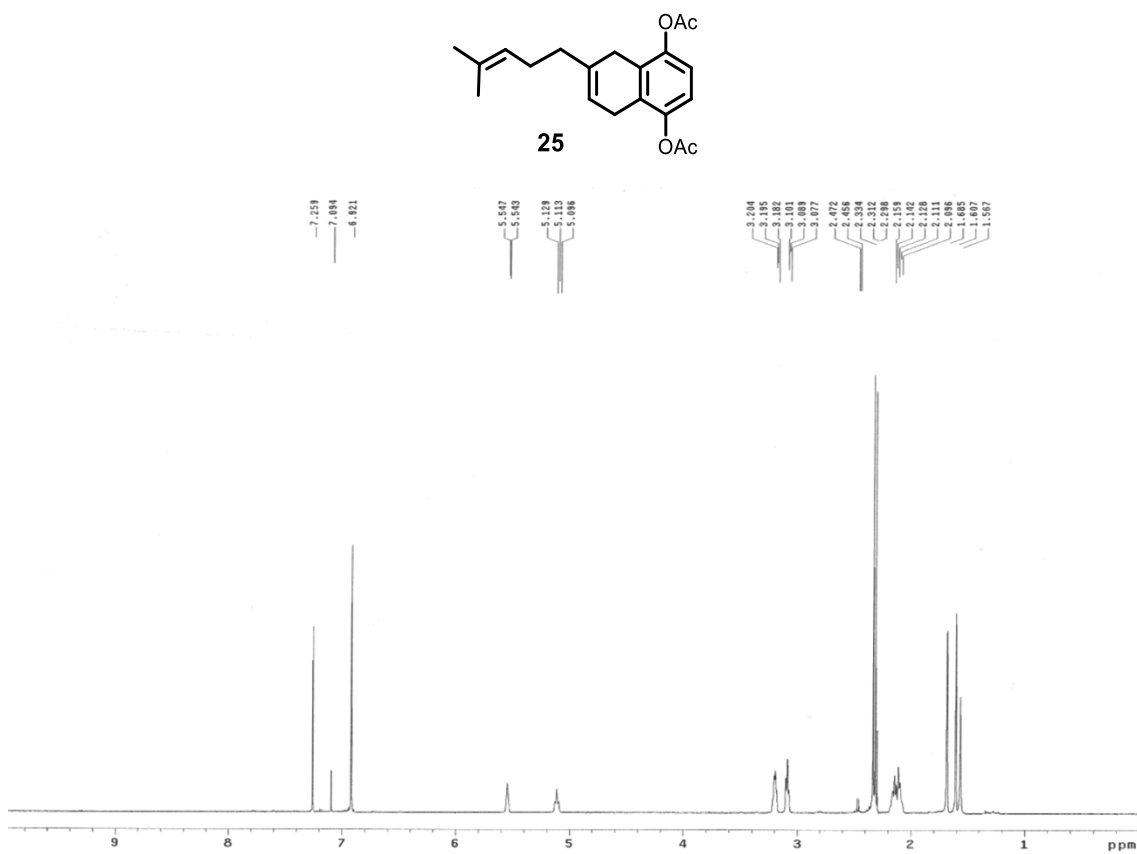
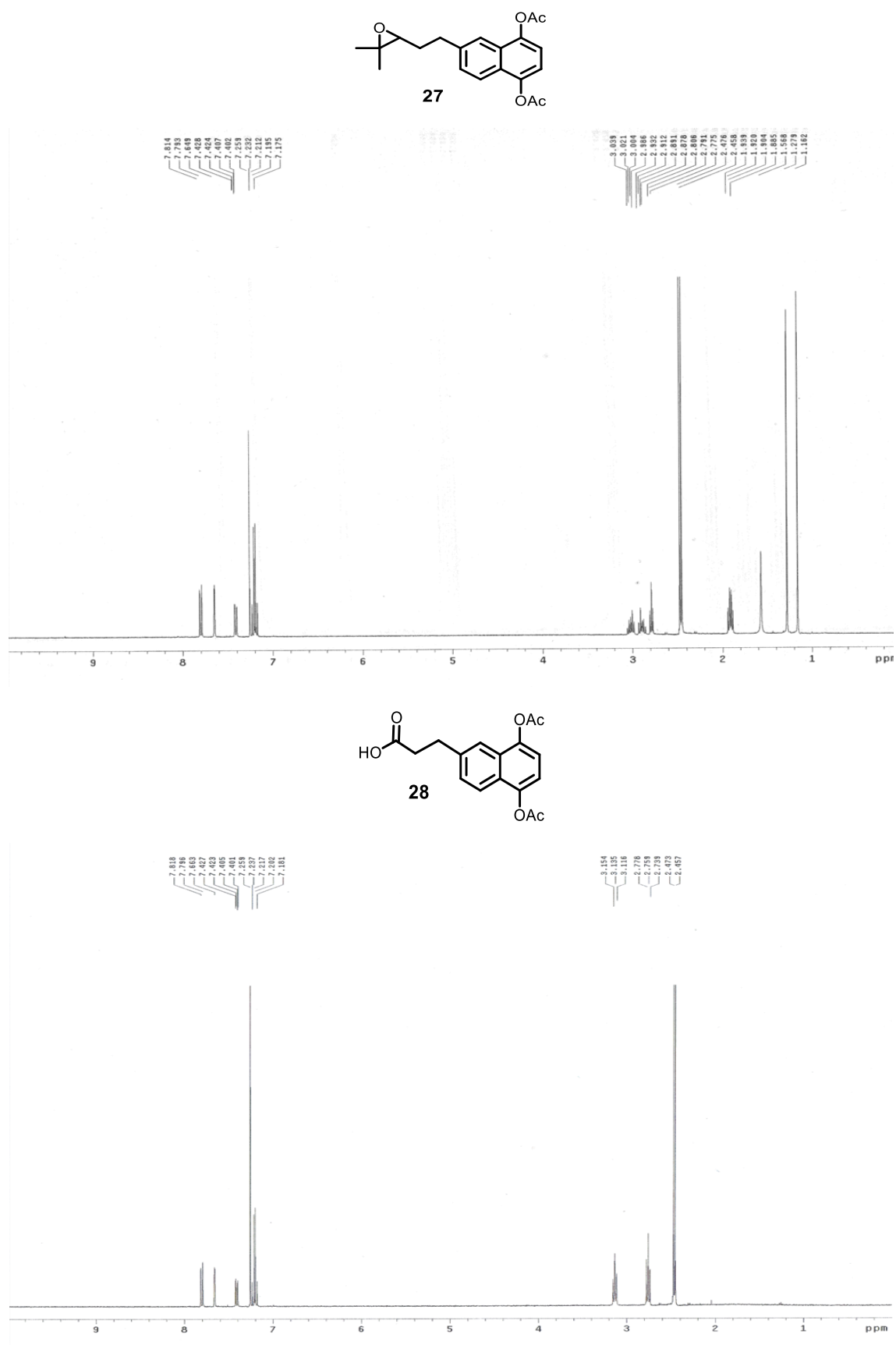


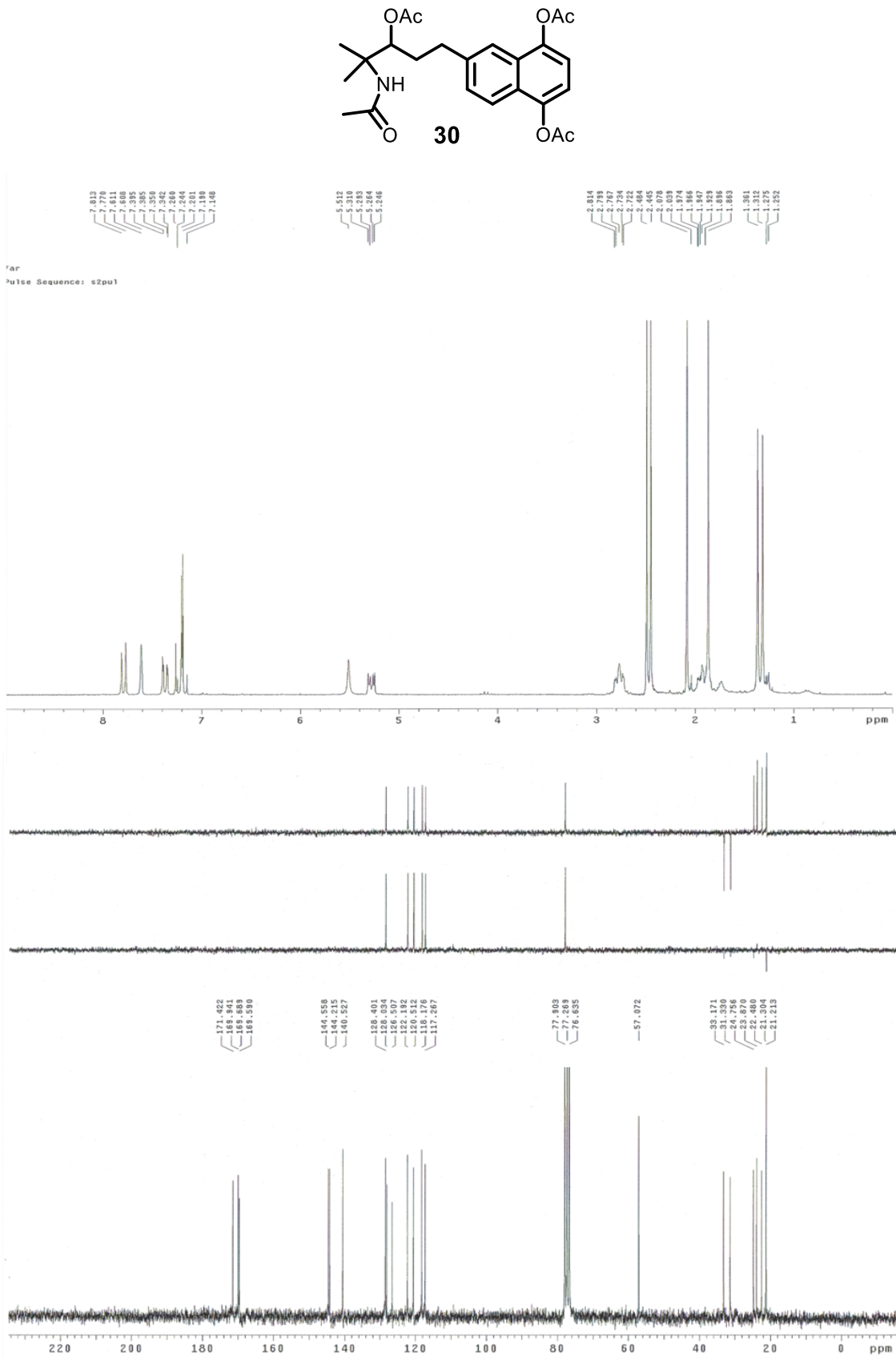
Figura XV: Espectro de RMN de ¹H y ¹³C del compuesto 24



Figuraa XVI y XVII: Espectros de RMN de ^1H de los compuestos **25** y **26**.



