

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto de Tecnología Química (UPV-CSIC)

Departamento de Química



**Estudios Semisintéticos y Biológicos de 20-(S)-
Camptotecina en Terapia Antitumoral y Obtención de
Materiales Porosos en Condiciones Biomiméticas**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Guillermo Rodríguez Berna

Dirigida por:

Prof. Avelino Corma Canós

Dra. M^a José Díaz-Cabañas

Valencia, Enero de 2016

D. AVELINO CORMA CANÓS, profesor de investigación del CSIC en el Instituto de Tecnología Química (UPV-CSIC) y Dña. M^a JOSE DÍAZ CABAÑAS, científico titular en el Instituto de Tecnología Química (UPV-CSIC),

CERTIFICAN: Que la presente tesis doctoral, titulada: “**Estudios semisintéticos y biológicos de 20-(S)-Camptotecina en terapia antitumoral y obtención de materiales porosos en condiciones biomiméticas**”, ha sido realizada por GUILLERMO RODRÍGUEZ BERNA, bajo su dirección, en el Instituto de Tecnología Química (UPV-CSIC) de la Universidad Politécnica de Valencia

D. Avelino Corma

Dña. M^a José Díaz

Esta tesis doctoral ha sido realizada en el Instituto de Tecnología Química (UPV-CSIC) bajo la dirección del Prof. Avelino Corma, a quien quiero agradecer sus enseñanzas, su apoyo incondicional al permitirme trabajar en las líneas de investigación desarrolladas y su infinita paciencia y confianza en mi trabajo.

De igual modo quiero agradecer a la Dra. M^a José Díaz su predisposición para ayudarme siempre que la he necesitado, sus consejos y su contribución a mi formación.

A la Dra. Amparo Misfud, al Dr. Vicente Fornés y al Prof. Jaime Primo por su ayuda, amabilidad y cercanía durante muchos años.

Me gustaría agradecer a la Dra. Marta González y la Dra. Isabel González de la UMH, su inestimable colaboración en esta tesis, su apoyo y todo lo que me han enseñado dentro del campo de la farmacéutica.

Del mismo modo al Dr. Manuel Hidalgo del CNIO y a la Dra. Marisol Quintero por su interés y participación en la línea de investigación químico-médica.

I would like to thank Dr. Ouerfelli for giving me the opportunity to work in his group at MSKCC and everyone from the organic core facilities to make my stay in the city an unforgettable personal and professional experience.

Quiero agradecerle al Dr. Plácido Ceballos todo lo que me ha enseñado, desde mis comienzos en la UAM hasta la actualidad, sus valiosos consejos y sus respuestas a todas mis dudas a lo largo de este tiempo. Pero por encima de todo esto, su incondicional amistad.

A Violeta, por haber compartido aquella etapa de la vida conmigo, porque no podría haber tenido mejor compañera de viaje.

A todos mis compañeros que están o han pasado por el ITQ con los que he tenido el placer de trabajar, aprender y compartir experiencias. Los mismos que siempre me han mostrado su amabilidad, prestado su ayuda y recordaré como excelentes investigadores y mejores personas.

A Faber, Larisha, Sonia, Edurne, Paula, Fran, Miguel, Rebeca, Dani por los buenos ratos compartidos entre bromas, risas e inolvidables anécdotas.

A mis compañeros de laboratorio Judit, Nacho y Paula con quienes ha sido un placer compartir tantas horas de trabajo que habrían sido menos llevaderas sin su presencia.

A Mayte por formar parte de mi vida, por su apoyo y comprensión en los malos momentos y hacer posibles e inolvidables los buenos.

Mi más profundo agradecimiento a mi madre, porque su entereza en los momentos más difíciles, su nobleza y su capacidad de sacrificio son un ejemplo para mí. Muchas gracias por estar siempre ahí.

