

DISEÑO Y SÍNTESIS DE DERIVADOS QUINÓNICOS MEDIANTE REACCIONES DOMINÓ Y FORMACIÓN DE COMPLEJOS METÁLICOS. ACTIVIDAD CITOTÓXICA, ANTITOPOISOMERASA II Y ANTI-MDR.

Sandra Jiménez-Alonso,^{1,2} Sandra Oramas,^{1,2} Gema Guedes,^{1,2} Rosalyn Peña,^{1,2} Patricia Quintana,^{1,2} Haydee Chávez,^{1,3} Ángel G. Ravelo^{1,2} y Ana Estévez Braun^{1,2}

¹ Instituto Universitario de Bio-Orgánica "Antonio González", Avda. Astrofísico Fco. Sánchez N^o 2. La Laguna, Tenerife, España. (aestebra@ull.es, agravelo@ull.es).

² Instituto Canario de Investigación del Cáncer

³ Departamento de Farmacia Universidad San Luis Gonzaga de Ica, Perú.

ÍNDICE:

1. INTRODUCCIÓN
 2. DISEÑO DE PIRANO NAFTOQUINONAS COMO AGENTES INHIBIDORES DE LA ENZIMA TOPOISOMERASA II
 3. SÍNTESIS DE *BIS*-PIRANONAFTOQUINONAS CON ACTIVIDAD ANTI-MDR
 4. SÍNTESIS DE FURANONAFTOQUINONAS CITOTÓXICAS
 5. COMPLEJOS METÁLICOS DE NAFTOQUINONAS
 6. REFERENCIAS
 7. AGRADECIMIENTOS
-

1. INTRODUCCIÓN

Las quinonas son compuestos orgánicos de gran importancia en sistemas biológicos y en aplicaciones industriales como colorantes o fármacos (Hui, 2009). Compuestos con núcleos quinónicos son comunes en la naturaleza y juegan un importante papel en plantas y animales (Ogawa, 2006). Muchas quinonas son utilizadas como anticancerígenos (Ravelo, 2004, Stahl 2002), antibacterianos (Haraguchi, 1997) y antimaláricos (Estévez-Braun, 2005), así como fungicidas (Campostakaki, 1992). En base a las numerosas actividades biológicas que presentan estos compuestos, el agrupamiento quinónico es considerado una estructura privilegiada en Química Médica (DeSimone, 2004; Constantino 2006).

Por otro lado, las quinonas actúan como oxidantes y electrófilos, ya que una adición nucleofílica a una quinona representa una reducción formal implicando dos electrones (Wardman 1990; Bard, 2003, Hillard 2008). De ahí que jueguen un papel clave como fármacos bio reductivos, como potenciadores de estrés oxidativo y como catalizadores redox (Hammerich 2001).

Principalmente se les asocia dos tipos de mecanismo de acción: estimulación de estrés oxidativo y alquilación de nucleófilos celulares implicando un amplio rango de biomoléculas (Begleiter, 1990).

Las quinonas sufren procesos reversibles de oxidación-reducción (Figura 1) generando especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como superóxidos ($O_2^{\cdot-}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) causando estrés oxidativo e induciendo daño al DNA de algunas proteínas esenciales (Hammerich, 2001; Chambers, 1988). Bajo condiciones aeróbicas como por ejemplo en membranas microsomales de células tumorales con suficiente aporte sanguíneo, predomina las reducciones monoeléctricas dando lugar a intermedios tipo radicales libres que pueden reaccionar con oxígeno molecular y provocar la producción de superóxido (Thurnauer, 1989; Van der Est 2001). El anión superóxido es además metabolizado a peróxido de hidrógeno y otras especies reactivas de oxígeno, que pueden causar daños adicionales al ADN (Waris, 2006).

Otra transformación principalmente localizada en el citoplasma de tejidos es catalizada por la enzima NAD(P)H: quinona oxidoreductasa, e involucra una reducción bielectrónica de la quinona a hidroquinona usando tanto NADH como NADPH como fuente de electrones. Los intermedios generados pueden ser posteriormente inactivados por una subsecuente glucuronidación y/o sulfatación o por conversión de la hidroquinona a un intermedio alquilante tipo metilén quinona. La reducción dielectrónica generalmente conocida como el paso de detoxificación de la quinona a hidroquinona, la cual es excretada, se cree que es el mecanismo predominante bajo condiciones anaeróbicas.

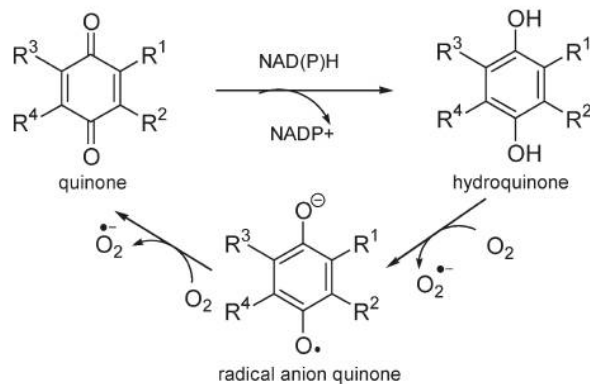
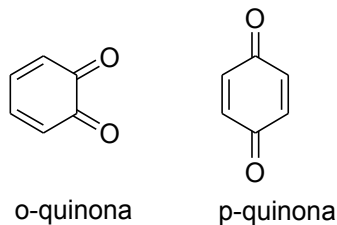


Figura 1. Ciclo Redox de las Quinonas

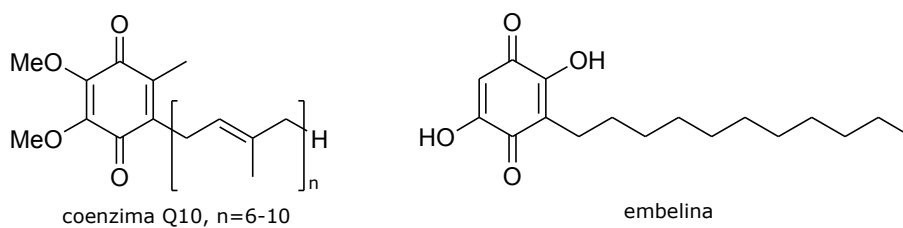
A continuación se muestra una clasificación de algunas de las quinonas más representativas:

-Benzoquinonas: Muchas veces son denominadas simplemente quinonas. Estos metabolitos secundarios son pigmentos de color amarillo que con frecuencia se encuentran en los hongos, los artrópodos y en las plantas superiores.

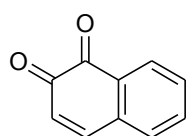


Isómeros de la benzoquinona.

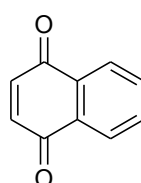
La coenzima Q10 (ubiquinona) y la vitamina E son benzoquinonas. Un ejemplo de este tipo de quinonas con actividad antitumoral es la embelina (2,5-dihidroxi-3-undecil-1,4-benzoquinona) (Jiménez-Alonso, 2008).



-**Naftoquinonas:** Las naftoquinonas naturales son pigmentos cuyo color va desde el amarillo, pasando por el anaranjado, al rojo intenso. Se encuentran en mayor cantidad en las plantas superiores y, en menor proporción en los hongos, los erizos y las estrellas de mar.

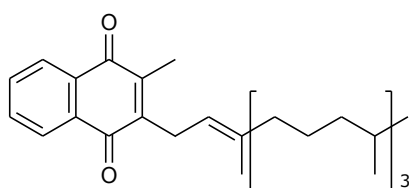


1,2-naftoquinona

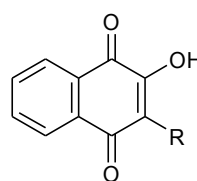


1,4-naftoquinona

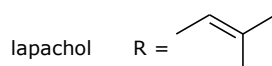
Las prenil naftoquinonas desarrollan funciones importantes en procesos bioquímicos tales como: transporte electrónico, respiración y fotosíntesis. Lapachol, β -lapachona, lawsona y la familia de vitaminas K son ejemplos de naftoquinonas prenilicas.



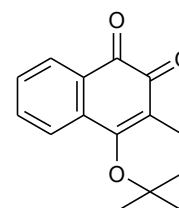
vitamina K₁



lawsona R = H

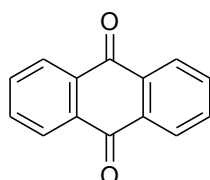


lapachol

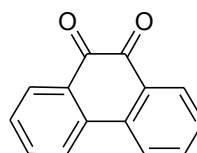


β -lapachona

-**Antraquinonas y fenantrenoquinonas:** Son una clase de metabolitos secundarios vegetales con una funcionalidad de *p*-quinona en un núcleo antracénico, o de *o*-quinona en un núcleo fenantreno. Se pueden encontrar también de forma dimérica.

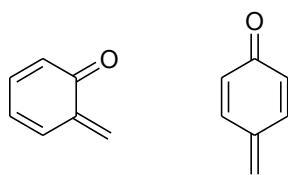


antraquinona



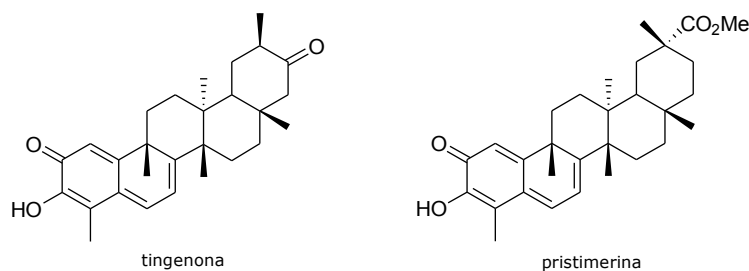
fenantrenoquinona

-**Metilénquinonas:** Se cree que son intermedios fundamentales en el mecanismo de acción de muchos fármacos anticancerígenos.



Ejemplos de metilénquinonas.

Las metilénquinonas triterpénicas, presentes en plantas de la familia de las Celastraceae, son agentes citotóxicos efectivos (Estévez-Braun, 2004, 2006; Oramas 2009).



Estructura de 24-*nor*-triterpenoquinonas.

Con estos antecedentes y dado las buenas actividades antitumorales que habíamos encontrado con derivados obtenidos de algunas quinonas de origen natural como β -lapachol, β -lapachona y 22- β -hidroxi-tingenona, decidimos acceder a una variedad de derivados quinónicos de manera sintética, evitando así uno de los principales inconvenientes de los metabolitos secundarios naturales como es la limitación de las cantidades disponibles.