Figuraa XVIII y XIX: Espectros de RMN de ^1H de los compuestos **27** y **28**.

Figura XX: Espectro de RMN de ^1H y ^{13}C del compuesto **30**

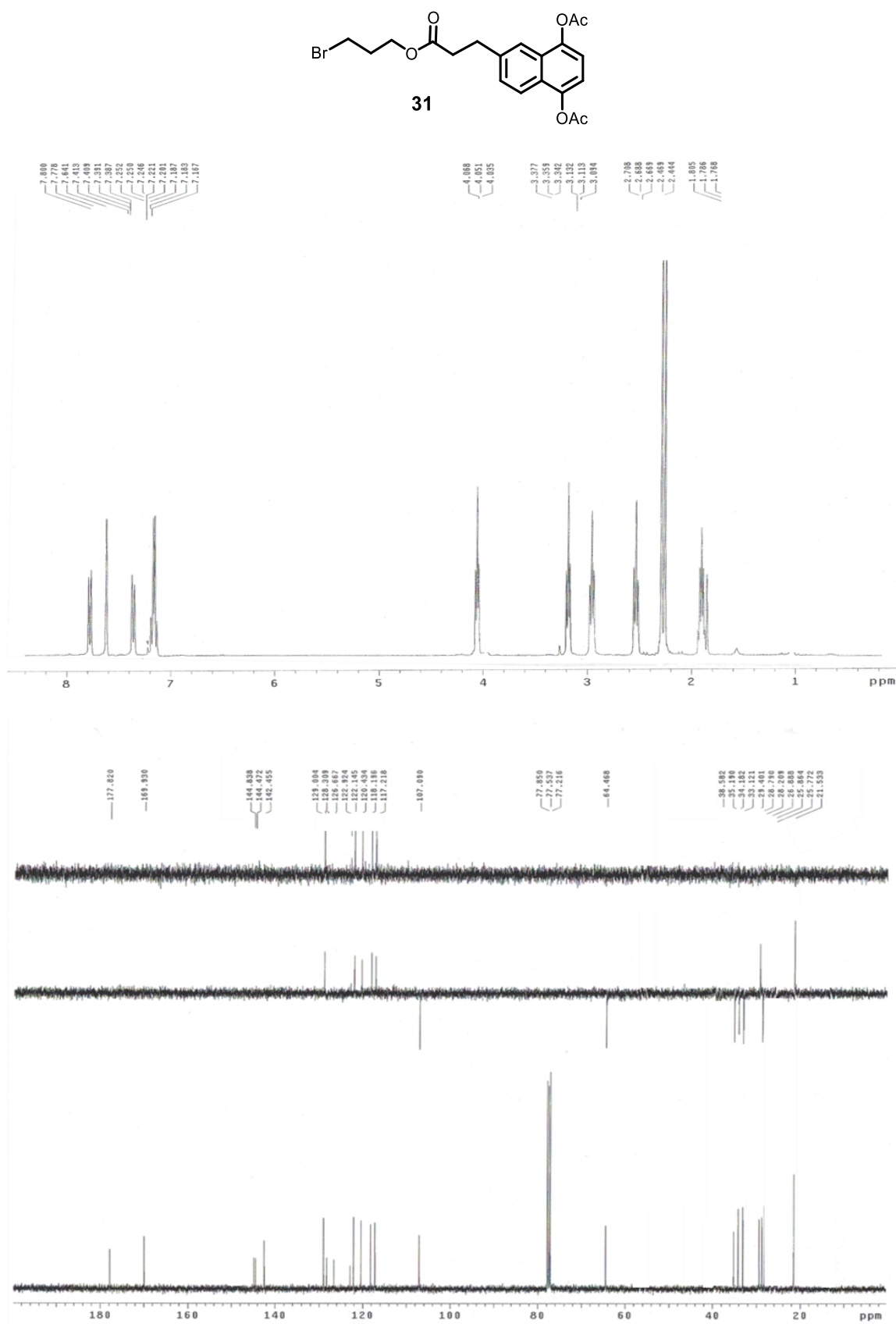


Figura XXI: Espectro de RMN de ^1H y ^{13}C del compuesto 31.

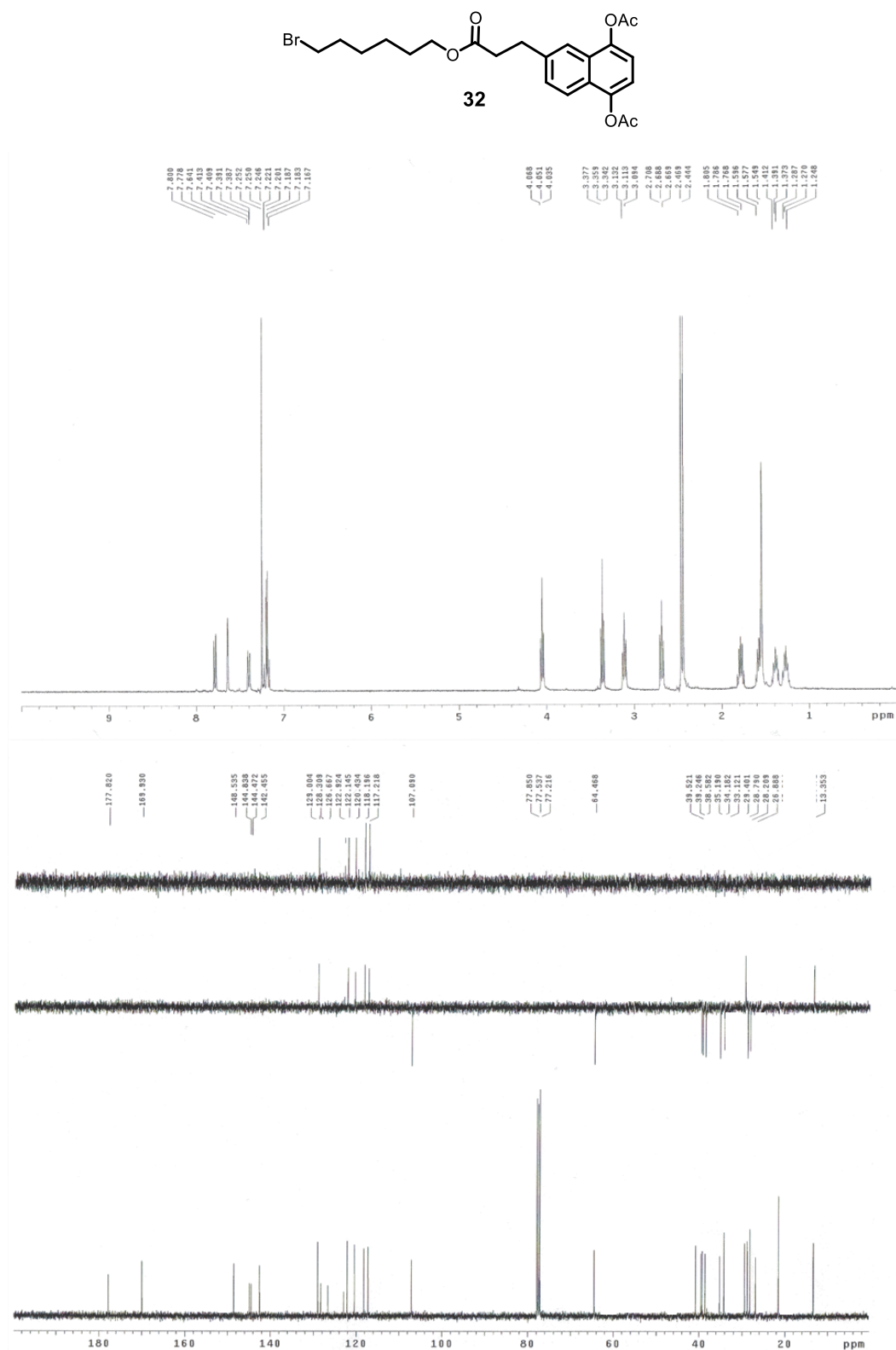


Figura XXII: Espectro de RMN de ^1H y ^{13}C del compuesto **32**.