*A mi padre,
que allá donde esté, espero que se sienta orgulloso de mí.*

INDICE

PROLOGO

ABREVIATURAS Y ACRONIMOS

PARTE I

INTRODUCCION

1. Antitumorales de origen natural	1
2. 20-(S)-Camptotecina	4
3. El equilibrio estructural de la Camptotecina	7
4. Mecanismo de acción	
4.1 Topoisomerasas	11
4.2 El complejo ternario reversible: Topoisomerasa I-ADN-CPT	14
5. Estudios sintéticos de Camptotecina	18
6. Relación entre la estructura y la actividad	26
6.1 Modificaciones en la quinolina (anillos A y B)	27
6.2 Modificaciones en los anillos C y D	31
6.3 Modificaciones en el anillo E	33
7. Estudios semisintéticos para la obtención de derivados de Camptotecina	
7.1 Reactividad de la posición 10	37
7.2 Reactividad de las posiciones 5 y 14	39
7.3 Reactividad del anillo de lactona	40
7.4 Reactividad de la posición 7	42
7.5 Reactividad de la posición 9	47

8. Aspectos farmacocinéticos	51
8.1 Farmacocinética de la CPT	54
OBJETIVOS	56
RESULTADOS Y DISCUSION	
1. Derivados 9-amidometilicos y 9-imidometilicos de Camptotecina	57
1.1 Estudios <i>in vitro</i> de actividad antitumoral. Relación estructura/actividad	62
1.2 Actividad antitumoral <i>in vivo</i>	64
1.3 Ensayos <i>in vitro</i> de biodisponibilidad oral	66
2. Derivado hexacíclico 9, 10-[1,3]-Dioxinocamptotecina	70
2.1 Estudios <i>in vitro</i> de actividad antitumoral	73
2.2 Ensayos <i>in vitro</i> de biodisponibilidad oral	74
2.3 Ensayos <i>in situ</i> de permeabilidad	77
CONCLUSIONES	78
PARTE EXPERIMENTAL	
1. Métodos generales	80
1.1 Síntesis y caracterización de productos	81
2. Ensayos biológicos	
2.1 Estudios de citotoxicidad	95
2.2 Estudios <i>in vivo</i>	97
2.3 Estudios de permeabilidad <i>in vitro</i>	98
2.4 Estudios de permeabilidad <i>in situ</i>	100

PARTE II

INTRODUCCION

1. El silicio en los seres vivos	102
2. Materiales porosos. Zeolitas y compuestos mesoestructurados	110
3. Síntesis de materiales porosos	115
3.1 El proceso sol-gel	116
3.2 Síntesis propuesta para la MCM-41	119
4. Actividad catalítica de materiales porosos	121

OBJETIVOS	126
------------------	-----

RESULTADOS Y DISCUSION

1. Hidrólisis y condensación de la fuente de silicio	127
2. Síntesis y caracterización de los materiales	131
3. Actividad catalítica de los materiales	134

CONCLUSIONES	137
---------------------	-----

PARTE EXPERIMENTAL

1. Métodos generales	138
2. Ensayos catalíticos	139
3. Técnicas de caracterización	
3.1 Difracción de rayos X	140
3.2 Análisis Termogravimétrico	141
3.3 Análisis textural	142
3.4 Resonancia Magnética Nuclear de ²⁹ Si	143
3.5 Espectroscopia infrarroja	145
3.6 Espectroscopia electrónica de transmisión (TEM)	147
3.7 Análisis elemental	148

CONCLUSIONES GENERALES	150
RESUMENES	153
PUBLICACIONES Y PATENTES	159

La presente memoria de Tesis Doctoral consta de dos partes que abarcan los campos de la química médica y la síntesis de materiales respectivamente. Cada una de ellas incluye una introducción general de los temas principales desarrollados, un apartado de resultados y discusión y una parte experimental.

El trabajo desarrollado en la Parte I pertenece al área de la química orgánica y farmacéutica y está encaminado hacia la obtención de nuevos derivados del antitumoral 20-(S)-Camptotecina y sus estudios biológicos. Siendo fruto de la colaboración con el Dept. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la U. Miguel Hernández y el Dept. de Investigación Clínica de Tumores Digestivos del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO).

El trabajo recogido en la Parte II, centrado en la investigación interdisciplinar entre la biología y la ciencia de los materiales, estudia la obtención de compuestos micro- y mesoporosos en condiciones biomiméticas y sus propiedades catalíticas.