En la bibliografía química existen estrategias para el diseño de fármacos que tienen en cuenta el aspecto de diversidad química generado en la propia naturaleza (Kaiser, 2008). Una de ellas es la aproximación de **Síntesis Orientada a la Diversidad (SOD)** frente a la Síntesis Orientada a un Objetivo o "Target" (SOT) (Burke, 2004). La Síntesis Orientada a la Diversidad (SOD) tiene como objetivo la preparación de una amplia distribución de compuestos, con diversas estructuras, en el espacio químico. Para alcanzar ese conjunto de compuestos con diversidad de estructuras, la síntesis orientada a la diversidad se basa en el desarrollo de nuevas estrategias que conduzcan a la síntesis eficiente de colecciones de moléculas que tengan diversidad en los sustituyentes, diversidad de esqueletos y diversidad estereoquímica de manera análoga a la naturaleza.

Algo también a tener muy en cuenta basándose en las estructuras y las funciones de los productos naturales, es que la complejidad estructural se correlaciona positivamente con la acción de perturbar a las proteínas y la especificidad de acción. Por consiguiente, para lograr complejidad en los esqueletos mediante SOD, es importante identificar e implementar reacciones generadoras de complejidad, y que de forma rápida unan esqueletos moleculares sencillos para formar productos complejos (Ramón 2005).

En este sentido, las **reacciones dominó** constituyen una rápida herramienta para la síntesis de moléculas complejas similares a los productos naturales con diversidad estructural (Zhu 2005). En los últimos 10 años se han publicado un gran número de nuevas reacciones dominó que reflejan el interés de estas metodologías en diferentes áreas de investigación como en ciencia de los materiales y, sobre todo, en el descubrimiento de nuevos fármacos en química médica (Tietze, 1991).

Una reacción dominó se define como un proceso en el que se forman dos o más enlaces en una sola secuencia (involucrando varias transformaciones), sin aislar intermedios, cambiar condiciones de reacción o añadir reactivos adicionales (Tietze 1991). El número de enlaces formados, la economía de átomos, la complejidad estructural y funcional introducida en la molécula final, la facilidad de manipulación experimental y las condiciones estequiométricas de los componentes determinarán la eficiencia de una reacción dominó. Por otro lado, estas reacciones, por su mecanismo intrínseco, hacen que sean procesos más respetuosos con el medio ambiente debido fundamentalmente a la economía de átomos y la reducción de etapas sintéticas, lo que conlleva a una reducción en la formación de productos secundarios, uso de cantidades menores de disolventes y empleo de menor número de reactivos (Varma 1999).

Mediante este tipo de reacciones se puede conseguir la formación de moléculas policíclicas complejas en un sólo paso a partir de materiales de partida asequibles.

A continuación en los siguientes apartados mostramos algunos ejemplos ilustrativos de la síntesis de sistemas quinónicos fusionados a heterociclos mediante procesos dominó.

2. DISEÑO DE PIRANO NAFTOQUINONAS COMO AGENTES INHIBIDORES DE LA ENZIMA TOPOISOMERASA II

Basándonos en estudios de citotoxicidad sobre la línea HL-60 y estudios de modelización 3D-QSAR (CoMSIA) sobre una quimioteca generada de derivados obtenidos a partir de las naftoquinonas naturales lapachol y β -lapachona (Pérez-Sacau, 2007), llegamos a la conclusión de que el diseño de piranonaftoquinonas con una extensión de la estructura a través del anillo piránico debería de producir buenos niveles de citotoxicidad.

Para ello, decidimos llevar a cabo la preparación de esos compuestos mediante una reacción dominó tipo Knoevenagel-hetero Diels-Alder (Jíménez Alonso 2007, 2008). Así la reacción del compuesto comercial 2-hidroxi-naftoquinona con aldehídos que contenga en su estructura dobles enlaces a una distancia apropiada generará un intermedio metilénquinónico (Ferreira, 1982; Jíménez-Alonso, 2008) como el que se ilustra en la Figura 2 susceptible de evolucionar mediante una reacción hetero Diels-Alder a través del sistema heterodiénico a) o b) para dar las correspondientes 1,4- o 1,2-naftoquinonas.

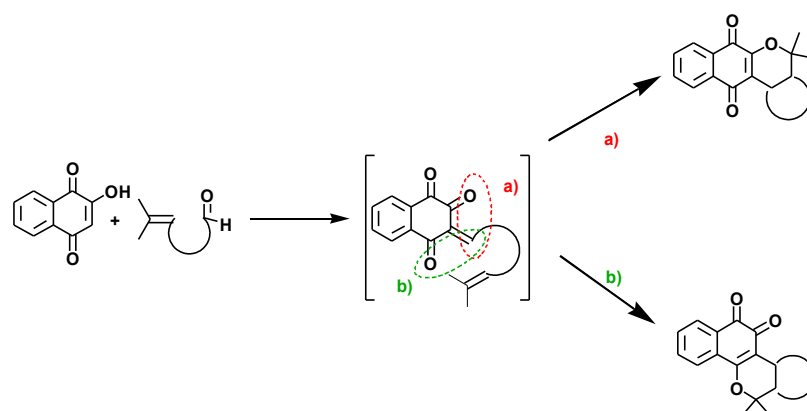
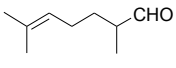
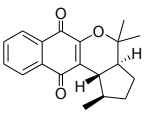
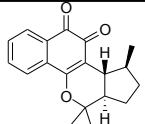
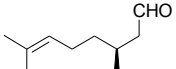
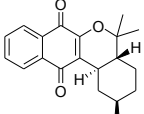
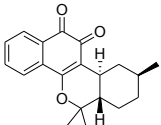
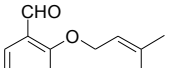
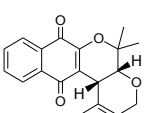
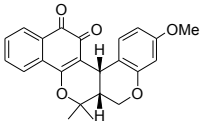
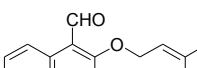
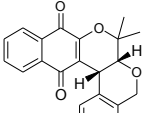
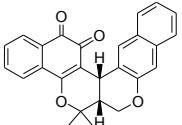
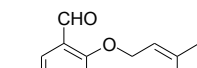
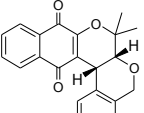


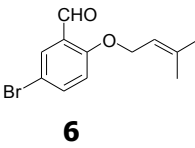
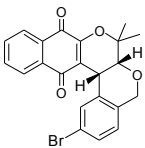
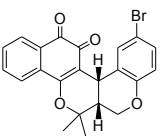
Figura 2. Formación de dihidropirano-naftoquinonas

Nosotros seleccionamos el aldehído 2,6-dimetil-5-heptenal para investigar las mejores condiciones de reacción. Usamos diferentes proporciones de reactivos, diferentes disolventes (EtOH, MeOH, C₇H₈, DCE, dioxano, CH₃CN) y diferentes bases (EDDA, Et₃N, N-acetilpiperidina). El mejor rendimiento se consiguió con 3 equiv de aldehído, 5% de EDDA, EtOH como disolvente y reflujo. Con esas condiciones los aductos fueron obtenidos de manera cuantitativa en 30 minutos (Tabla 1, entrada 1). Aplicamos dichas condiciones a una variedad de aldehídos alifáticos y aromáticos. Con los aldehídos alifáticos 2,6-dimetil-5-heptenal y citronelal una alta diastereoselectividad fue conseguida ya que solo se obtuvieron aductos *trans*. Los productos fueron obtenidos como una mezcla de *para* y *orto* quinonas fáciles de separar por cromatografía. El centro estereogénico en posición α o β al carbonilo proporcionó una alta inducción asimétrica. Atendiendo a la diversidad estructural la secuencia sintética es muy atractiva ya que 1,2- y 1,4-naftoquinonas son generadas en una reacción "one pot" permitiendo después de la evaluación biológica, la directa comparación entre ambos tipos de compuestos. En el caso de los aldehídos aromáticos, solo se obtuvieron *trans* aductos debido a la existencia de un estado de transición tipo endo-(*E*)-syn.

Con el fin de mejorar el grado de regioselectividad, llevamos a cabo la reacción bajo irradiación con microondas siguiendo diferentes condiciones de reacción, pero solo se consiguió acortar los tiempos de reacción de 20 a 3 minutos.

Tabla 1. Reacción de 2-hidroxinaftoquinona con aldehídos insaturados.

Entrada a	Aldehído	<i>Para</i> - quinona	<i>Orto</i> - quinona	Relación n (Rto) ^a	Relación (Rto) ^b
1	 1	 1a (±)	 1b (±)	1:1,5 (100)	1:1 (98)
2	 2	 2a	 2b	1:1 (94)	1:1 (85)
3	 3	 3a (±)	 3b (±)	1: 1,6 (70)	1:1 (85)
4	 4	 4a (±)	 4b (±)	1: 1,6 (70)	1:1 (66)
5	 5	 5a (±)	----	---- (62)	---- (59)

6	 <p>6</p>	 <p>6a (±)</p>	 <p>6b (±)</p>	<p>1:1 (72)</p>	<p>1,4:1 (68)</p>
----------	---------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------	-----------------------

a) Calentamiento a reflujo usando EtOH: b) Calentamiento usando un microondas CEM-Discover y EtOH .

Los compuestos obtenidos fueron evaluados como inhibidores de la actividad de la enzima humana topoisomerasa II- α . Para ello, los productos se ensayaron como inhibidores de la decatenación y relajación del ADN mediada por dicha enzima. Además, se estudió si dichos compuestos actuaban como venenos o inhibidores catalíticos de topoisomerasa II, encontrándose que la mitad actúan como inhibidores catalíticos de esa diana.

Para el ensayo de decatenación se empleó como sustrato el cinetoplasto de ADN (kDNA) obtenido de *Crithidia fasciculata*. Así, para medir qué compuesto inhibe mejor la topoisomerasa II, la enzima pura fue incubada con la dihidropirano-naftoquinona e inmediatamente se añadió el kADN. Se incluyeron varios controles para confirmar la validez del ensayo. Este ensayo está considerado como el más específico para determinar la actividad de topoisomerasa II (Muller, 1989). Una decatenación completa se observó para los compuestos **(1a)**, **(1b)**, **(2a)**, **(2b)** y **(4a)**, lo que implica su inactividad frente a topoisomerasa II. Para los compuestos **(3a)**, **(3b)**, **(4b)**, **(5a)**, **(6a)** y **(6b)** la inhibición de la actividad de la enzima fue total (Figura 3).