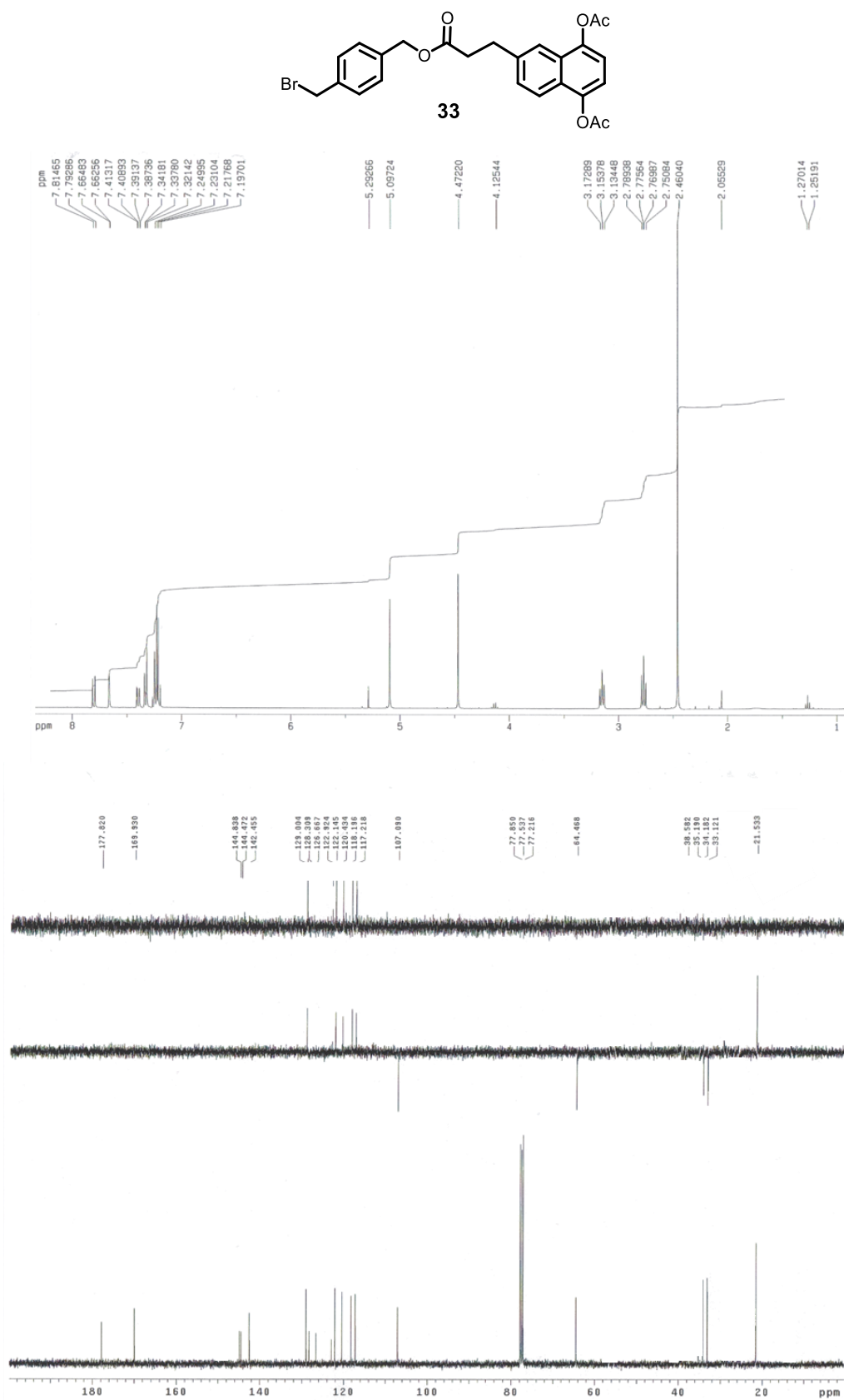


Figura XXIII: Espectro de RMN de ^1H y ^{13}C del compuesto **33**.

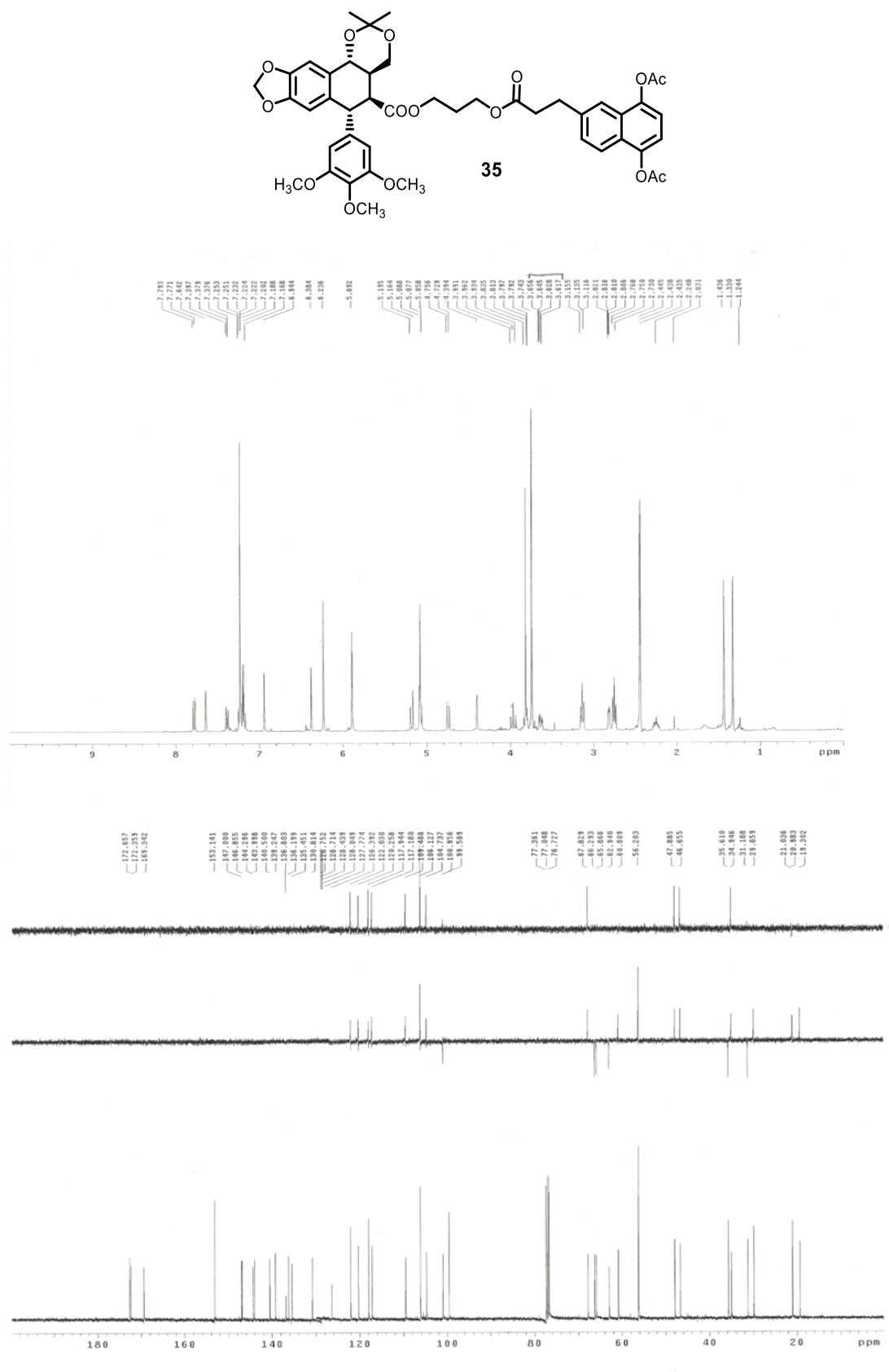


Figura XXIV: Espectro de RMN de ^1H y ^{13}C del compuesto **35**.

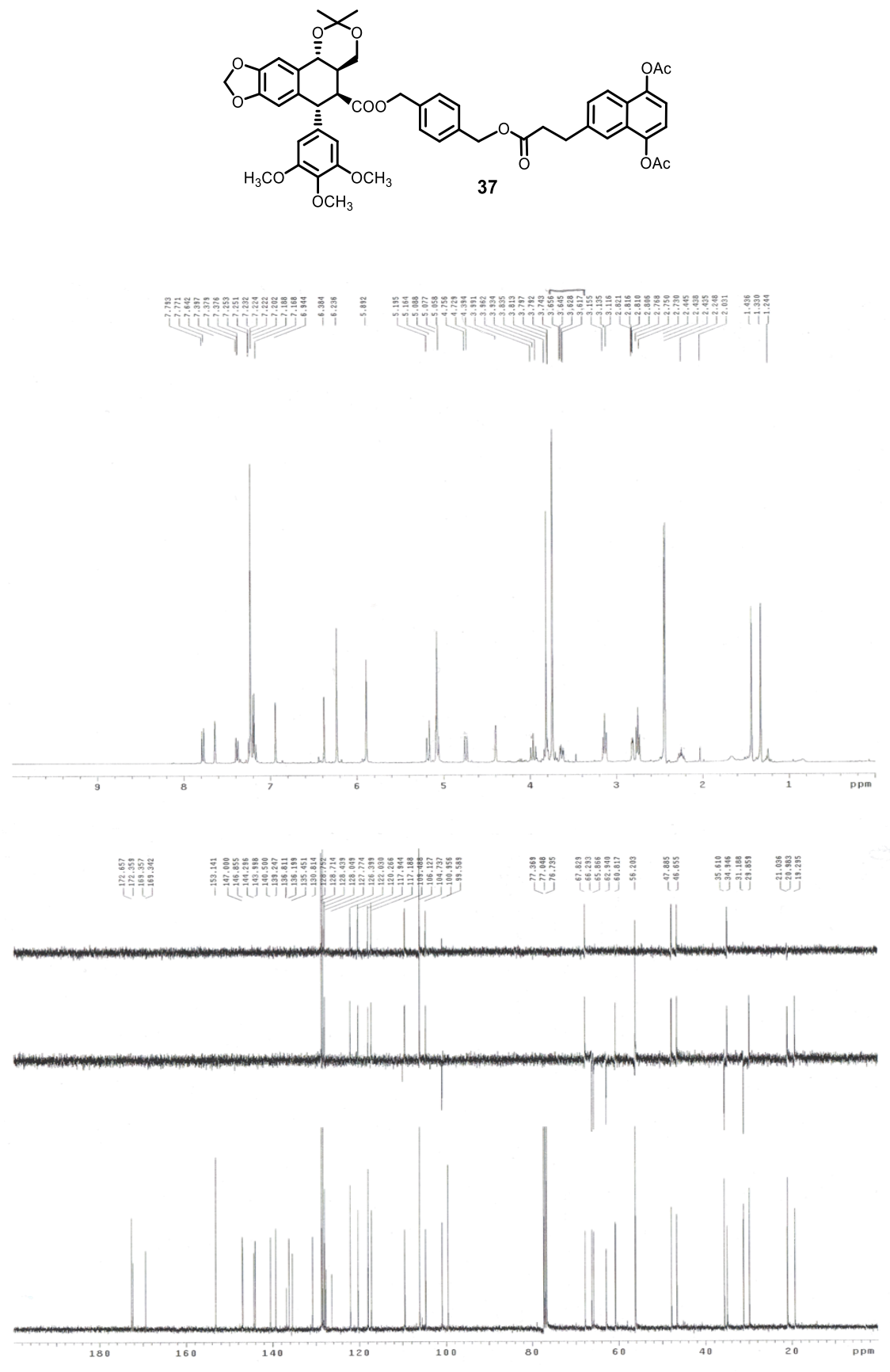


Figura XXVI: Espectro de RMN de ^1H y ^{13}C del compuesto **37**.