10HCPT	10-hidroxicamptotecina
AcOH	Acido acético
ADS	Agente director de estructura o “template”
AIPO	Aluminofosfatos
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Acido aspártico
ASH	Albúmina sérica humana
ATD	Análisis térmico diferencial
BET método	Metodología propuesta por Brunauer, Emmet y Teller para la determinación de áreas superficiales y volúmenes de monocapas
BNP-1350	Karenitecin [®] , derivado de 20-(S)-Camptotecina
CCNSC	Cancer Chemotherapy National Service Center
CDiox	9, 10-[1,3]-Dioxocamptotecina
CDK-602	Belotecan [®] , derivado de 20-(S)-Camptotecina
CPT	20-(S)-Camptotecina
CTMA	Bromuro de cetilamina
DB67	7-(tert-butildimetilsilil)-10-hidroxicamptotecina
DMF	Dimetilformamida
Fa	Fracción oral absorbida
FCC	Fluid-Catalytic-Cracking
HMTA	Hexametilentetramina
<i>In situ</i>	Técnica para realizar un determinado experimento sobre un animal vivo anestesiado
<i>In vitro</i>	Técnica para realizar un determinado experimento en un ambiente controlado fuera de un organismo vivo
<i>In vivo</i>	Técnica para realizar un experimento en un animal vivo o en un tejido vivo de un animal vivo
Ka	Coefficiente de absorción

MTT ensayo	Ensayo colorimétrico basado en la reducción del bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
MVP	Reacción de Meerwein-Ponndorf-Verley
Pab	Permeabilidad en sentido apical-basal, sentido absortivo
Pba	Permeabilidad en sentido basal-apical, sentido secretorio
Peff	Permeabilidad efectiva
SAPO	Silicoaluminofosfato
SAz	Azida sódica
SN38	7-etil-10-hidroxicamptotecina
TBA	Bromuro de tetrabutilamina
T-E	Reacción de Tscherniac-Einhorn
TEA	Bromuro de tetraetilamina
TEBAC	Cloruro de benciltrietilamonio
TEOS	Tetraetilortosilicato
TMOS	Tetrametilortosilicato
TPA	Bromuro de tetrapropilamina

**Parte I. Estudios Semisintéticos y Biológicos de 20-(S)-Camptotecina
en Terapia Antitumoral**

INTRODUCCION I

1. Antitumorales de origen natural

Se entiende por productos o compuestos de origen natural a los producidos por bacterias, microorganismos, animales, plantas u organismos marinos.¹

Los productos naturales han sido una fuente importante de agentes terapéuticos. Más de la mitad de los fármacos que actualmente se encuentran en el mercado son de origen natural y más concretamente, en el caso del cáncer, esta proporción supera el 60%.¹

Esto tipo de compuestos, se han clasificado como: productos naturales, productos semisintéticos derivados de un producto natural o productos sintéticos que han empleado como modelo un compuesto de origen natural.²

La enorme biodiversidad de organismos vivos que presenta la naturaleza ha dado lugar a una variedad estructural de compuestos difícilmente comparable a la

1 Gordaliza, M. *Clin. Trans. Oncol.* **2007**, *9*, 767.

2 Cragg, G. M., Kingston, D. G. I.; Newman, D. J. *J Nat. Prod.* **2004**, *67*, 232.

que se puede obtener mediante fuentes sintéticas, presentando de esta manera actividades farmacológicas dispares y extraordinarias posibilidades terapéuticas.

Los primeros antitumorales que avanzaron hasta ensayos clínicos fueron los llamados alcaloides vinca, Vinblastina (Velban®) y Vincristina (Oncovin®), aislados de la planta *Catharanthus roseus*, que había sido empleada por varias culturas para el tratamiento de la diabetes.³ Su elevada actividad citotóxica ha permitido su administración en combinación con otros medicamentos para el tratamiento de paneles tumorales de muy amplio espectro. Estos alcaloides han demostrado un mecanismo de actuación exclusivo, deteniendo la fase M del ciclo celular.⁴