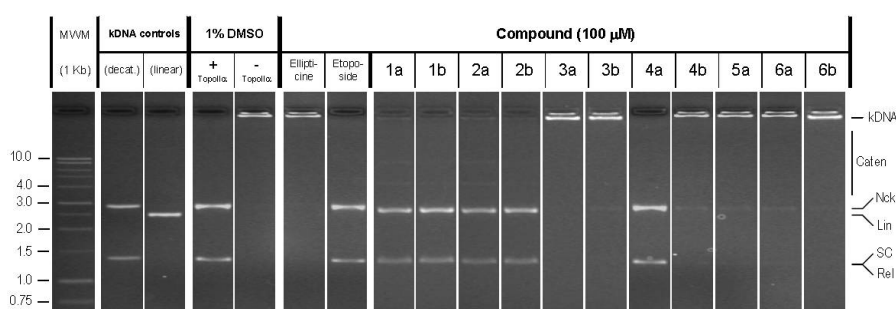


Figura 3: Inhibición de la decatenación del kADN mediada por topoisomerasa II- α humana en presencia de las pirano-naftoquinonas (comparado con el control sin enzima y con elipticina).

Para comprobar que la decatenación falla por la inhibición de topoisomerasa II en presencia de las pirano-naftoquinonas, se realizó otro ensayo para la actividad de topoII. En

este otro ensayo se midió la topo-dependencia en la relajación de un plásmido (pRYG) que contiene la secuencia representativa de la topoisomerasa II (Spitzner, 1990).

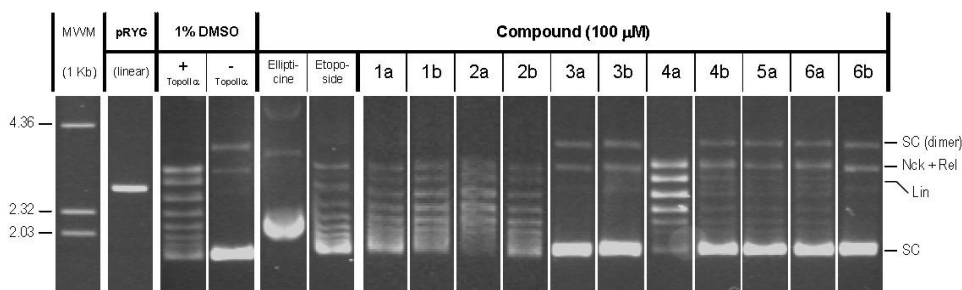


Figura 4: Inhibición de la relajación del kADN mediada por la topoisomerasa II- α humana en presencia de las piranoftoquinonas **(3a)**, **(3b)**, **(4b)**, **(5a)**, **(6a)** y **(6b)** (comparado con el control sin enzima y con ellipticina).

Un tercer ensayo se realizó para estudiar si los compuestos actúan de forma reversible, como el caso del etopósido. En efecto, con el etopósido mostraron la forma lineal del plásmido pRYG (Figura 5). Sin embargo, esta forma no fue visible en otros controles, que incluyen ellipticina, ni con los compuestos ensayados. De este ensayo se puede concluir que ninguno de los compuestos se comportó como un típico veneno de topoisomerasa II.

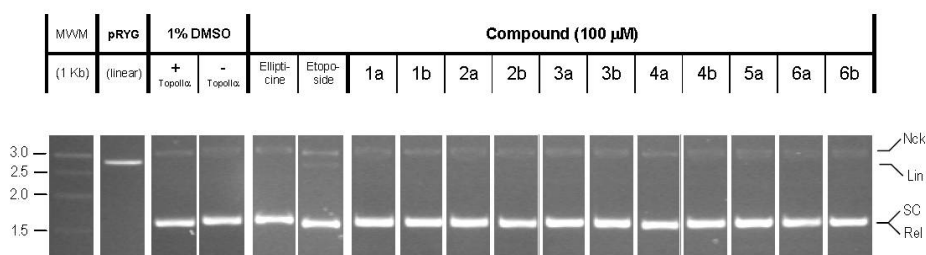


Figura 5: Ensayo para comprobar si las piranoftoquinonas sintetizadas actúan como venenos de topoisomerasa II.

Finalmente, se pueden diferenciar dos tipos de inhibidores catalíticos de topoisomerasa II por su acción en la molécula de ADN. Los que pueden intercalarse en las bases del ADN y los que no. Para discernir entre estas dos posibilidades se realizó un ensayo de intercalación. Como control se usó el agente no intercalante etopósido. Se incubó ADN circular superenrollado (en este caso el plásmido pBSKS) con los compuestos piranoftoquinona, si algún compuesto se

intercala en el ADN se produciría un cambio en el grado de superenrollamiento, y se observa un retardo en la Figura 6 (como ocurre en el control con elipticina comparado con el control con etopósido). En presencia de los compuestos dihidropiranoftoquinona, el ADN se comporta igual que en presencia de etopósido, no se observa ningún cambio en la topología del ADN, por lo que se concluye que estos compuestos no son agentes intercalantes.

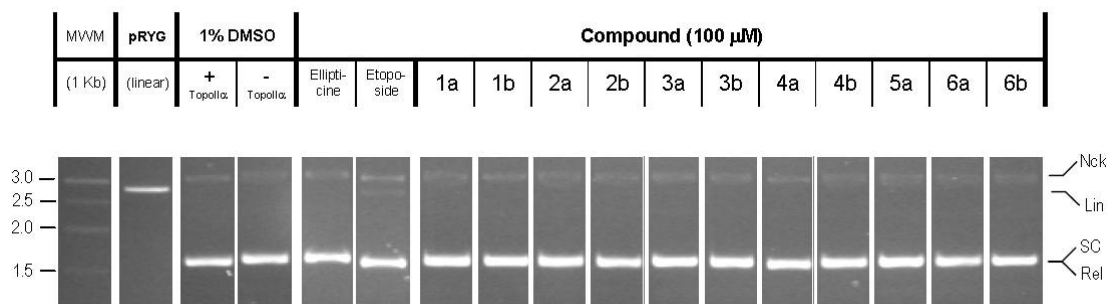


Figura 6: Ensayo de intercalación, donde todos los compuestos dihidropiranoftoquinona actúan como agentes no intercalantes al igual que el etopósido.

Las dihidropiranoftoquinonas fueron modelizadas en varios posibles bolsillos de topoisomerasa II. El mejor resultado fue obtenido en el bolsillo del ATP, lo que coincide con los resultados biológicos en los que se apunta que las piranoftoquinonas actúan como inhibidores catalíticos de topoisomerasa. Se encontró que todos los compuestos activos se superponen adecuadamente en el sitio de unión mostrando una interacción π favorable con el ión magnesio y el correspondiente anillo aromático portador del grupo metoxilo o bromo (Figura 7). Este tipo de interacción parece ser esencial ya que los compuestos que no poseen ese anillo aromático resultaron ser inactivos.

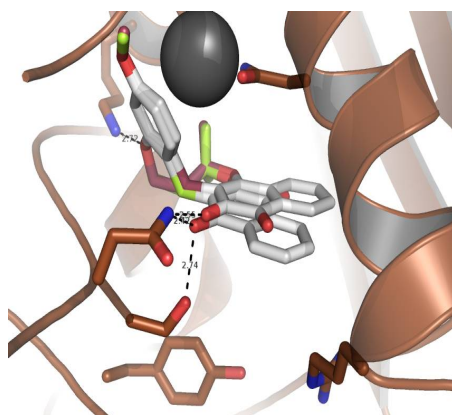


Figura 7. Docking de dos compuestos activos representativos en el bolsillo del ATP de la enzima topoisomerasa II.

3. SÍNTESIS DE *BIS*-PIRANONAFTOQUINONAS CON ACTIVIDAD ANTI-MDR

En los últimos años, la multirresistencia a fármacos ha emergido como uno de los mayores impedimentos para el tratamiento del cáncer y de numerosas enfermedades causadas por protozoos parasitarios, como *Leishmania spp.* Concretamente, esta es la causa del fallo en el tratamiento de alrededor del 90% de los pacientes con cáncer metastático (Longley, 2002).

Uno de los mecanismos de la resistencia a fármacos es la sobreexpresión en las membranas celulares de proteínas o bombas encargadas de la expulsión de fármacos fuera de la célula. Estas bombas de fármacos pertenecen a la familia de las proteínas ABC (*ATP-binding cassette*) (Schinkel, 2003). Se trata de una de las familias de proteínas más extensa conocidas, desde arqueobacteria hasta eucariotas (Higgins, 1992). Estas proteínas utilizan la energía de la hidrólisis del ATP para importar o exportar un amplio rango de sustratos, desde pequeños iones inorgánicos hasta péptidos, azúcares, lípidos o fármacos.

Entre todas las proteínas ABC asociadas a la multirresistencia a fármacos, la glicoproteína P (Pgp, MRP1 o ABCB1), la proteína 1 (MRP1 o ABCC1) asociada a la multirresistencia y la proteína de la resistencia del cáncer de mama (BCRP o ABCG2), son capaces de transportar diferentes fármacos con distinta estructura y funcionalidad, confiriendo un fenotipo de multirresistencia a fármacos (MDR). Los transportadores ABC están involucrados en la resistencia a los fármacos anticancerígenos (Gottesman 2002) y, al menos "*in vitro*", a muchos fármacos antiparasitarios (Pérez-Victoria, 2001). Por lo tanto, el descubrimiento de inhibidores de estos transportadores es de elevada relevancia clínica, pudiendo ser una solución efectiva la terapia combinada utilizando fármacos junto con moduladores de la resistencia a fármacos.

Durante los últimos años se han descrito numerosos inhibidores de las proteínas ABC. Para Pgp mamíferas, los moduladores más activos se conocen como moduladores de tercera generación y son: LY335979 (zosuquidar), GF120918 (elacridar) y XR9576 (tariquidar), entre otros. Estos moduladores son capaces de revertir eficientemente la actividad de estos transportadores (Thomas, 2003), pero los buenos resultados "*in vitro*" no han sido respaldados con los obtenidos en las pruebas clínicas. Esto es debido al hecho de que zosuquidar afecta a la farmacocinética y biodistribución del fármaco co-administrado, elacridar no es específico para Pgp y tariquidar mostró limitación para restablecer la sensibilidad a la quimioterapia basada en antraciclina.