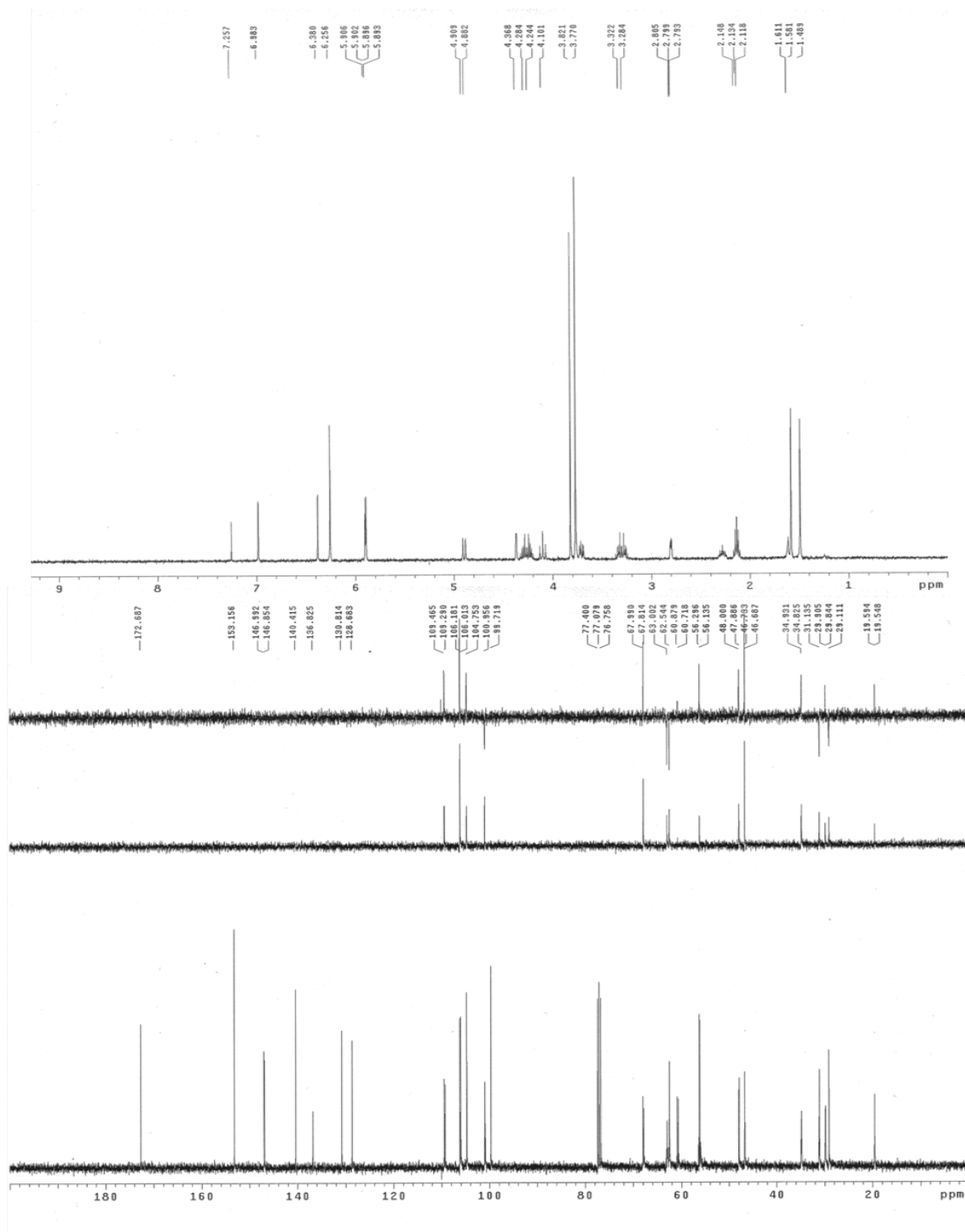
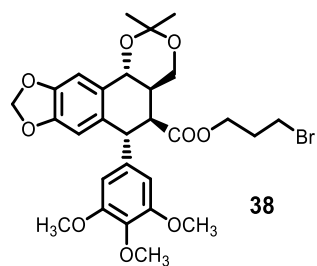


Figura XXVII: Espectro de RMN de ¹H y ¹³C del compuesto **38**.

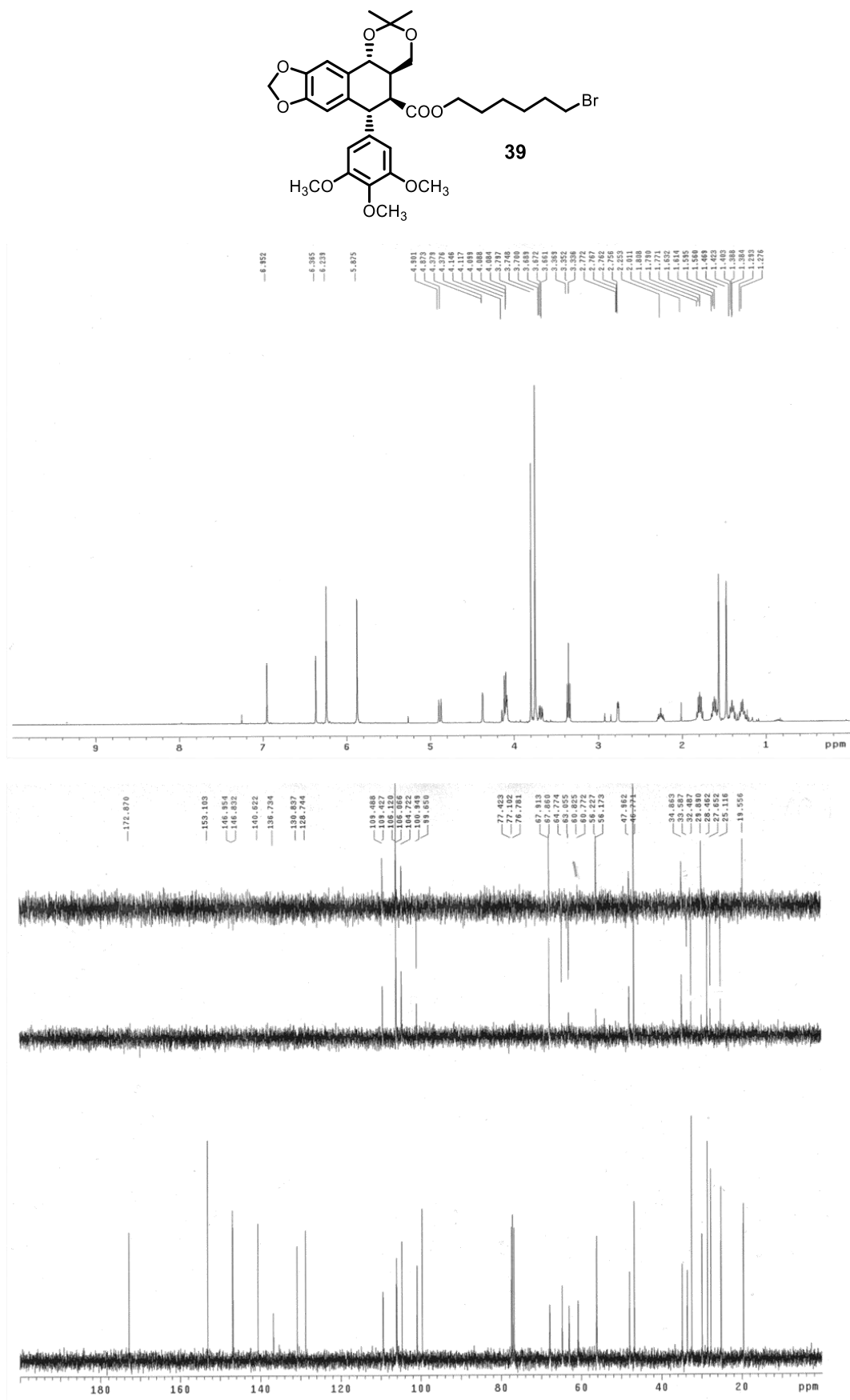


Figura XXVIII: Espectro de RMN de ^1H y ^{13}C del compuesto **39**.

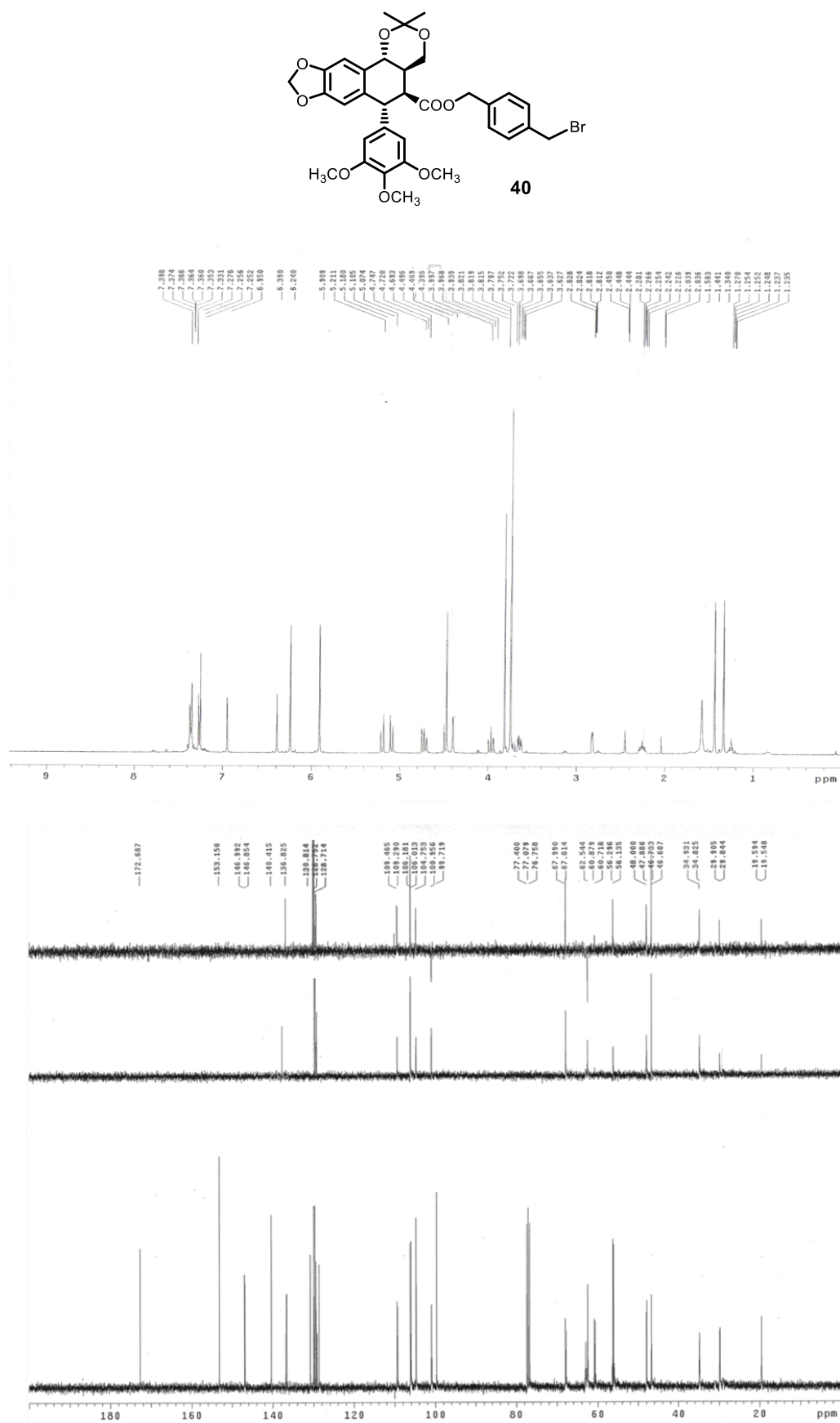


Figura XXIX: Espectro de RMN de ¹H y ¹³C del compuesto 40.