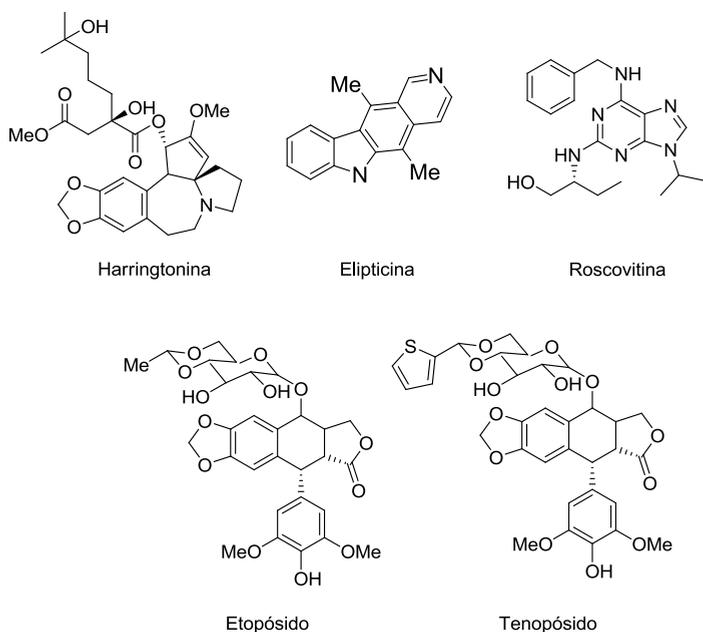


Figura 1. Agentes antitumorales de origen natural.

- 3 Cragg, G. M.; Boyd, M. R.; Cardellina, J. H.; Newman, D. J.; Snader, K. M.; Mc Cloud, T. G. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *100*, 72.
- 4 (a) Etapa celular en la que se produce la división de una célula progenitora en dos idénticas. (b) Imaizumi, M. *Lung Cancer* **2005**, *49*, 85. (c) Silva, J. S. Moura, M. D.; Oliveira, R. A. G.; Diniz, M. F. F.; Barbosa, J. M. *Phytomedicine* **2003**, *10*, 221. (d) Moura, M. D.; Silva, J. S.; Oliveira, R. A. G.; Diniz, M. F. F.; Barbosa, J. M. *Acta. Farm. Bonaerense* **2002**, *21*, 67.

En los años 50 se aisló la podofilotoxina de las raíces de la *Podophyllum notatum* y *Phodophyllum peltatum*, sin embargo sus estudios clínicos fueron rechazados por su elevada toxicidad. Posteriormente, el laboratorio Sandoz, sintetizó dos glucósidos derivados de un isómero de la podofilotoxina y sus resultados dieron lugar a la comercialización del etopósido (VP-16) y el tenipósido (VM-26)⁵ para el tratamiento de cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer testicular y diferentes linfomas.⁶

Más tarde, alcaloides como por ejemplo harringtoninas⁷ o elipticinas⁸, así como purinas trisustituidas como olomucinas o roscovitinas⁹ han demostrado actividad citotóxica en diferentes líneas tumorales.

Una de las incorporaciones más importantes al arsenal quimioterápico de los fármacos de origen vegetal son los taxanos. El Paclitaxel (Taxol®) fue inicialmente aislado de la corteza de la especie *Taxus breviflora*, aunque al igual que otros precursores clave (bacatinas), se ha encontrado en hojas y frutos del árbol *Taxus baccata*.¹⁰ Las bacatinas se pueden transformar a través de síntesis químicas en taxol y docetaxel (Taxotere®), abarcando ambos fármacos, actividades antitumorales en cáncer de pulmón, ovario, sarcoma de Kaposi, cáncer de mama, de colon y multitud de combinaciones con otros agentes terapéuticos.¹¹ El taxol, docetaxel y los derivados de las camptotecinas engloban una tercera parte de las ventas globales de los agentes antineoplásicos.¹²

5 Espinosa, E.; Zamora, P.; Feliu, J.; González, B. M. *Cancer Treat. Rev.* **2003**, *29*, 515.

6 Vann Mannen, J. M.; Retel, J.; de Vries, J.; Pinedo, H. M. *J. Nat. Cancer Inst.* **1988**, *80*, 1526.

7 Powell, R. G.; Weisleder, D.; Smith, C. R. *J. Pharm. Sci.* **1972**, *61*, 1227.

8 Cragg, G.M.; Newman, D. J.; Weiss, R. B. *Semin. Oncol.* **1997**, *24*, 156.

9 Monaco, E. A. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *56*, 635.

10 Rao, K. V. *Pharm Res.* **1993**, *10*, 521.

11 (a) Shu, Y. Z.; *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1053 (b) Nicolau, K. C.; Guy, R. C.; Potier, P. *Sci. Am.* **1996**, *64*, 5.

12 Oberlies, N. H. Kroll, D. J. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 129.

2. 20-(S)-Camptotecina

La 20-(S)-Camptotecina (CPT), ha representado uno de los grandes retos en el desarrollo y aplicación de los agentes antitumorales de origen natural en el área de la química médica.