Por otro lado, el escaso número de moduladores de MDR conocidos para parásitos protozoarios hace necesario encontrar también nuevas moléculas específicas para estos transportadores ABC involucrados en el fenotipo MDR de estos agentes infecciosos. Pero estos nuevos moduladores no deben interferir con las funciones fisiológicas normales atribuidas a sus homólogos humanos (Klokouzas, 2003) (Pérez-Victoria, 2006) (Oullette, 2001).

Teniendo en cuenta las características estructurales que presentan algunos agentes con actividad anti MDR, así como numerosos fármacos anticancerígenos y leishmanicida como por ejemplo antraciclinas, mitoxantrona o camptotecina, pensamos que compuestos con estructura tipo *bis*-piranobenzoquinona que poseen los agrupamientos benzopirano y benzoquinona, ambos designados como estructuras privilegiadas en química médica, podrían ser candidatos a presentar este tipo de actividad.

La síntesis de esta familia de compuestos se abordó mediante una metodología similar a la mostrada en el apartado anterior, así la condensación de 2,5-dihidroxi-1,4-benzoquinona y aldehídos que contienen un doble enlace en su estructura, genera un intermedio reactivo tipo metilénquinona, el cual bajo una doble reacción de hetero Diels-Alder intramolecular con el doble enlace del aldehído, que actúa como dienófilo, produce los correspondientes aductos *bis*-piranobenzoquinonas.

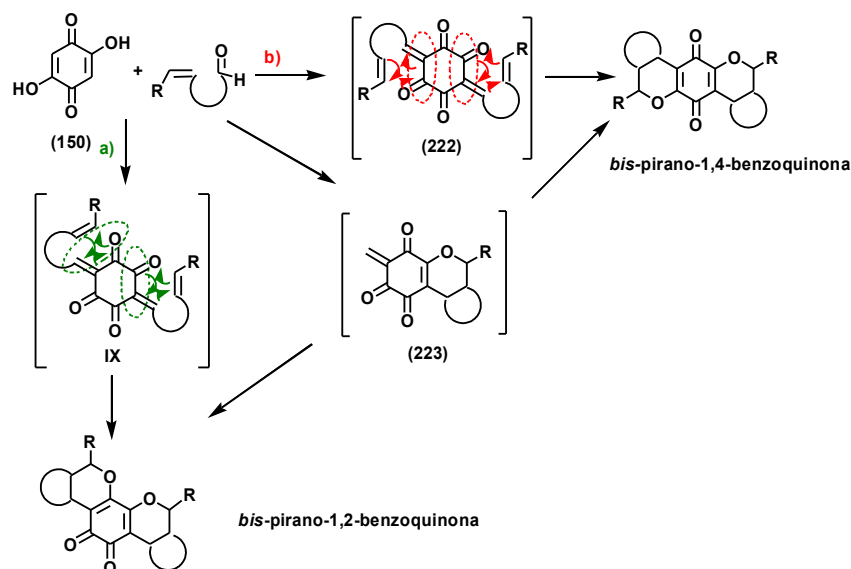


Figura 8: Formación de *bis*-piranobenzoquinonas.

Este polifuncional intermedio posee dos sistemas heterodiénicos que pueden reaccionar de dos formas (Figura 8). En uno de los casos, **a)** los dos heterodienos están en disposición contigua y reaccionan para dar lugar a *bis*-pirano-1,2-benzoquinonas angulares. En el otro caso, **b)** los dos heterodienos no están en disposición contigua y reaccionan dando lugar a *bis*-pirano-1,4-benzoquinonas lineales. La formación de los dos anillos de pirano puede ocurrir simultáneamente a partir del intermedio metilénquinona, o bien, alternativamente, en primer lugar se forma uno de los dos anillos pirano para dar un segundo intermedio, el cual continúa con una segunda reacción de hetero Diels-Alder para dar el producto final.

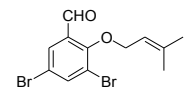
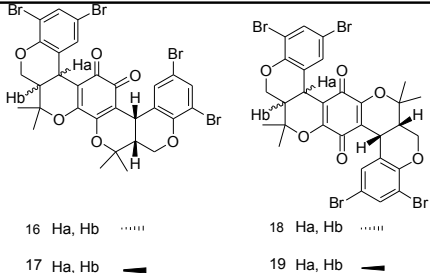
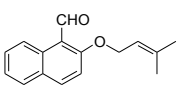
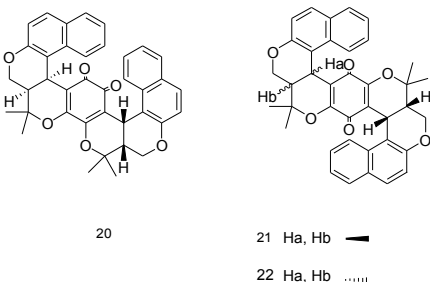
Como aldehído de referencia se tomó 3,3-dimetil-acroleína y se optimizaron las condiciones de reacción. En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos en la formación de

los aductos *bis*-dihidropiranobenzoquinonas. Los mejores rendimientos se obtuvieron cuando se usaron 6,0 equivalentes de aldehído insaturado y cantidades catalíticas de EDDA usando etanol como disolvente y reflujo durante 20 minutos.

El curso de la reacción parece ser sustrato-dependiente ya que con el aldehído α,β -insaturado 3,3-dimetilacroleína sólo se aisló el aducto 1,2-benzoquinónico mientras que cuando el doble enlace en el aldehído está en una posición más alejada, se obtienen mezclas de productos 1,2 y 1,4-benzoquinonas.

Tabla 2. Síntesis de *bis*-dihidropiranobenzoquinonas.

Entrada	Dienófilos	Aductos	Proporción diastereomeros	Yield (%)
1			-----	70
2			1,0:1,0	81
3			1,6:1,0	79
4			1,0:4,0:5,0:5,0	60
5			5,0:1,0:2,0:1,8	80

6		 <p>16 Ha, Hb 17 Ha, Hb —</p> <p>18 Ha, Hb 19 Ha, Hb —</p>	8,0:5,0:6,0:1,0	80
7		 <p>20</p> <p>21 Ha, Hb — 22 Ha, Hb</p>	3,6:1,4:1,0	57

Con los aldehídos alifáticos 2,6-dimetilheptenal (entrada 1) y (*s*)-(-)-citronelal (entrada 2), se obtuvieron los correspondientes aductos como una mezcla de *orto* y *para* en relación 1:1 y 1,6:1 respectivamente.

En estas reacciones se consiguió una elevada estereoselectividad ya que sólo se formaron aductos *trans*. Encontrándose que el centro estereogénico en la posición α ó en β al carbonilo en estos aldehídos produce una alta inducción asimétrica, obteniéndose los aductos **(4)**, **(5)**, **(6)** y **(7)** con alta selectividad, al igual que ocurre con la lawsonia, siendo la orientación favorecida del estado de transición *exo-E-anti*. Además, la estereoquímica *trans* en estos aductos se corroboró por difracción de Rayos X (Jiménez-Alonso, 2008). Cuando la reacción se lleva a cabo con los aldehídos aromáticos, se obtienen aductos *cis* procedentes de un estado de transición con las orientaciones *endo-E-syn* y *exo-Z-anti* con siete y nueve anillos fusionados con varios motivos privilegiados en su estructura en las proporciones que se indican en la Tabla 2. En el caso de los aductos obtenidos con el naftaldehído insaturado (entrada 6), la estereoquímica fue también corroborada por un experimento de difracción de Rayos X.

Para células mamíferas, el screening inicial de actividades anti-MDR de las 19 *bis*-dihidropiranobenzoquinonas fue llevado a cabo por medida de la acumulación intracelular de los sustratos fluorescentes daunorubicina, calceína-AM y mitoxantrona en células que expresan Pgp (MDR1), MRP1 y BCRP, respectivamente. Ensayos utilizando 10 μ M de daunorubicina como sustrato fluorescente mostraron que los compuestos **(8)**, **(9)**, **(10)**, **(11)** y **(19)** a 10 μ M fueron los moduladores más potentes de Pgp en células NIH-3T3-MDR1-G185 (células MDR1), comparado con 10 μ M de verapamilo como modulador control que presenta un valor de *K_i* (constante de inhibición) de 0,42 μ M (Figura 9). Los compuestos **(8)**, **(9)**, **(10)**, **(11)** y **(12)**

fueron capaces de bloquear el 100% de la actividad transportadora de Pgp, induciendo de cinco a seis veces más la acumulación de daunorrubicina comparado con las células MDR1 sin modulador. Ninguno de los compuestos testados fueron inhibidores activos del transporte de fármacos mediado por MRP1 y BCRP, como se determinó en los ensayos usando calceína-AM y mitoxantrona como sustratos respectivos. Estos resultados sugieren que estos compuestos son inhibidores específicos del fenotipo MDR mediado por Pgp.

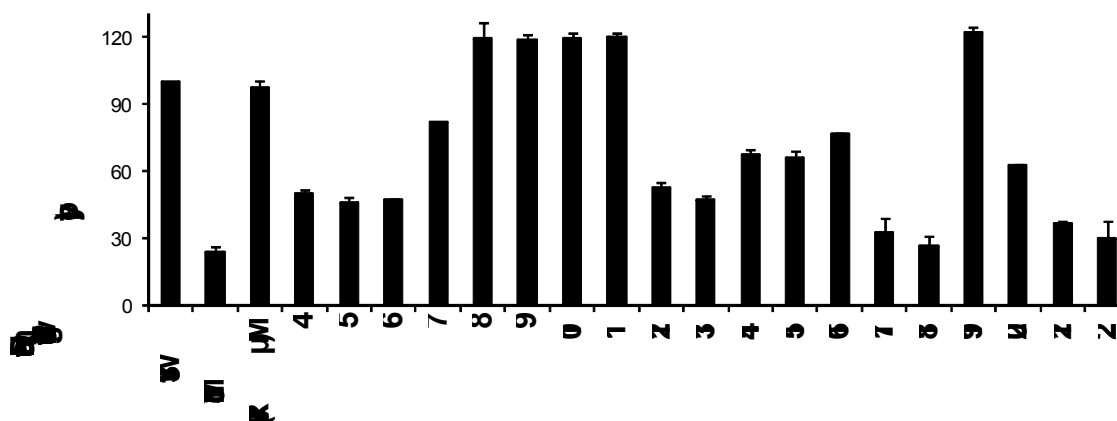


Figura 9: Modulación de la acumulación de daunorubicina por los derivados bis-pirano-benzoquinona a 10 μM en células NIH-3T3 MDR1. Los resultados se expresan como porcentaje de daunorubicina consumida en células NIH-3T3 MDR1 en presencia o ausencia de compuesto con respecto a la acumulación en células NIH-3T3 Wt (100%). Verapamilo (10 μM) se utilizó como referencia. Los datos son la media de tres experimentos independientes \pm SD.