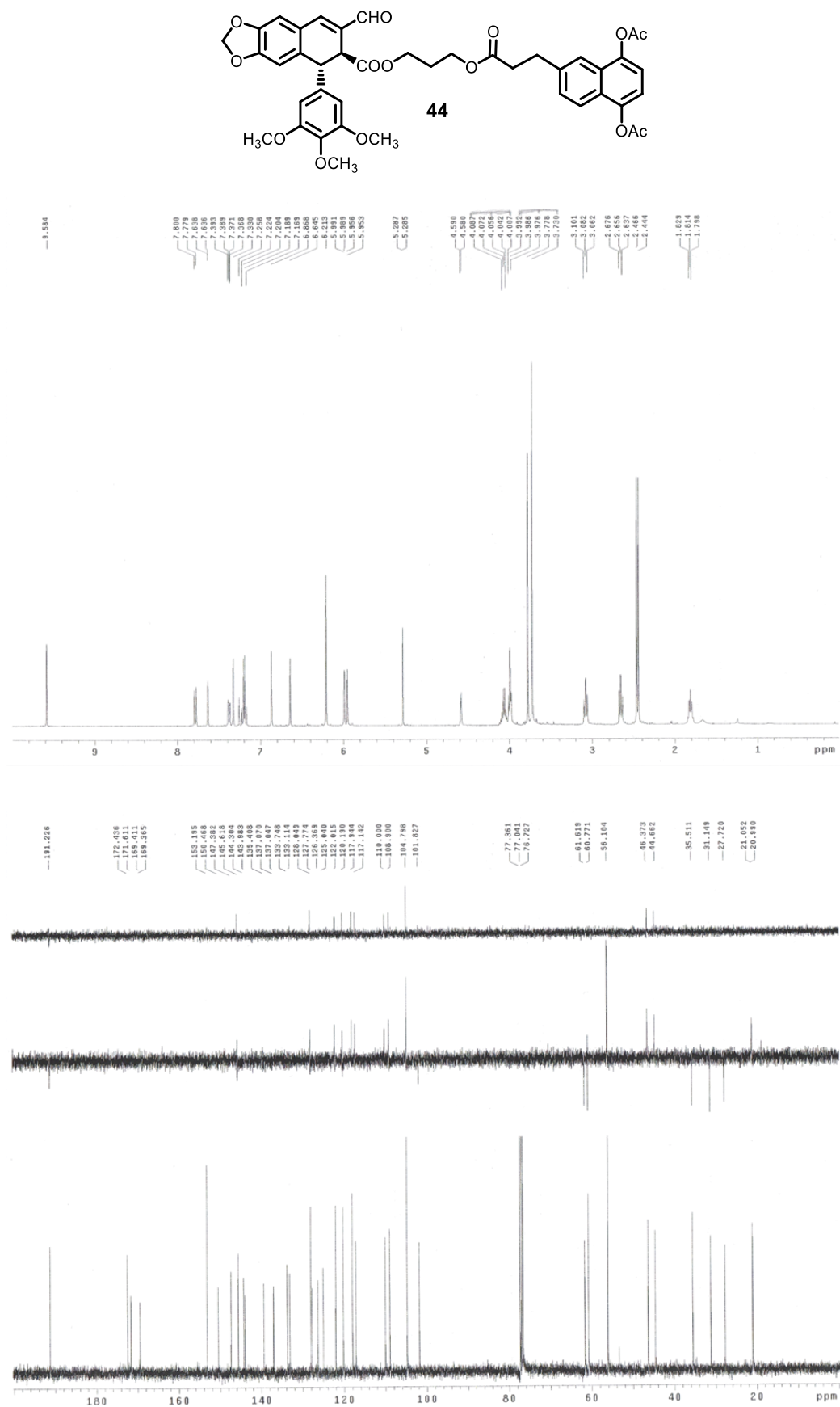


Figura XXX: Espectro de RMN de ^1H y ^{13}C del compuesto **44**.

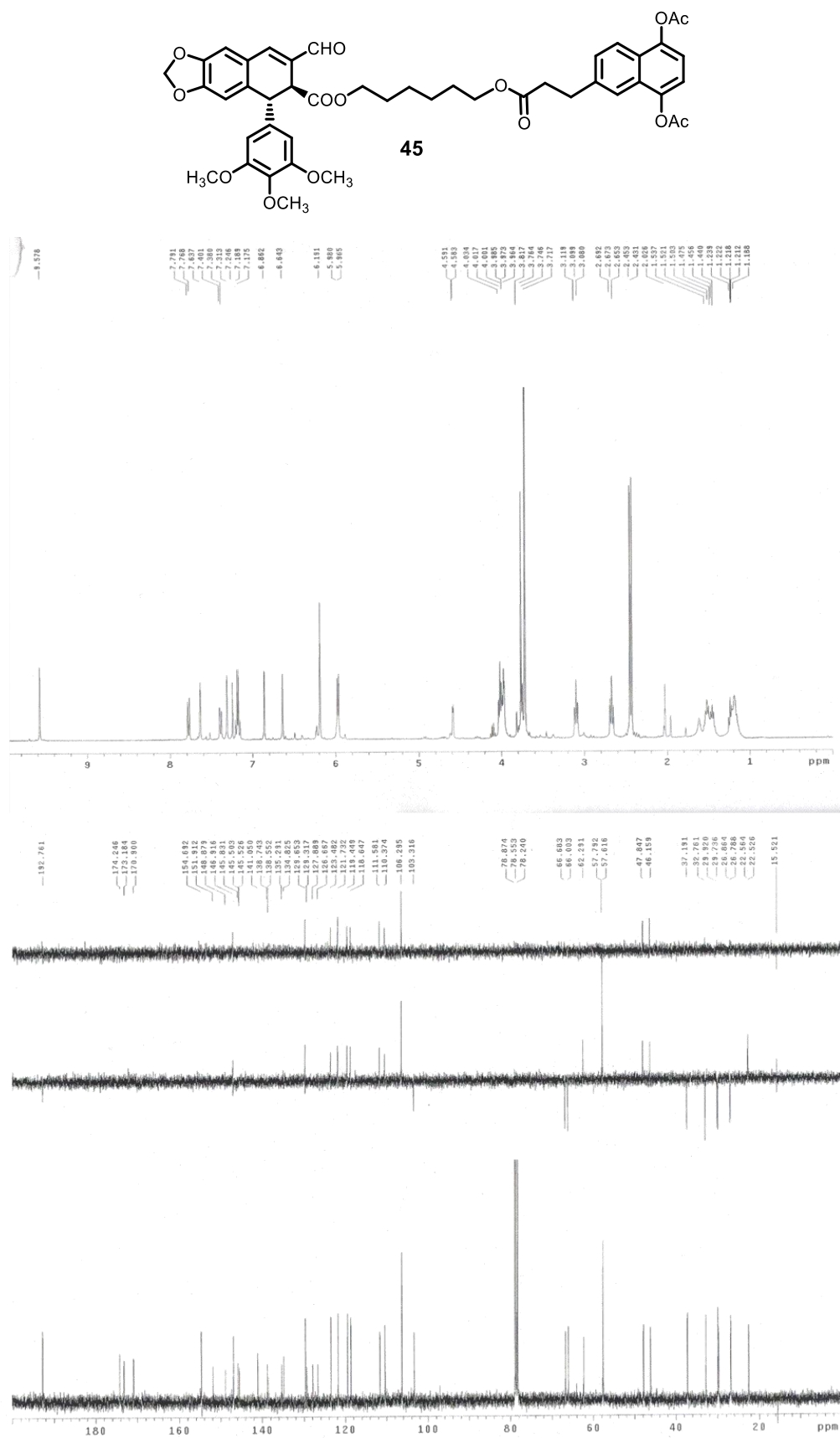


Figura XXXI: Espectro de RMN de ^1H y ^{13}C del compuesto **45**.

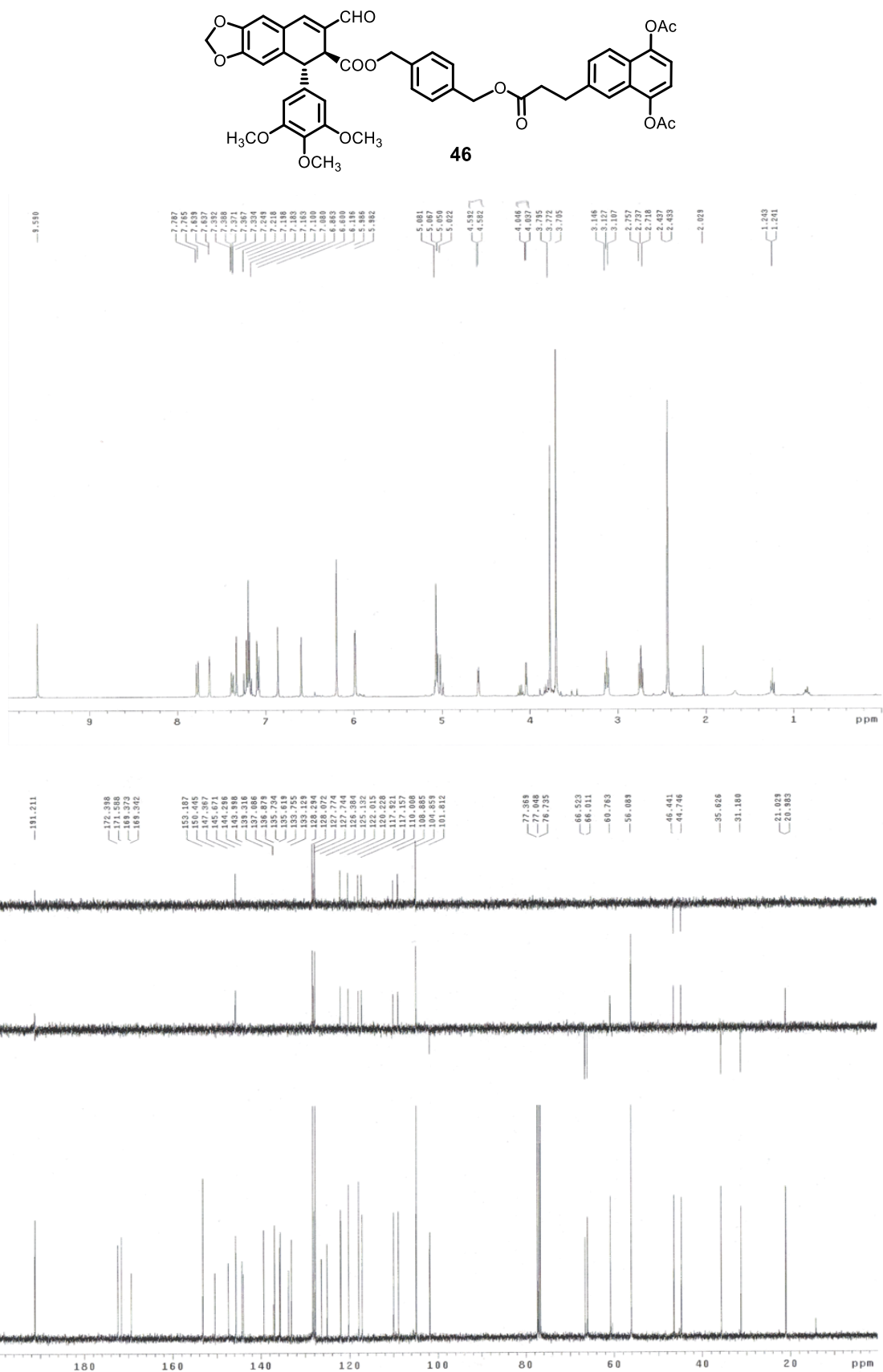
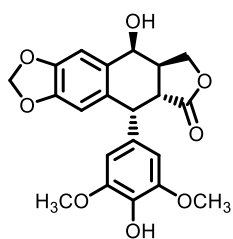