En 1963, un proyecto financiado por el CCNSC,¹³ bajo la dirección de Monroe E. Wall y Mansukh C. Wani, aisló un alcaloide de un árbol de origen asiático denominado *Camptotheca acuminata*.¹⁴ Tras continuos procesos de extracción y purificación, los resultados biológicos del compuesto mostraron una extremada actividad antitumoral sobre líneas de leucemia L1210. En 1966, la estructura química de la CPT pudo ser confirmada por cristalografía de rayos X.^{14a}

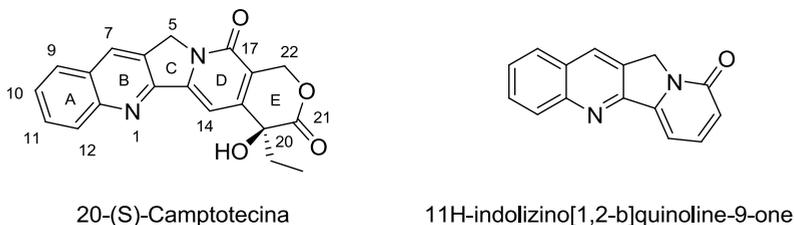


Figura 2. Estructura química de la CPT y núcleo aromático de las CPTs.

Según la nomenclatura de la IUPAC, el compuesto se definiría como, (S)-4-etil-4-hidroxi-1-H-pirano [3, 4:6,7] indolizino[1,2-b]quinolina-3,14-(4H,12H)-diona.¹⁵ La estructura pentacíclica de la CPT esta constituida por un fragmento de indolizina-[1,2-b]-quinolina (anillos A, B, C y D) fusionado con una α -hidroxilactona de seis eslabones con una configuración absoluta “S” en el carbono 20 (Figura 2).

13 Cancer Chemotherapy National Service Center, fundado en 1955, para coordinar, unificar y discutir aspectos relacionados con el descubrimiento y actividad de nuevos fármacos antitumorales.

14 (a) Wall, M. E.; Wani, M. C.; Cook, C. E.; Palmer, K. H.; McPhail, A. T.; Sim, G. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 3888. (b) Wall, M. E. *Med. Res. Rev.* **1998**, *18*, 299.

15 http://www.iupac.org/publications/ci/2003/2504/1_camptothecin.html

A pesar de los prometedores resultados *in vitro*, las dificultades en la obtención de grandes cantidades, y su elevada insolubilidad en agua, pusieron en duda las posibilidades reales del desarrollo de la CPT. Además, los primeros resultados en ensayos clínicos fueron desalentadores, ya que la necesidad de solubilizar el fármaco, llevó a su aplicación en forma de carboxilato (sal sódica),¹⁶ reduciéndose drásticamente la actividad antitumoral, mientras que los niveles de toxicidad aumentaron de forma descontrolada¹⁷ (Figura 3).

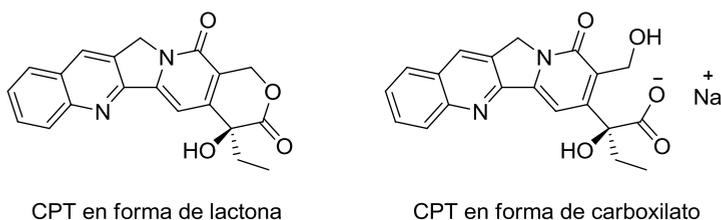


Figura 3. Camptotecina en forma de lactona y en forma de carboxilato.

La investigación sobre la CPT fue abandonada hasta el descubrimiento, en 1985, de la Topoisomerasa I como blanco de actuación del alcaloide en su actividad farmacológica.¹⁸

Siendo enzimas esenciales en la replicación del ADN, las topoisomerasas se habían convertido en dianas terapéuticas idóneas para el desarrollo de nuevos fármacos antitumorales, ya que se ha encontrado que los niveles de esta enzima son más altos en tumores malignos que en los tumores benignos o tejidos normales.¹⁹

16 Wani, M. C.; Ronman, P. E.; Lindley, J. T.; Wall, M. E. *J. Med. Chem.* **1980**, 23, 554.

17 (a) Moertel, C. G.; Schutt, A. J.; Reitemeier, R. J.; Hahn, R. G. *Cancer Chemother. Rep.* **1972**, 56, 95. (b) Gottlieb, J. A.; Luce, J. K. *Cancer Chemother. Rep.* **1972**, 56, 103.