En las tablas 3, 4, 5 se da cuenta de la inhibición del transporte de daunorubicina mediado por Pgp por los compuestos seleccionados (**7-10** y **19**) en células NIH-3T3 MDR1, su citotoxicidad intrínseca a 10 μM sobre células NIH-3T3 wild-type (Wt) y NIH-3T3 MDR1, así como su habilidad para revertir la resistencia de daunorubicina en células NIH-3T3 MDR1.

Tabla 3. Inhibición del transporte de daunorubicina mediado por Pgp por los compuestos seleccionados (**7-10** y **16**) en células NIH-3T3 MDR1.

Compuestos	$K_i(\mu\text{M})$	B_{max}
7	$0,77 \pm 0,50$	$72,0 \pm 10,2$
8	$1,04 \pm 0,36$	$112,5 \pm 8,9$
9	$0,42 \pm 0,13$	$105,8 \pm 6,9$
10	$0,51 \pm 0,19$	$104,3 \pm 8,2$
19	$1,01 \pm 0,75$	$88,9 \pm 14,9$

Se define K_i como la concentración de *bis*-piranobenzoquinona que produce el 50% de inhibición de Pgp, y B_{max} se define como la máxima inhibición. Los resultados se expresan como la media \pm SD ($P = < 0.0001$) de tres experimentos independientes hechos por triplicado

Tabla 4 . Citotoxicidad intrínseca de los compuestos **7-11** y **19** a 10 μ M sobre células NIH-3T3 wild-type (Wt) and NIH-3T3 MDR1.

Compuestos	NIH-3T3 MDR1 (% Inhibición)	NIH-3T3 Wt (% Inhibición)
7	18,1 \pm 3,2	0,0 \pm 0,1
8	10,8 \pm 1,4	24,7 \pm 0,0
9	3,5 \pm 1,5	9,7 \pm 0,1
10	0,0 \pm 7,0	6,5 \pm 1,1
11	54,1 \pm 3,2	53,3 \pm 0,7
19	9,6 \pm 1,1	12,9 \pm 2,5
Zosuquidar	3,1 \pm 0,6	2,4 \pm 4,9
Verapamilo	11,2 \pm 1,1	19,6 \pm 2,8

Verapamilo y zosuquidar fueron usados a 10 y 3 μ M. Los resultados se expresan como la media \pm SD de tres experimentos independientes hechos por triplicado

Tabla 5. Habilidad para revertir la resistencia de daunorubicina de los compuestos *bis*-pirano-1,4-benzoquinona seleccionados en células NIH-3T3 MDR1.

Compuestos	10 μ M (a)		3 μ M		1 μ M	
	IC ₅₀ (μ M)	RI (b)	IC ₅₀ (μ M)	RI	IC ₅₀ (μ M)	RI
7	0,16 \pm 0,01	3,6	0,46 \pm 0,15	10,4	0,87 \pm 0,20	19,7
8	0,11 \pm 0,08	2,5	0,12 \pm 0,03	2,7	0,25 \pm 0,06	5,7
9	0,09 \pm 0,03	2,0	0,11 \pm 0,00	2,4	0,17 \pm 0,08	3,9
10	0,07 \pm 0,01	1,6	0,11 \pm 0,05	2,4	0,20 \pm 0,11	4,5
19	0,10 \pm 0,04	2,3	0,16 \pm 0,16	3,5	0,35 \pm 0,04	8,0
Zosuquidar	-	-	0,04 \pm 0,01	0,9	0,10 \pm 0,04	2,3
Verapamilo	0,11 \pm 0,01	2,5	-	-	-	-

(a) Concentration of bis-pyranobenzoquinones. (b) RI: Índice de resistencia, relación entre el valor de IC₅₀ de la línea MDR y el valor de IC₅₀ de la línea Wt line (0,044 \pm 0,030 μ M).

Tras examinar los resultados obtenidos, se pueden establecer algunas conclusiones de la relación estructura actividad. Cuatro de las seis moléculas más prometedoras como moduladores de Pgp en células MDR1 son pirano-1,4-benzoquinonas. En la serie de los aductos *trans* sintetizados a partir de aldehídos insaturados alifáticos **(4)-(7)**, solamente el compuesto **(7)** mostró una relevante actividad inhibitoria. En este sentido, el tamaño de los aductos parece jugar un importante papel en la actividad anti-MDR. Si se comparan las estructuras de los compuestos **(5)** y **(7)**, atendiendo al tamaño del anillo C, el anillo de cinco miembros lleva a peor actividad que el anillo de seis miembros.

En la serie de los aductos *cis* obtenidos a partir de aldehídos aromáticos, la posición y los factores estereoelectrónicos de los sustituyentes en el anillo aromático es importante para la actividad. Los mejores resultados se obtuvieron con los aductos que poseen el grupo metoxilo. Los compuestos **(9)**, **(10)**, **(11)** y **(12)** presentan características estructurales muy similares.

Estas estructuras presentan los anillos dihidropirano *cis*-fusionados (B/C), pero en los compuestos **(10)** y **(11)** todos los hidrógenos implicados en la unión de esos heterociclos están localizados en la misma cara, mientras que en el caso de los compuestos **(9)** y **(12)** se encuentran en caras diferentes. Consecuentemente, los compuestos **(9)-(12)** y **(10)-(11)** adoptan diferentes conformaciones espaciales que son responsables del perfil citotóxico de esos compuestos.

Además, se realizaron estudios paralelos en una línea de MDR de *Leishmania tropica* en presencia de daunorubicina a 10 μ M. La resistencia a fármacos en una línea de MDR *L. tropica* se relaciona con una disminución de la acumulación de fármaco intracelular, principalmente debido a la sobreexpresión de transportadores tipo Pgp. Los resultados, determinados por ensayos basados en MTT, indicaron que los compuestos **(4)**, **(6)**, **(8)**, **(11)**, y **(20)** causaron más del 75% de inhibición del crecimiento celular de parásitos MDR, concretamente los compuestos **(11)** y **(20)**, dieron valores de alrededor de 100% y análisis mediante citometría de flujo con calceína AM como sustrato, mostró que la potencia revertidora de estos compuestos está correlacionada con un incremento de la acumulación de fármaco, como consecuencia de la inhibición de Pgp. En los estudios en la línea MDR *L. tropica*, las conclusiones del estudio entre estructura-actividad son diferentes que en el caso de las células mamíferas. Ahora las moléculas más efectivas son las *orto*-benzoquinonas en lugar de las *para*-benzoquinonas.

En conclusión, los aductos *bis*-dihidropirano-1,2 y 1,4-benzoquinona sintetizados mediante la doble reacción DKHDA intramolecular constituyen una nueva familia de compuestos prometedores como agentes revertidores de MDR en líneas celulares humanas cancerígenas para futuros ensayos "in vivo", así como revertidores del fenotipo en el parásito protozoo *Leishmania*. Estos resultados representan un punto de partida para la preparación de nuevas

bis-dihidropirano-benzoquinonas más potentes y selectivas como agentes revertidores de MDR (Jiménez-Alonso, 2008).

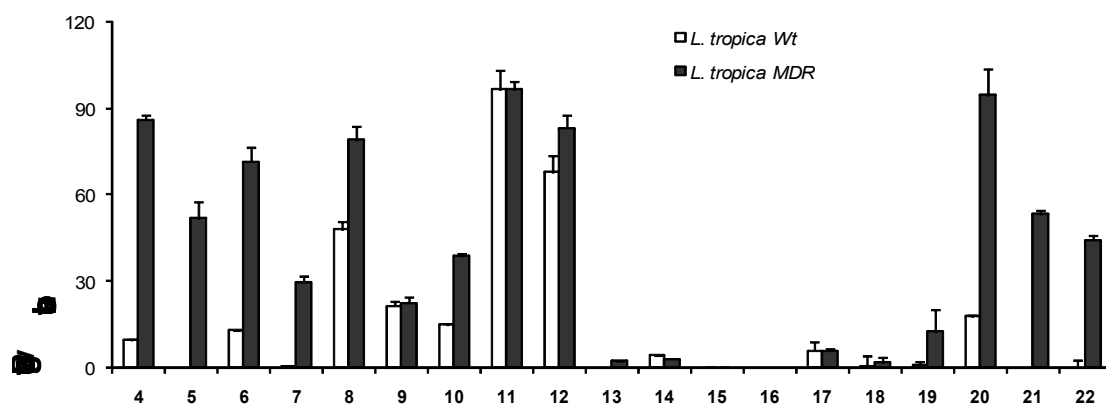


Figura 10. *L. tropica* Wt y líneas MDR fueron expuestas 10 μ M de los *bis*-pirano benzoquinonas seleccionados, en ausencia (línea Wt) o presencia de daunorubicina (150 μ M) (líneas MDR) para 72 horas. Los resultados se expresan como porcentaje relativo de la inhibición del crecimiento del control de cada línea celular sin *bis*-dihidropirano-benzoquinonas. Los datos son la media de tres experimentos independientes \pm SD.

4. SÍNTESIS DE FURANO-NAFTOQUINONAS CITOTÓXICAS

Nos pareció también interesante sintetizar naftoquinonas fusionadas a anillos furánicos con grupos dadores de puente de hidrógenos. Decidimos preparar un conjunto de 2-amino-furano-1,4-naftoquinonas mediante una reacción de tres componentes siguiendo una metodología modificada descrita por Teimouri (2008).