Figura XXXII: Espectro de RMN de ¹H y ¹³C del compuesto **46**.



47

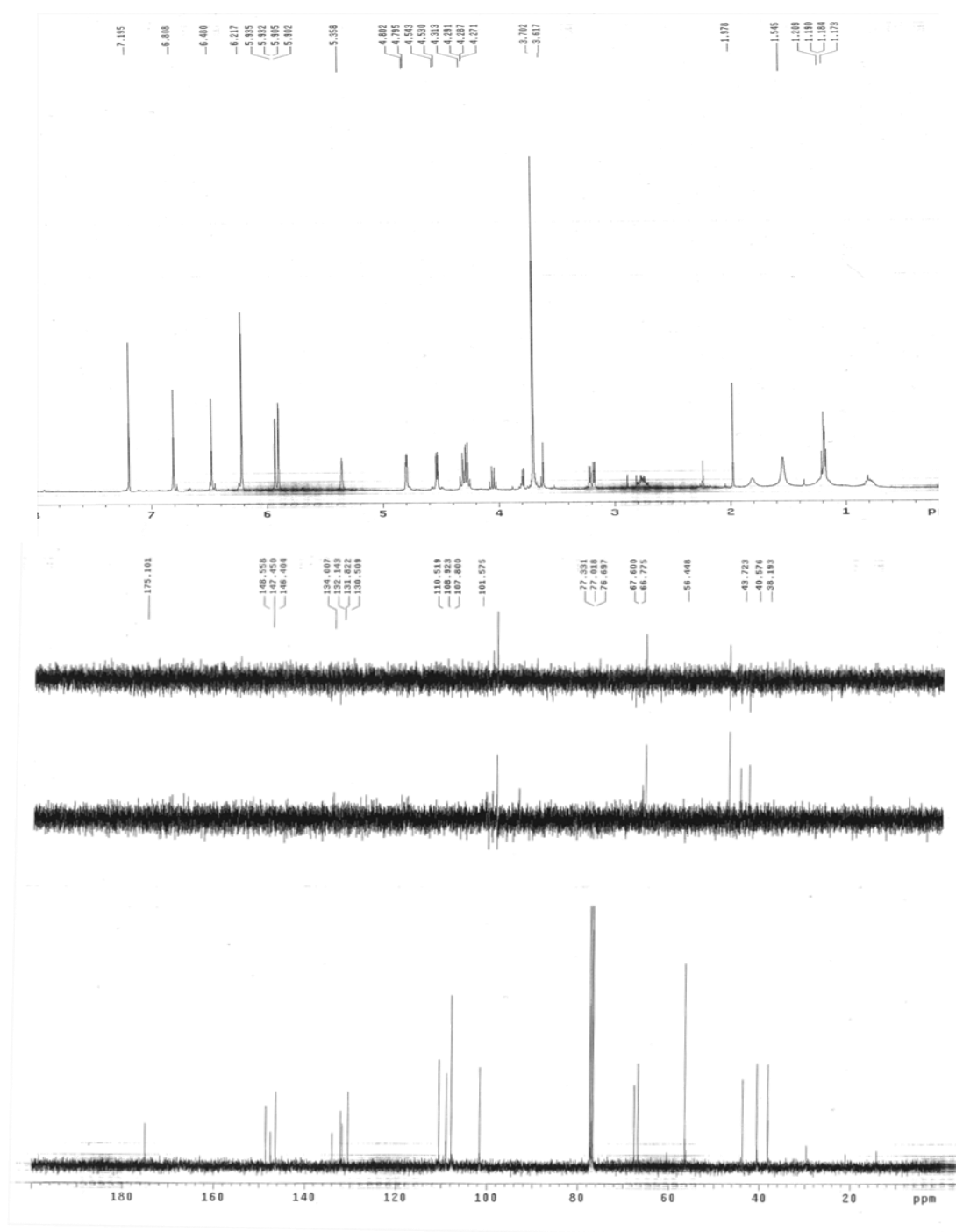
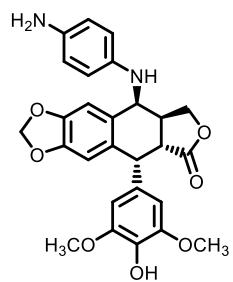
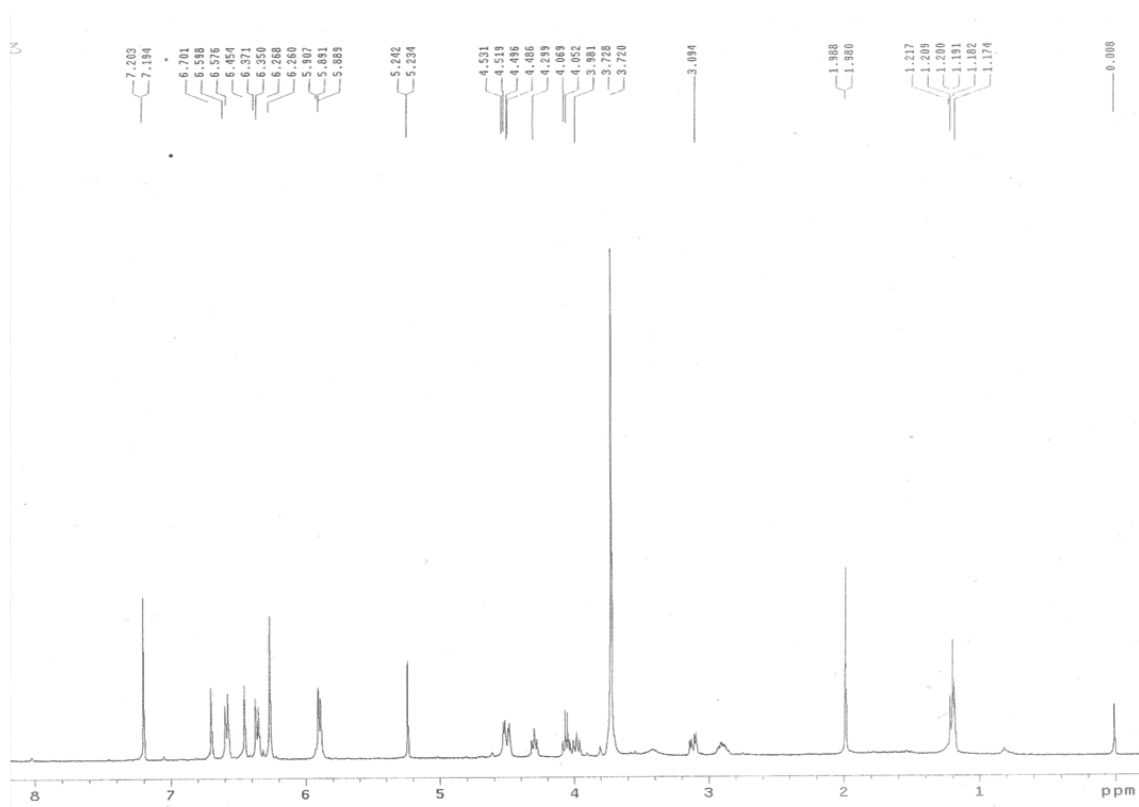
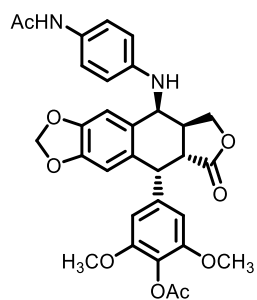


Figura XXXIII: Espectro de RMN de ^1H y ^{13}C del compuesto 47.