18 (a) Hsiang, Y. H.; Hertzberg, R.; Hecht, S. *J. Biol. Chem.* **1985**, 260, 14843. (b) Hsiang, Y. H.; Liu, L. F. *Cancer Res.* **1988**, 48, 1722.

19 Husain, I.; Mohler, J. L.; Seigler, H. F.; Besterman, J. M. *Cancer. Res.* **1994**, 54, 539.

De esta manera, el exclusivo mecanismo de actuación de la CPT, reavivó su interés entre la comunidad científica. Entre los años 1966 y 2002 se publicaron más de 3000 comunicaciones, entre artículos y patentes, centrados en la síntesis y los mecanismos de actuación de la CPT.

En este mismo periodo de tiempo la Academia de la Ciencias de Nueva York organizó dos reuniones internacionales enfocadas, exclusivamente, al desarrollo y nuevos avances de las CPTs.²⁰ El resultado de dichos esfuerzos dio sus frutos con la obtención y aprobación por parte de las agencias regulatorias, de los dos únicos derivados del alcaloide que actualmente tienen aplicación comercial, Topotecan e Irinotecan (Figura 4).

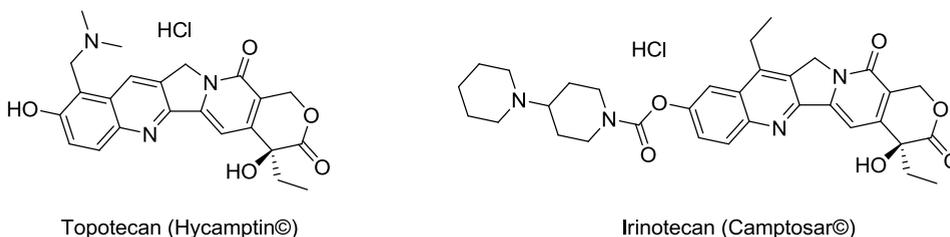


Figura 4. Estructuras de los derivados de CPT aprobados para uso clínico.

En la actualidad el Topotecan es comercializado por Glaxo-SmithKline²¹ bajo el nombre de Hycamptin® para el tratamiento del cáncer de ovario metastásico como agente de segunda línea,²² tratamiento para el cáncer de pulmón de células pequeñas como agente de segunda línea²³ y en combinación con cis-Pt para cáncer

20 (a) "The Camptothecins: From discovery to patient". Pantaziz, P.; Giovannella, B. C. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1996**, vol. 803. (b) "Camptothecins: Unfolding Their Anticancer Potential". Liehr, J. G.; Giovannella, B. C.; Verschraegen, C. F. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2000**, vol. 922.

21 http://us.gsk.com/products/assets/us_hycamptin_injection.pdf

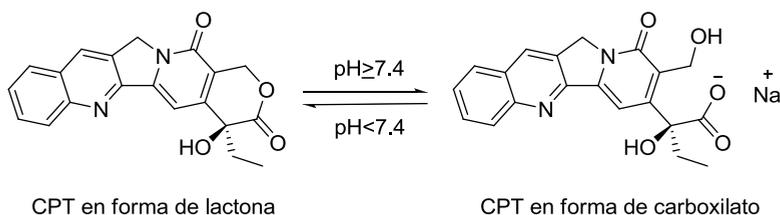
22 (a) Armstrong, D. K. *The Oncologist* **2004**, *9*, 33. (b) Sehouli, J.; Stengel, D.; Harter, P.; Kurzeder, C.; Belau, A.; Bogenrieder, T.; Markmann, S.; Mahner, S.; Mueller, L.; Lorenz, R.; Nugent, A.; Wilke, J.; Kuznik, A.; Doering, G.; Wischnik, A.; Sommer, H.; Meerpohl, H. G.; Schroeder, W.; Lichtenegger, W.; Oskay-Oezcelik, G. *J. Clin. Oncol.* **2011**, *29*, 242.