Así la reacción de 2-hidroxinaftoquinona con varios aldehídos en presencia de EDDA, e isonitrilos alifáticos y aromáticos bajo condiciones de reflujo en tolueno proporcionó los correspondientes derivados heterocíclicos (Jiménez-Alonso, 2011). La síntesis de furano-naftoquinonas lineales puede ser racionalizada por la formación del intermedio reactivo tipo metilén quinona (A) a través de la condensación de Knoevenagel de la hidroxinaftoquinona con un aldehído. El siguiente paso de este mecanismo involucra una reacción de cicloadición [4+1] del heterodieno del aducto (A) con el isonitrilo para dar lugar una iminolactona intermedia (B). La subsecuente isomerización de la iminolactona intermedia (B) lleva a la formación del derivado furánico deseado. Los rendimientos y tiempos de reacción se vieron altamente favorecidos por el uso de EDDA.

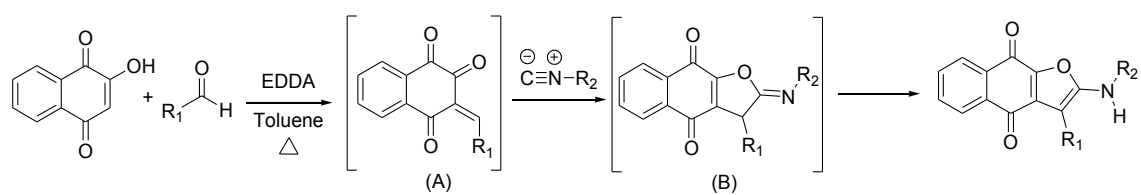


Figura 11. Síntesis de 2-amino-furanonaftoquinonas a partir de una reacción de 3-componentes.

Buenos rendimientos se consiguieron tanto con aldehidos aromáticos como alifáticos. El peor rendimiento (57%) resultó de la combinación del impedido tert-butil isonitrilo con benzaldehído (tabla 6).



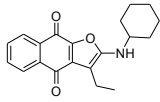


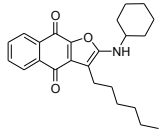


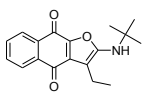


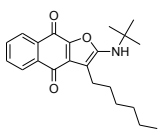


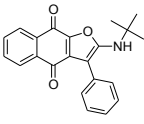


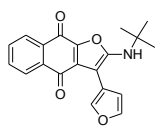


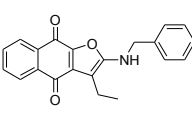


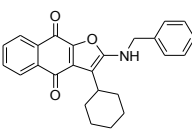
Entrada	Aldehído	Isonitrilo	Producto	Rto (%)
1				77
2				94
3				90
4				79
5				57
6				96
7				89
8				97

Tabla 6. Rendimientos obtenidos en la preparación de 2-amino-furanonaftoquinonas

Un intenso efecto solvatocrómico fue detectado durante la manipulación de los compuestos obtenidos con diferentes disolventes y todos los productos fueron aislados como sólidos amorfos de color azul. Los compuestos **1-8** fueron ensayados frente a las siguientes líneas tumorales: MCF 7, MCF7/BUS y SK-BR-3 (Tabla 7). Los compuestos **4, 6 y 8** mostraron los mejores valores. El compuesto **4** mostró selectividad hacia la línea celular hormona dependiente MCF7/ BUS con un valor de GI₅₀ de 9,2 µM. Los compuestos **6 y 8** presentaron buenas citotoxicidades frente a las líneas celulares MCF7, MCF7/BUS y SK-BR-3. El mejor valor de GI₅₀ lo mostró el compuesto **6** frente a la línea SK-BR-3 (GI₅₀= 1,6 µM).

Tabla 7. Actividad citotóxica de los compuestos (**1-8**) frente a un representativo panel de líneas celulares de cáncer de pecho.^a

Comp	MCF7	MCF7/BUS	SK-BR-3
1	18,8 (± 0,07)	12,1 (± 0,6)	10,2 (± 0,3)
2	29,8 (± 0,4)	15,2 (± 0,4)	14,6 (± 0,5)
3	29,9 (± 1,3)	17,9 (± 0,4)	24,5 (± 1,5)
4	22,2 (± 1,2)	9,22 (± 0,4)	22,9 (± 2,0)
5	82,0 (± 2,5)	95,2 (± 0,9)	87,8 (± 2,4)
6	5,9 (± 0,4)	2,8 (± 0,5)	1,6 (± 0,4)
7	19,4 (± 0,4)	17,4 (± 0,6)	14,1(± 0,3)
8	7,6 (± 0,4)	3,9 (± 0,07)	5,8 (± 0,6)

^a Valores de GI₅₀ expresados en µM y determinados como media de dos a 5 repeticiones; desviaciones estándar son dadas entre paréntesis.

A las naftoquinonas obtenidas se le realizaron estudios de voltametría cíclica en DMF usando tetrabutil amonio hexafluorofosfato como electrolito soporte. Como se esperaba esas moléculas exhibieron dos ondas, la primera es la relacionada con el par Quinona/ Semiquinona anión radical (Q^{•-}), mientras que la segunda es la relacionada con la Quinona semiradical, quinona dianión. Siendo la Q/Q²⁻ reversible y la Q^{•-}/Q²⁻ cuasi reversible.

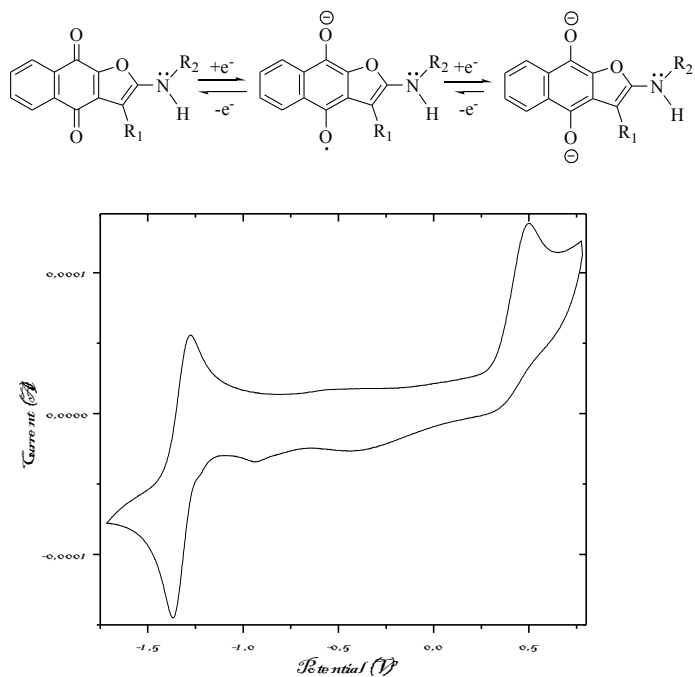


Figura 11. Voltagrama cíclico de la quinona **3** (onda I: Q/Q•⁻, onda II: Q•⁻/Q²⁻). [Q] = 1,0 mM in DMF/HFPTBA (0,1 M); 25 °C; $\nu = 0,1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$.

Tabla 8. Parámetros voltamétricos de los compuestos 1-8 vs. Fc/Fc ⁺ .	Onda I					Onda II
	E _a ^I (V)	E _c ^I (V)	ΔE ^I (V)	E _{1/2} ^I (V)	I _a /I _c ^I	E _a ^{II} (V)
1	-1,2977	-1,3903	0,092 6	-1,3440	0,86	0,4134
2	-1,3017	-1,3780	0,076 4	-1,3398	0,80	0,3987
3	-1,2779	-1,3742	0,096 3	-1,3260	0,98	0,4246
4	-1,2606	-1,3891	0,128 5	-1,3248	0,90	0,4392
5	-1,2523	-1,3379	0,085 6	-1,2951	0,96	0,4610
6	-1,2018	-1,3030	0,101 2	-1,2524	0,71	0,4660
7	-1,2432	-1,3635	0,120 2	-1,3033	0,55	0,4767
8	-1,2339	-1,3621	0,128 2	-1,2980	0,62	0,4070

[Q] = 1,0 mM in DMF/HFPTBA 0,1 M; 25 °C; $\nu = 0,1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$.

De acuerdo a esos resultados, los derivados con la mayor deslocalización electrónica presentan los potenciales de reducción más altos y las actividades citotóxicas mayores frente a las líneas celulares estudiadas.

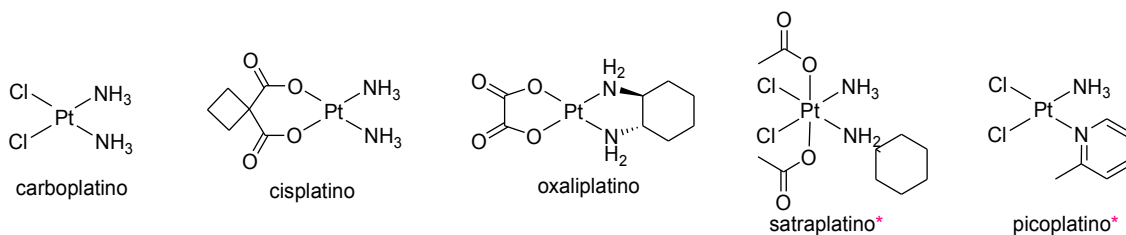
Altos potenciales de reducción facilitan la formación de semiquinona y por tanto el paso inicial de bio-reducción descrito en muchos mecanismos de acción citotóxicos de naftoquinonas. Además, la influencia del oxígeno observado en los voltagramas cíclicos apoya la importancia de este factor previamente reportado, así como el mecanismo de acción relacionado con especies reactivas de oxígeno.

Además, derivados con valores de $E_{1/2} > -1,250$ V son muy susceptible de mostrar actividad citotóxica frente a las líneas celulares MCF7, MCF7/BUS y SK-BR-3. Aunque la relación entre los potenciales redox de estos compuestos y la citotoxicidades es clara, no fue posible determinar una inequívoca y lineal correlación entre los potenciales redox y las citotoxicidades de esos compuestos, lo cual señala la importancia de otros factores tales como estérico, lipofílico, etc. en la citotoxicidad in vitro de estos compuestos.