51

**Figura XXXIV:** Espectro de RMN de ¹H del compuesto **51**.



52

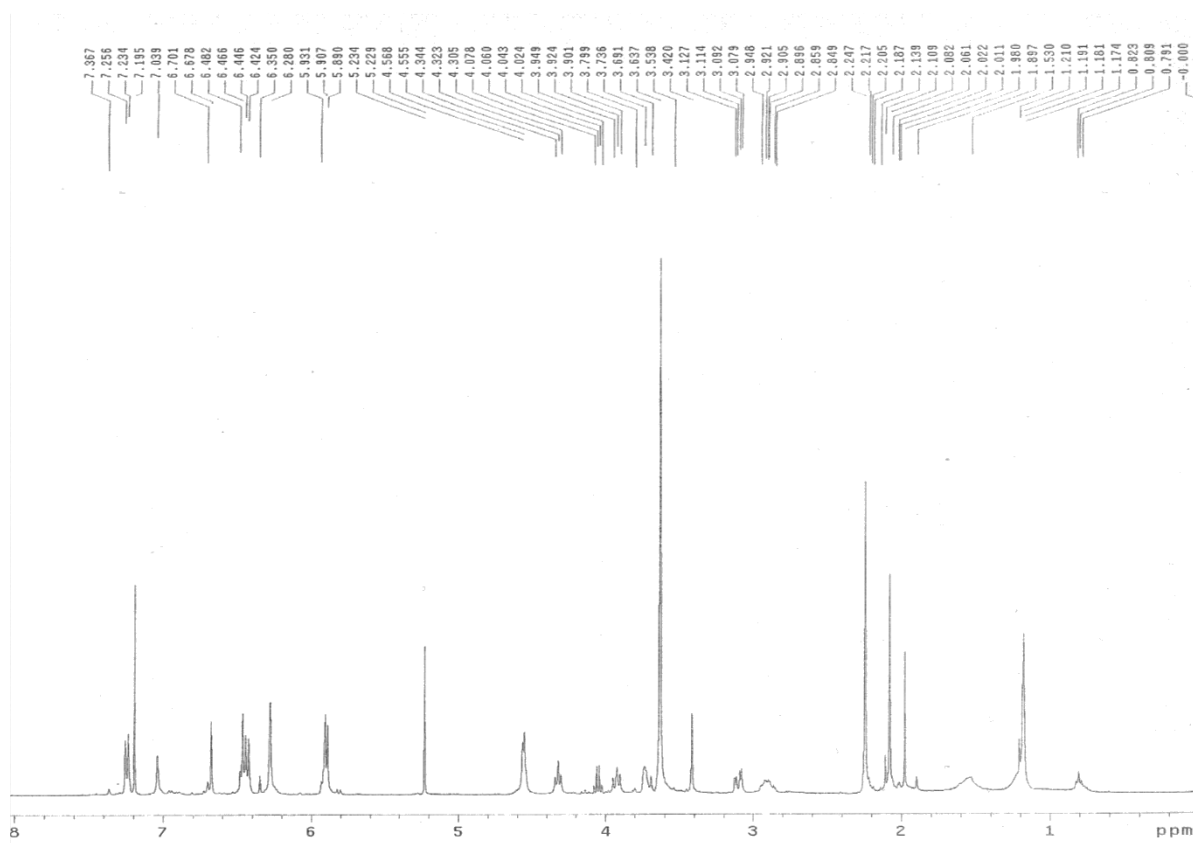
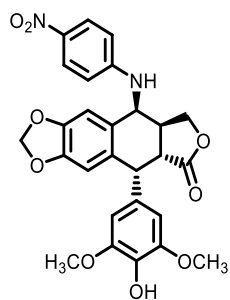
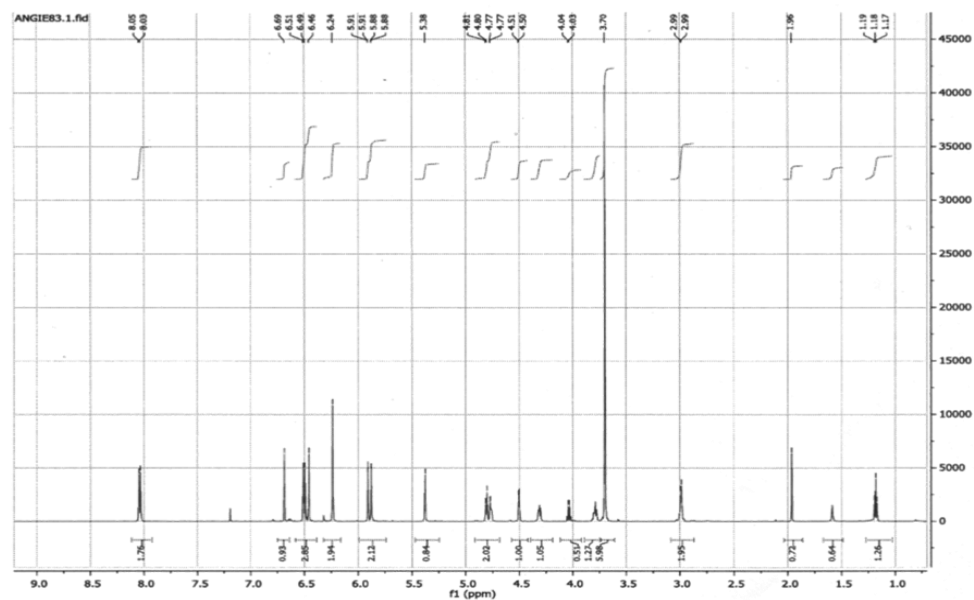


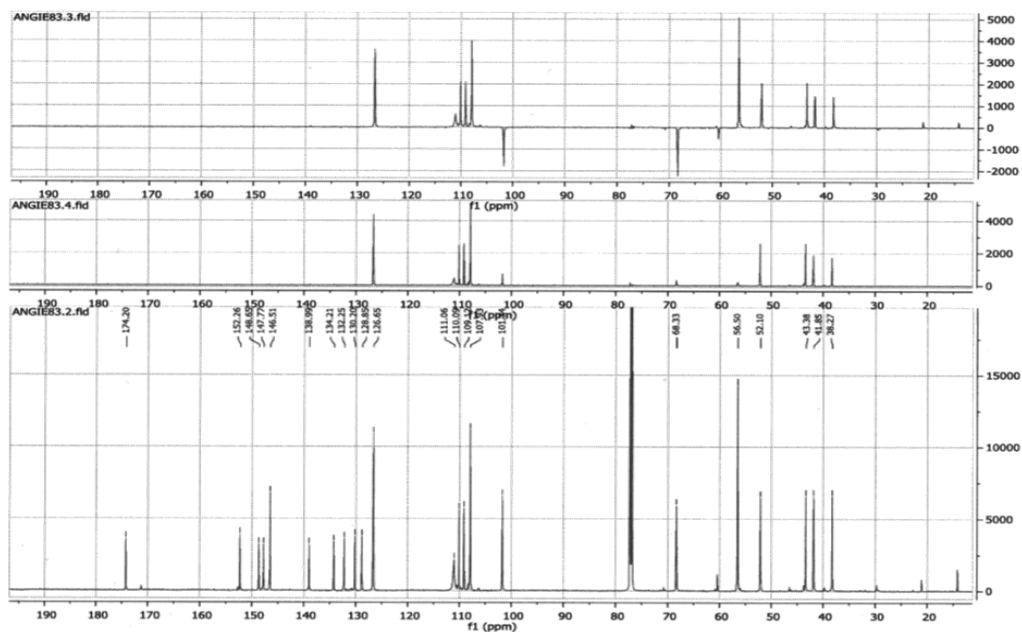
Figura XXXV: Espectro de RMN de ^1H del compuesto 52.



53



RMN de C-13:

Figura XXXVI: Espectro de RMN de ^1H y ^{13}C del compuesto **53**.

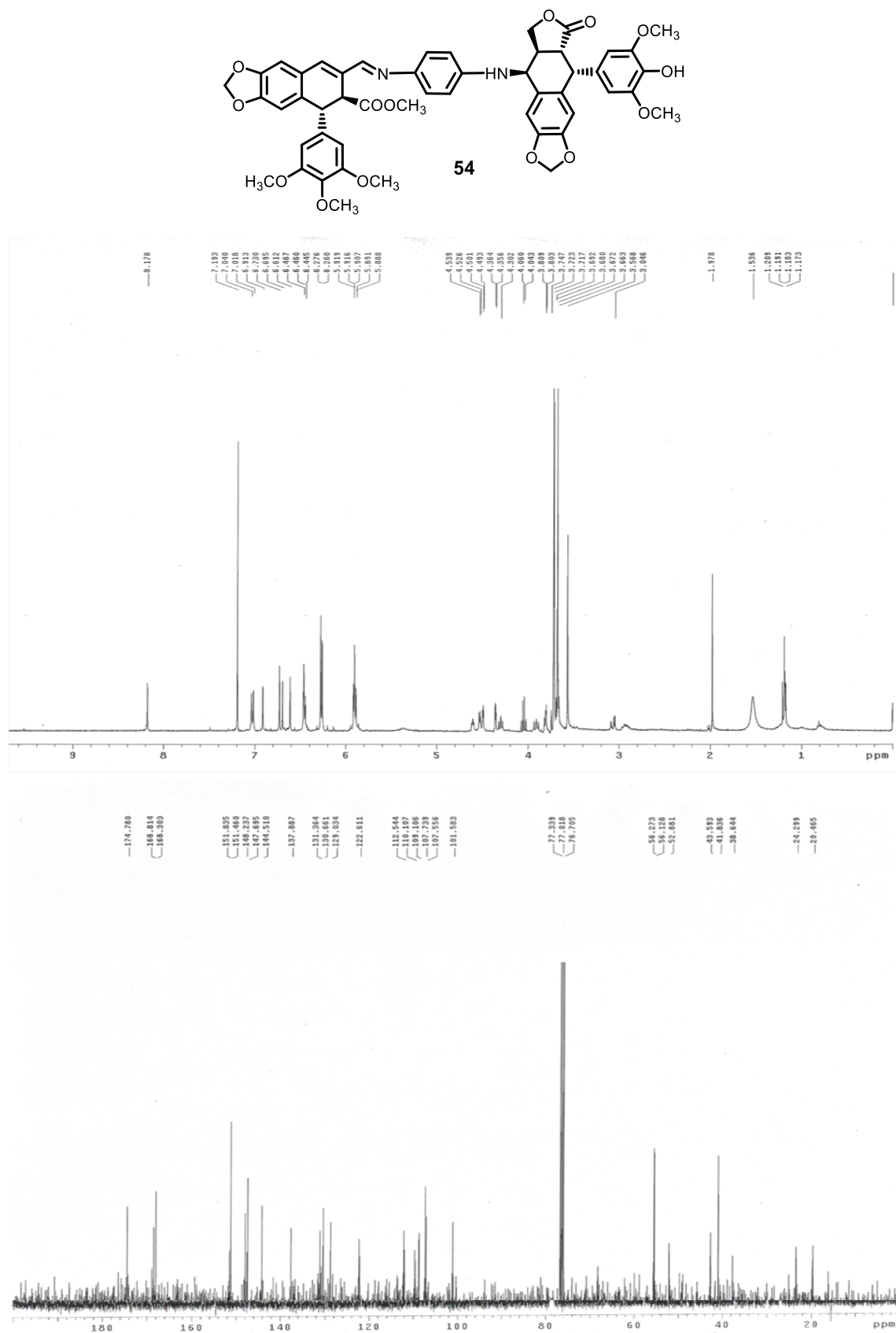


Figura XXXVII: Espectro de RMN de ¹H y ¹³C del compuesto 5



TABLAS DE ACTIVIDAD



ANÁLISIS DE APOPTOSIS EN MCF-7 (24 h)					
Compuesto	Concentración	Anexina - (%)	Anexina +		
			Total (%)	IP- (%)	IP+ (%)
	Control	83,50	16,50	17,76	86,24
1	1 μ M	75,36	24,64	91,33	8,67
	0,1 μ M	80,67	18,34	87,17	12,83
5	1 μ M	78,67	21,14	89,04	10,96
	0,1 μ M	85,94	14,06	90,22	9,88
9	1 μ M	82,32	17,68	14,21	85,79
22	1 μ M	74,13	25,87	59,95	40,05
23	1 μ M	86,81	13,19	40,81	59,19
24	1 μ M	83,80	16,20	21,99	78,01
26	1 μ M	83,33	16,67	11,41	88,59
44	1 μ M	84,07	15,93	56,33	43,47
45	1 μ M	83,37	16,63	40,81	59,19
46	1 μ M	81,49	18,51	20,03	79,97
	Control	87,25	12,75	12,75	87,25
51	1 μ M	39,40	60,60	21,96	78,04
	0,1 μ M	72,27	25,73	7,63	92,37
54	1 μ M	84,78	15,22	26,05	73,95
	0,1 μ M	84,84	15,16	14,85	85,15