23 Eckardt, J. R. *The Oncologist* **2004**, *9*, 25.

cervical en estadio IV-B cuando no es posible cirugía o radioterapia.²⁴ El Irinotecan es comercializado por Pfizer Pharmaceuticals con el nombre comercial de Camptosar[®] para el tratamiento del cáncer colorectal metastásico en combinación con 5-Fluorouracilo y ácido folínico.²⁵

3. El equilibrio estructural de la Camptotecina

La peculiar estructura química de la CPT contiene un anillo de hidroxilactona hexacíclico (anillo E), susceptible de ser hidrolizado. Es decir, la molécula presenta un equilibrio reversible dependiente del pH, entre su forma “cerrada” (anillo de lactona) y su forma “abierta” (forma de carboxilato) (Esquema 1). En condiciones de pH neutro o superior el equilibrio se desplaza hacia la forma abierta, mientras que pHs ácidos favorecen la estructura de lactona. De esta manera, en condiciones fisiológicas, el 50% del alcaloide se hidroliza en aproximadamente 25 min. (Figura 5).²⁶



Esquema 1. Equilibrio de la CPT dependiente del pH.

Desafortunadamente la forma de carboxilato, con elevada solubilidad en agua y estable a pH fisiológico, presenta mínima actividad terapéutica con altos grados

24 Paton, F.; Paulden, M.; Saramago, P.; Manca, A.; Misso, K.; Palmer, S.; Eastwood, A. *Health Technol. Assess.* **2010**, *1*, 55.

25 Saltz, L.B.; Douillard, J. Y.; Pirota, N.; Alakl, M.; Gruia G.; Awad, L.; Elfring, G. L.; Locker, P.K.; Miller, L.L. *The Oncologist* **2001**, *6*, 81.

26 Rivory, L. P.; Robert, J. *Pharmac. Ther.* **1995**, *68*, 269.

de toxicidad. Sin embargo la forma de lactona, insoluble en agua y estable a pHs ácidos, presenta valores de inhibición tumoral *in vitro*, exclusivos de unos pocos antitumorales conocidos.

El equilibrio estructural *in vivo* tampoco es favorable, ya que la elevada diferencia de los porcentajes de lactona/carboxilato en plasma de ratón²⁷ y plasma humano²⁸ se acentúa considerablemente y son una clara evidencia de la variabilidad de la eficacia antitumoral de la CPT.

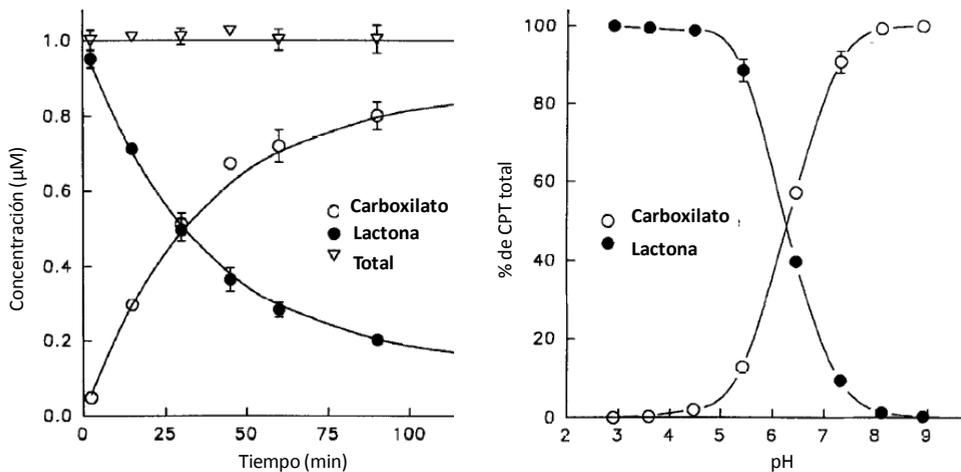


Figura 5. Equilibrios *in vitro* de CPT. Concentración de las formas de CPT en PBS a 37°C, pH 7.4 en función del tiempo (gráfica izquierda). Porcentaje de CPT en función del pH a 25°C (gráfica derecha). Medidas obtenidas por HPLC.²⁶

Las bases farmacológicas de esta diferencia estructural están en la afinidad del alcaloide por la albúmina sérica humana (ASH).