5. COMPLEJOS METÁLICOS DE NAFTOQUINONAS

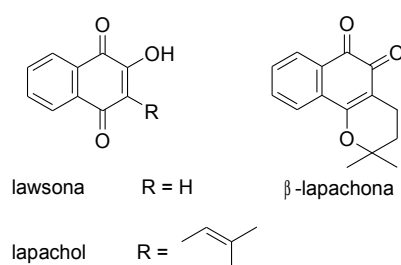
La importancia de los fármacos basados en metales de transición (transition-metal-based drugs) está aumentando en el tratamiento del cáncer y otras enfermedades (Kelland, 2007 y Guo, 1999). Los metales suelen utilizarse con el objetivo principal de organizar los ligandos orgánicos tridimensionalmente, ya que proporcionan un mayor número de geometrías de coordinación para la generación de diversidad molecular. Los metales de transición son interesantes para esta aplicación ya que pueden coordinar con un buen número de ligandos y presentar geometrías, más allá de la lineal (hibridación sp), la trigonal plana (hibridación sp^2) y la tetraédrica (hibridación sp^3) del carbono.

Los complejos de metales de transición del grupo del platino y de los metales esenciales (oligoelementos) son prometedores en el desarrollo de nuevos agentes anticancerígenos. El éxito de *cis*-diamino-dicloro-platino (II) (cisplatino), *cis*-diamino-(ciclobutano-1,1-dicarboxilato)-platino (II) (carboplatino) y [ciclohexano-1,2-diamino-*N,N'*-oxalato(2-)-*O,O'*]-platino (II) (oxaliplatino) en el tratamiento de distintos tipos de cáncer respaldan esta teoría (Teicher et al, 2008).

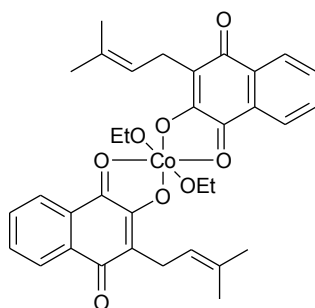


Fármacos de platino utilizados actualmente y próximos a aprobarse*.

Las naftoquinonas, como lawsona, lapachol y β -lapachona, poseen muchas actividades biológicas (Sauriasari, 2007) y se han utilizado en medicina tradicional para tratar diversos tipos de tumores. Estas naftoquinonas son capaces de complejarse con muchos iones metálicos relevantes, lo que les permite jugar un papel importante en los sistemas biológicos (Gokhale, 2000). Trabajos anteriores han revelado que la formación de los complejos metálicos, es una forma de aumentar la citotoxicidad (Kumbhar, 1996 y Shirishal, 2007).



Teniendo en cuenta que los complejos de transición del grupo del platino y de los metales esenciales (oligoelementos) son prometedores en el desarrollo de nuevos agentes anticancerígenos, así como las propiedades antitumorales de las quinonas, nos propusimos la síntesis de complejos de Co(II), Ni(II) y Cu(II) de lapachol (Hernández-Molina, 2007). La síntesis de los complejos se llevó a cabo mezclando la disolución etanólica de la quinona con la del correspondiente acetato del metal. La reacción se lleva a cabo de forma rápida, obteniéndose el complejo como un producto rojo y, en muchos casos, altamente cristalino. De esta forma se obtienen los complejos de lapachol con cobalto $[\text{CoLp}_2(\text{EtOH})_2]$, cobre $[\text{CuLp}_2\text{py}_2]$ y níquel $[\text{NiLp}_2(\text{EtOH})_2]$ en una relación metal/ligando (M/L) (1:2). La síntesis es rápida y da buenos rendimientos. Los complejos resultaron ser poco solubles en alcoholes por lo que precipitaban nada más formarse.



Complejo de lapachol y cobalto(II); $[\text{CoLp}_2(\text{EtOH})_2]$.

Se evaluó la actividad *in vitro* del complejo de lapachol con Co(II) $[\text{CoLp}_2(\text{EtOH})_2]$ frente a una cepa de *Acanthamoeba* (*A. castellanii* Neff) y *Leishmania amazonensis*, MHOM/BR/77/LTB0016, resultando activo frente a estas dos cepas ($\text{IC}_{50}/96\text{h}=61,84\pm 5,19$

µg/mL). El ensayo usado para la determinación de la eficacia del complejo frente a *L. amazonensis* y *Acanthamoeba castellanii* Neff se basa en la oxido-reducción del Alamar Blue® (Martín-Navarro, 2010).

6. REFERENCIAS

Amatore, C. In: *Organic Electrochemistry*; Lund, H., Hammerich, O., (eds.); Marcel Dekker, Inc.: New York, **2001**; p 1.

Bard, A. J.; Faulkner, R. L. In: *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*; John Wiley and Sons: New York, **2003**.

Begleiter, A.; Leith, M. K., Activity of Quinone Alkylating Agents in Quinone-resistant Cells, *Cancer Res.*, **1990**, *50*, 2872–2876.

Bhar, S.; Ramana, M. M., *J. Org. Chem.*, Novel Domino Reactions for Diterpene Synthesis, **2004**, *69*, 8935-8937.

Burke, M. D.; Schreiber L. S., A Planning Strategy for Diversity-Oriented Synthesis, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 46.

Campos-Takaki, G. M.; Steiman, R.; Seigle-Murandi, F.; Silva, A. A.; Bieber, L., Effect of medium composition on the antifungal susceptibility tests to lapachol, β-lapachone, phthiocol and its synthetic analogs, *Rev. Microbiol.*, **1992**, *23*, 106–111.

Chambers, J. Q. In: *The Chemistry of the Quinonoid Compounds*. Patai, S.; Rappoport, Z. (eds.); Wiley, New York, **1988**; vol. II, ch. 12, pp. 719.

Costantino, L.; Barlocco, D., Privileged Structures as Leads in Medicinal Chemistry, *Curr. Med. Chem.*, **2006**, *13*, 65–85.

DeSimone, R. W.; Currie, K. S.; Mitchell, S. A.; Darrow, J. W.; Pippin, D. A., Privileged Structures: Applications in Drug Discovery, *Comb. Chem. High T. Scr.*, **2004**, *7*, 473–491.

Estévez-Braun, A.; Pérez-Sacau, E.; Ravelo, A. G.; Yapu, D. G.; Turba, A. G., Antiplasmodial Activity of Naphthoquinones related to Lapachol and β- Lapachone, *Chem. Biodiversity*, **2005**, *2*, 264–274.

Estévez-Braun, A.; Ravelo, A.G.; *et al.*, "Triterpenequinone and triterpenephenol derivatives and their application for the treatment of tumors and diseases" (PCT/EP2006/070276).

Ferreira, V.C.; Coutada, L.C.; Pinto, .C.F.R.; Pimto, A.V., A novel synthesis of □and □pyran naphthoquinone tetracyclic., *Synthetic Comun.*, **1982**, *12*, 195-1999.

Ferreira, D. C.; Jaouen, G.; Goulart, M. O. F.; Amatore, C., Electrochemical parameters and techniques in drug development, with an emphasis on quinones and related compounds, *Chem. Commun.*, **2008**, *23*, 2612–2628.

Gokhale, N.; Padhye, S.; Newton, C.; Pritchard, R., Hydroxynaphthoquinone Metal Complexes as Antitumor Agents X: Synthesis, Structure, Spectroscopy and *In Vitro* Antitumor Activity of 3-Methyl-Phenylazo Lawsone Derivatives and Their Metal Complexes Against Human Breast Cancer Cell Line MCF-7, *Metal-Based Drugs*, **2000**, *7*, 121-128.

- Gottesman, M. M.; Fojo, T.; Bates, S. E., Multidrug Resistance in Cancer: Role of ATP-Dependent Transporters, *Nat. Rev. Cancer*, **2002**, *2*, 48-58.
- Guo, Z.; Sadler, P. J., Metals in Medicine, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, *38*, 1512-1531.
- Hammerich, O.; Svensmark, B. In: *Organic Electrochemistry*. Lund, H.; Baizer, M. M., (eds.), Marcel Dekker: New York, 3rd ed., **2001**, p 95.
- Haraguchi, H.; Yokohama, K.; Oike, S.; Ito, M.; Nozaki, H., Respiratory stimulation and generation of superoxide radicals in *Pseudomonas aeruginosa* by fungal naphthoquinones, *Arch. Microbiol.*, **1997**, *167*, 6-10.
- Hernández-Molina, R.; Kalinina, I.; Esparza, P.; Sokolov, M.; González-Platas, J.; Estévez-Braun, A.; Pérez-Sacau, E., Complexes of Co(II), Ni(II) and Cu(II) with lapachol, *Polyhedron*, **2007**, *26*, 4860-4864.
- Higgins, C. F., ABC transporters: from microorganisms to man, *Annu. Rev. Cell. Biol.* **1992**, *8*, 67-113.
- Hillard, E. A.; Caxico de Abreu, F.; Melo Ferreira, D. C.; Jaouen, G.; Goulart, M. O. F.; Amatore, C., *Chem. Comm.*, **2008**, 2612-2628.
- Hui, Y.; Khim Chng, E. L.; Lin Chng, C. Y.; Poh, H. L.; Webster, R. D., Hydrogen-Bonding Interactions between Water and the One- and Two-Electron-Reduced Forms of Vitamin K1: Applying Quinone Electrochemistry To Determine the Moisture Content of Non-Aqueous Solvents, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 1523-1534.
- Jiménez-Alonso, S.; Estévez-Braun, A.; Ravelo, A. G.; Zárate, R.; Lopez, M., Double Domino Knoevenagel Hetero Diels-Alder strategy towards bis-pyrano-1,4-benzoquinones, *Tetrahedron*, **2007**, *63*, 3066-3074.
- Jiménez-Alonso, S.; Chávez-Orellana, H.; Estévez-Braun, A.; Ravelo, A. G.; Ferensin, G.; Tapia, A., An efficient synthesis of embelin derivatives through domino Knoevenagel hetero Diels-Alder reactions under microwave irradiation, *Tetrahedron*, **2008**, *64*, 8938-8942.
- Jiménez-Alonso, S.; Chávez-Orellana, H.; Estévez-Braun, A.; Ravelo, A. G.; Pérez-Sacau, E.; Machín, F., Design and Synthesis of a Novel Series of Pyranonaphthoquinones as Topoisomerase II Catalytic Inhibitors, *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 6761-6772.
- Jiménez-Alonso, S.; Perez-Lomas, A. L.; Estévez-Braun, A.; Muñoz-Martínez, F.; Chávez-Orellana, H.; Ravelo, A. G.; Gamarro, F.; Castanys, S.; Lopez, M., Bis-pyranobenzoquinones as a New Family of Reversal Agents of the Multidrug Resistance Phenotype Mediated by p-Glycoprotein in Mammalian Cells and the Protozoan Parasite *Leishmania*, *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 7132-7143.
- Jiménez Alonso, S.; Guash, J.; Estévez-Braun, A.; Ratera, I.; Veciana, J.; Ravelo, A.G., Electronic and cytotoxic properties of 2-amine-naphtho[2,3-b]-furan-4,9-diones., *J. Org. Chem.*, **2011**, *76*, 1634-1643.
- Kaiser, M.; Kumar, K.; Waldmann, H., Biology-inspired synthesis of compound libraries, *Cell. Mol. Life. Sci.*, **2008**, *65*, 1186-1201.
- Kelland, L., The Resurgence of Platinum-based Cancer Chemotherapy, *Nature Rev. Cancer*, **2007**, *7*, 573-584.
- Klokouzas, A.; Shahi, S.; Hladky, S. B.; Barrant, M. A.; Van Veen, H. W., ABC transporters and drug resistance in parasitic protozoa, *Int. J. Antimicrob. Agents.*, **2003**, *22*, 301-317.
- Kumbhar, A.; Padhye, S.; Ross, D., Cytotoxic properties of iron-hydroxynaphtho-quinone complexes in rat hepatocytes, *BioMetals*, **1996**, *9*, 235-240.
- Liu, K.C.; Li, J.; Sakya, S., Synthetic Approaches to the 2003 New Drugs, *Mini Rev. Med. Chem.*, **2004**, *4*, 1105-1125.