Tabla XXXVIII: Relaciones de anexina/IP obtenidas por citometría de flujo en la línea MCF-7 a las 24 h de incubación de los compuestos indicados. IP-*/IP+*: relación del total de células anexina +

ANÁLISIS DE APOPTOSIS EN MG-63 (24 h)

Compuesto	Concentración	Anexina - (%)	Anexina +		
			Total (%)	IP- (%)	IP+ (%)
	Control	89,58	10,42	33,32	66,68
1	1 μ M	51,44	48,56	64,62	35,38
	0,1 μ M	66,13	33,87	63,71	36,29
5	1 μ M	51,92	48,08	81,29	18,71
	0,1 μ M	72,32	27,68	74,83	25,17
9	1 μ M	33,10	66,90	56,16	43,84
22	1 μ M	74,97	25,03	91,08	8,92
23	1 μ M	88,76	11,24	65,75	34,25
24	1 μ M	10,04	89,86	81,51	18,49
	Control	82,86	82,86	17,14	20,30
26	1 μ M	38,69	61,04	52,87	47,13
44	1 μ M	70,22	29,78	93,12	6,88
45	1 μ M	71,33	28,66	62,35	37,65
46	1 μ M	65,26	34,74	83,25	16,75
	Control	88,86	88,86	11,14	16,50
51	1 μ M	65,91	34,09	86,62	13,38
	0,1 μ M	85,85	14,15	82,17	17,83
54	1 μ M	44,63	55,37	82,33	17,77
	0,1 μ M	76,75	23,25	87,53	12,47

Tabla XXXIX: Relaciones de anexina/IP obtenidas por citometría de flujo en la línea MG-63 a las 24 h de incubación de los compuestos indicados. IP-*/IP+*: relación del total de células anexina +

ANÁLISIS DE APOPTOSIS EN HT-29 (24 h)

Compuesto	Concentración	Anexina - (%)	Anexina +		
			Total (%)	IP-* (%)	IP+* (%)
	Control	94,70	5,30	22,55	77,45
1	1 μ M	83,11	16,89	79,60	20,40
	0,1 μ M	87,47	12,53	92,01	7,99
	0,01 μ M	87,47	12,53	-	-
5	1 μ M	85,06	14,94	84,48	15,52
	0,1 μ M	86,51	13,49	90,22	9,88
	0,01 μ M	89,54	10,46	-	-
9	1 μ M	93,20	6,80	14,95	85,05
22	1 μ M	85,42	14,58	58,51	41,49
23	1 μ M	79,30	20,70	82,26	17,74
24	1 μ M	90,35	9,65	86,47	13,53
	0,1 μ M	86,29	13,71	-	-
	0,01 μ M	94,35	5,65	-	-
26	1 μ M	83,33	16,67	11,41	88,59
	0,1 μ M	93,60	6,40	-	-
	0,01 μ M	94,10	5,90	-	-
44	1 μ M	84,07	15,93	56,33	43,47
45	1 μ M	83,37	16,63	40,81	59,19
46	1 μ M	91,85	8,15	13,02	86,98
	0,1 μ M	89,29	13,71	-	-
	0,01 μ M	94,35	5,65	-	-
	Control	94,53	5,47	14,53	85,47
51	1 μ M	71,45	28,55	83,63	16,38
	0,1 μ M	92,29	7,71	83,36	16,64
54	1 μ M	76,13	23,87	74,60	25,40
	0,1 μ M	81,15	18,85	72,33	27,67
	0,01 μ M	90,30	9,70	-	-

Tabla XL: Relaciones de anexina/IP obtenidas por citometría de flujo en la línea HT-29 a las 24 h de incubación de los compuestos indicados. IP-*/IP+*: relación del total de células anexina +.

ANÁLISIS DE APOPTOSIS EN HT-29 (48h)

Compuesto	Concentración	Anexina - (%)	Anexina + (%)
	Control	90,90	10,10
1	1 μ M	84,31	15,69
	0,1 μ M	87,47	12,53
	0,01 μ M	91,98	10,02
	Control	86,43	13,50
5	1 μ M	87,92	12,08
	0,1 μ M	87,58	12,42
	0,01 μ M	91,20	8,80
24	Control	86,43	13,50
	1 μ M	75,33	24,76
	0,1 μ M	86,48	13,52
	0,01 μ M	87,25	12,75
26	1 μ M	87,92	12,08
	0,1 μ M	89,35	10,65
	0,01 μ M	91,32	8,68
46	1 μ M	43,67	56,30
	0,1 μ M	44,79	55,21
	0,01 μ M	71,14	27,86
54	Control	88,43	11,57
	1 μ M	39,91	60,09
	0,1 μ M	55,78	46,22
	0,01 μ M	62,28	30,72

Tabla XLI: Relaciones de anexina/IP obtenidas por citometría de flujo en la línea HT-29 a las 48 h de incubación de los compuestos indicados.

CICLO CELULAR EN MCF-7 (24 h)				
Compuesto	Concentración	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)
	Control	62,65	13,42	23,93
1	1 μ M	0	0	100
	0,1 μ M	5,01	3,38	91,52
5	1 μ M	3,76	1,80	94,63
	0,1 μ M	54,30	15,14	29,38
9	1 μ M	64,99	7,74	27,27
22	1 μ M	70,39	9,68	19,93
23	1 μ M	63,92	4,56	31,52
24	1 μ M	32,66	4,28	63,06
26	1 μ M	73,10	7,01	19,89
44	1 μ M	74,02	7,89	18,13
45	1 μ M	76,15	8,80	15,05
46	1 μ M	35,00	9,38	55,62
	Control	62,72	14,15	23,82
51	1 μ M	13,68	2,69	83,64
	0,1 μ M	66,07	12,27	21,67
54	1 μ M	10,00	4,01	86,00
	0,1 μ M	65,87	10,39	23,75

Tabla XLII: Porcentajes de las fases de ciclo celular obtenidas por citometría de flujo en la línea MCF-7 a las 24 h de incubación de los compuestos indicados.

CICLO CELULAR EN MG-63 (24 h)				
Compuesto	Concentración	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)
	Control	56,49	14,74	28,77
1	1 μ M	0	0	100
	0,1 μ M	0	0	100
5	1 μ M	0	0	100
	0,1 μ M	50,30	14,26	33,45
9	1 μ M	48,23	10,81	40,96
22	1 μ M	44,07	17,23	38,70
23	1 μ M	61,35	9,44	29,21
24	1 μ M	0	0	100
26	1 μ M	55,04	11,63	34,83
44	1 μ M	64,01	13,90	24,29
45	1 μ M	65,43	13,24	21,33
46	1 μ M	43,16	18,41	47,03
	Control	83,50	51,76	14,06
51	1 μ M	0	0	100
	0,1 μ M	26,88	6,75	60,65
54	1 μ M	0	0	100
	0,1 μ M	12,90	5,20	85,90

Tabla XLIII: Porcentajes de las fases de ciclo celular obtenidas por citometría de flujo en la línea MG-63 a las 24 h de incubación de los compuestos indicados.

CICLO CELULAR EN HT-29 (24 h)				
Compuesto	Concentración	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)
	Control	62,96	13,02	25,03
1	1 μ M	3,13	4,38	93,52
	0,1 μ M	3,04	10,24	86,82
5	1 μ M	2,15	5,92	92,23
	0,1 μ M	3,59	13,16	83,26
9	1 μ M	72,94	10,72	16,35
22	1 μ M	55,08	13,60	78,02
23	1 μ M	19,07	4,91	31,32
24	1 μ M	6,24	2,67	91,09
26	1 μ M	59,99	10,91	29,10
44	1 μ M	49,45	10,48	40,07
45	1 μ M	62,71	14,80	22,49
46	1 μ M	10,42	5,03	84,55
	Control	60,82	12,26	26,93
51	1 μ M	54,70	10,90	34,40
	0,1 μ M	0	4,97	95,03
54	1 μ M	22,26	10,23	67,51
	0,1 μ M	54,70	10,90	34,40

Tabla XLIV: Porcentajes de las fases de ciclo celular obtenidas por citometría de flujo en la línea HT-29 a las 24 h de incubación de los compuestos indicados.

CICLO CELULAR EN HT-29 (48 h)				
Compuesto	Concentración	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)
	Control	64,65	12,03	22,85
1	1 μ M	4,53	1,52	93,95
	0,1 μ M	0	0	100
	0,01 μ M	0	0	100
26	1 μ M	60,25	13,10	25,5
	0,1 μ M	67,35	13,75	18,97
	0,01 μ M	70,37	11,48	18,95
	Control	72,52	8,83	18,79
5	1 μ M	0,00	0,00	100
	0,1 μ M	0,00	0,00	100
	0,01 μ M	12,89	3,34	83,775
24	1 μ M	0,00	0,00	100
	0,1 μ M	71,22	7,42	21,365
	0,01 μ M	69,24	8,39	22,465
46	1 μ M	0,00	0	100
	0,1 μ M	0,00	0	100
	0,01 μ M	49,36	7,84	41,52
	Control	69,83	8,47	21,40
54	1 μ M	0	0	100
	0,1 μ M	0	0	100
	0,01 μ M	48,91	5,85	45,24

Tabla XLV: Porcentajes de las fases de ciclo celular obtenidas por citometría de flujo en la línea HT-29 a las 48 h de incubación de los compuestos indicados.



ESTRUCTURAS