Longley, D. B.; Dei, S.; Gualtier, F., The medicinal chemistry of multidrug resistance (MDR) reversing drugs, *Il Farmaco*, **2002**, *57*, 385-415.

Martín-Navarro, C. M.; López-Arencibia, A.; Lorenzo-Morales, J.; Oramas-Royo, S.; Hernández-Molina, R.; Estévez-Braun, A.; Ravelo, A. G.; Valladares, B.; Piñero, J. E., *Acanthamoeba castellanii* Neff: *In vitro* activity against the trophozoite stage of a natural sesquiterpene and a synthetic cobalt(II)-lapachol complex, *Exp. Parasitol.*, **2010**, *126* (1), 106-108.

Mironov, M. A., Design of Multi-Component Reactions: From Libraries of Compounds to Libraries of Reactions, *QSAR Comb. Sci.*, **2006**, *25* (6), 423-431.

Muller, M. T.; Helal, K.; Soisson, S.; Spitzner, J. R., A rapid and quantitative microtiter assay for eukaryotic topoisomerase II, *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 9499-9503.

O'Brien, P.J., Molecular mechanisms of quinine cytotoxicity, *Chem. Biol. Interactions*, **1991**, *80*, 1-41.

Ogawa, M.; Koyanagi, J.; Sugaya, A.; Tsuda, T.; Ohguchi, H.; Nakayama, K.; Yamamoto, K.; Tanaka, A., Cytotoxic Activity toward KB Cells of 2-Substituted Naphtho[2,3-*b*]furan-4,9-diones and Their Related Compounds, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2006**, *70*, 1009-1012.

Oullette, M.; Legare, D.; Papadopoulou, B., Multidrug resistance and ABC transporters in parasitic protozoa, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **2001**, *2*, 201-206.

Oramas-Royo, S.; Chávez, H.; Martín-Rodríguez, P.; Fernández-Pérez, L.; Ravelo, A.G.; Estévez-Braun, A. Cytotoxic triterpenoids from *Maytenus retusa*. *J. Nat. Prod.* 2010, *73*, 2029-2034.

Pérez-Victoria, J. M.; Pérez-Victoria, F. J.; Parodi-Talice, A.; Jiménez, I. A.; Ravelo, A. G.; Castanys, S.; Gamarro, F., Alkyl-lysophospholipid resistance in multidrug-resistant *Leishmania tropica* and chemosensitization by a novel P-glycoprotein-like transporter modulator, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2001**, *45* (9), 2468-2474.

Pérez-Victoria, J. M.; Pérez-Victoria, F. J.; Parodi-Talice, A.; Bavchvaror, B. I.; Pérez-Victoria, F. J.; Muñoz-Martínez, F.; Maitrejean, M.; Costi, M. P.; Barron, D.; Di Pietro, A.; Castanys, S.; Gamarro, F., Combination of Suboptimal Doses of Inhibitors Targeting Different Domains of LtrMDR1 Efficiently Overcomes Resistance of *Leishmania* spp. to Miltefosine by Inhibiting Drug Efflux. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2006**, *50* (9), 3102-3110.

Powis, G., Metabolism and reactions of quinoid anticancer agents, *Pharmacol. Ther.*, **1987**, *35*, 57-152.

Powis, G., *Free Rad. Biol. Med.*, Free radical formation by antitumor quinones, **1989**, *6*, 63-101.

Ramón, D. J, Yus, M., Asymmetric Multicomponent Reactions (AMCRs): The New Frontier, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, *44*, 1602-1634.

Ravelo, A. G.; Estévez-Braun, A.; Chávez-Orellana, H.; Pérez-Sacau, E.; Mesa-Siverio, D., Recent Studies on Natural Products as Anticancer Agents, *Curr. Top. Med. Chem.*, **2004**, *4*, 241-265.

Sauriasari, R.; Wang, D.-H.; Takemura, Y.; Tsutsui, K.; Masuoka, N.; Sano, K.; Horita, M.; Wang, B.-L.; Ogino, K., Cytotoxicity of lawsone and cytoprotective activity of antioxidants in catalase mutant *Escherichia coli*, *Toxicology*, **2007**, *235*, 103-111.

Schinkel, A. H.; Jonker, J. W., Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2003**, *55*, 3-29.

Shiah, S. G.; Chuang, S. E.; Chau, Y. P.; Shen, S. C.; Kuo, M. L., Activation of c-Jun NH₂-terminal Kinase and Subsequent CPP32/Yama during Topoisomerase Inhibitor β -Lapachone-induced Apoptosis through an Oxidation-dependent Pathway, *Cancer Res.*, **1999**, *59*, 391-398.

Shirisha, K.; Patole, J.; Padhye, S.; Sinn, E.; Shishodia, S.; Aggarwal, B.B., Copper Complexes of Henna-Sulforaphane Conjugates as Potent Antiproliferative Agents Against Human Myeloma KBM-5 Cells Through Blockade of Transcription Factor NF- κ B, *Lett. Drug Design & Discov.*, **2007**, *4*, 257-262.

Spitzner, J. R.; Chung, I. K.; Muller, M. T., Eukaryotic topoisomerase II preferentially cleaves alternating purine-pyrimidine repeats, *Nucleic Acids Res.*, **1990**, *18*, 1-11.

Stahl, P.; Kissan, L.; Mazitschek, R.; Giannis, A.; Waldmann, H., Natural Product Derived Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors: Identification of IGF1R, Tie-2, and VEGFR-3 Inhibitors, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 1174-1178.

Sun, J. S.; Geiser, A. H.; Frydman, B., A preparative synthesis of lapachol and related naphthoquinones, *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39* (45), 8224-8225.

Teimouri, M. B.; Khavasi, H. R. 1-pot 3-component regioselective synth linear naphtho[2,3-b]-furan-4,9-diones, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 10269-10275

Teicher, B. A., Newer Cytotoxic Agents: Attacking Cancer Broadly, *Clin. Cancer Res.*, **2008**, *14* (6), 1610-1617.

Tietze, L. F.; Beifub, U. *In Comprehensive Organic Synthesis*; Trost, B. M., (eds.); Pergamon: New York, NY, **1991**; Vol. 2.

Thomas, H.; Coley, H. M., Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein, *Cancer Control*, **2003**, *10*, 159-165.

Thurnauer, M. C.; Brown, J. W.; Gast, P. and Feezel, L. L., EPR studies of the vitamin K1 semiquinone radical anion. Comparison to the electron acceptor A1 in green plant photosystem I, *Radiat. Phys. Chem.*, **1989**, *34*, 647-651.

Tietze, L. F., Domino Reactions in Organic Synthesis, *Chem. Rev.*, **1996**, *96*, 115-136.

Tietze, L. F.; Rackelmann, N., Domino reactions in the synthesis of heterocyclic natural products and analogs, *Pure Appl. Chem.*, **2004**, *76*, 1967-1984.

Ugi, I.; Dömling, A.; Hörl, W., Multicomponent Reactions in Organic Chemistry, *Endeavour*, **1994**, *18* (3), 115-122.

Van der Est, A., Light-induced spin polarization in type I photosynthetic reaction centres, *Biochim. Biophys. Acta*, **2001**, *1507*, 212-225.

Varma, R. S., Solvent-free organic syntheses, Using supported reagents and microwave irradiation, *Green Chem.*, **1999**, *1*, 43-55.

Wardman, P. In: *Selective Activation of Drugs by Redox Processes*; Adams, G. E., Breccia, A., Fielden, E. M., Wardman, P. (eds.); Plenum Press: New York, **1990**; p 110.

Waris, G.; Ahsan, H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions., *J. Carcinog.*, **2006**, *5*:14

Yang, H.; Landis-Piwowar, K. R.; Lu, D.; Yuan, P.; Li, L.; Prem-Veer Reddy, G.; Yuan, X.; Dou, Q. P., Pristimerin induces apoptosis by targeting the proteasome in prostate cancer cells, *J. Cell. Biochem.*, **2008**, *103*, 234-244.

Zhu, J.; Bienaymé, H. *Multicomponent Reactions*; Wiley-VCH: Weinheim, **2005**.

7. **AGRADECIMIENTOS:** Al ICIC y al MICINN (Proyectos SAF 2006-06720 y SAF 2009-13296-C02-01) la financiación. SO, GG, y RP al Gobierno Autónomo, SJA al MICINN, PQE al Gobierno de Chile la concesión de las correspondientes becas predoctorales. A los investigadores por la colaboración prestada en los ensayos biológicos: D. Gutiérrez, A. G. Turba, F. Machín, A. L. Pérez-Lomas, F. Muñoz M., F. Gamarro, S. Castanys, C.M. Martín-

Diseño y síntesis de derivados quinónicos mediante reacciones dominó y formación de complejos metálicos. Actividad citotóxica, antitopoisomerasa II y anti-MDR.

Navarro, A. López-Arencibia, J. Lorenzo, B. Valladares, J.E. Piñero, P. Martín R. y L. Fernandez P.