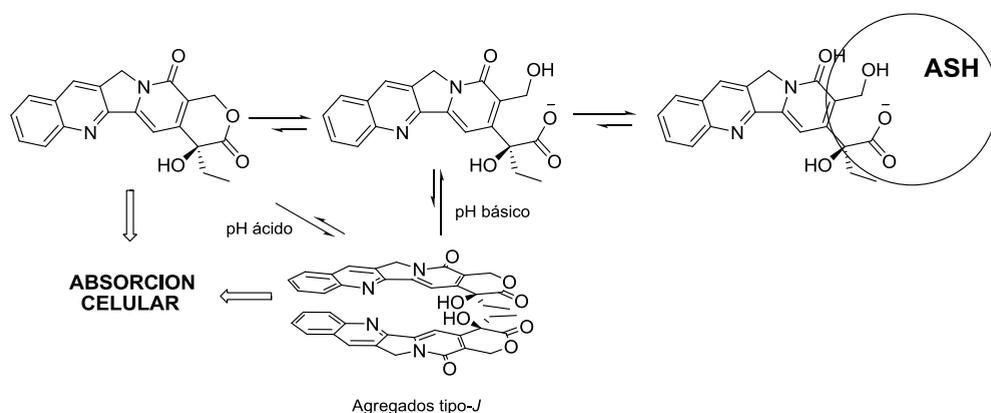
La ASH es la proteína plasmática más abundante en el plasma sanguíneo humano (5g/100mL)²⁹ y la responsable de la mayoría de las interacciones con una amplia variedad de metabolitos y fármacos.³⁰

27 Scott, D. O.; Bindra, D. S.; Stella, V. *J. Pharm. Res.* **1993**, *10*, 1451.

28 Mi, Z.; Burke, T. G. *Biochemistry* **1994**, *33*, 10325.

29 Fehske, K. J.; Muller, W. E.; Wollert, U. *Biochem. Pharmacol.* **1981**, *30*, 687.

Esta formada por tres dominios homólogos (I-III), con una cavidad hidrofóbica en el dominio II. En particular, parece ser que tanto el grupo carbonilo del anillo D como la forma carboxilato presentan una elevada interacción con la ASH,³¹ formando un complejo suficientemente estable para impedir un posible retorno hacia la forma de lactona. Estudios realizados sobre la interacción del fármaco con distintos componentes sanguíneos, concluyeron que, en presencia de niveles relevantes de ASH, el 100% de la forma activa de la CPT tiene un breve periodo de tiempo (aproximadamente 5 minutos) y a los 60 minutos de inoculación en plasma humano, el 99% del alcaloide se ha convertido en su forma de carboxilato.³²



Esquema 2. Influencia de la estructura de la CPT en su unión con la ASH. Representación esquemática de los agregados tipo *J* de CPT.

Otro efecto adicional en la actividad biológica del fármaco y su unión con la ASH es la formación de los denominados agregados tipo-*J*, o “apilamiento molecular”, que se produce entre las moléculas de CPT debido a la interacción de

30 (a) Fasano, M.; Curry, S.; Terreno, E.; Galliano, M.; Fanali, G.; Narciso, N.; Notari, S.; Ascenzi, P. *IUBMB Life* **2005**, *57*, 787. (b) Feng, Y.; Zhang, Y.; Liang, H. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 3580. (c) Kandagal, P. B.; Ashoka, S.; Seetharamappa, J.; Shaik, S. M.; Jadegoud, Y. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *41*, 393.

31 Fleury, F.; Kudelina, I.; Nabiev, I. *FEBS Lett.* **1997**, *406*, 151.

32 Rivory, L. P.; Robert, J. *Pharmac. Ther.* **1995**, *68*, 269.

los anillos de quinolina manteniendo los átomos de nitrógeno en posiciones opuestas. Estas interacciones son estables a pH ácido, ya que no se pueden lograr con la forma de carboxilato y previenen, parcialmente, la hidrólisis del anillo de lactona en condiciones neutras, probablemente debido a los puentes de hidrógeno que se producen entre los hidroxilos y los carbonilos enfrentados del anillo E.

Los agregados-*J* penetran al interior de las células con mucha mayor eficiencia que los monómeros de CPT (aprox. 10 veces más) y se disocian en su interior como resultado de la interacción con la Topo I. Además, la autoagregación molecular impide, en cierta medida, la formación de complejos ASH-CPT³³ (Esquema 2).

A pesar de que la Topo I es la diana terapéutica de la CPT, y su mecanismo de acción debería ocupar los mayores esfuerzos en su investigación, las características físico-químicas del compuesto hacen evidente que las interacciones del fármaco con las proteínas y con el medio juegan un papel determinante en su actividad biológica.

Posiblemente la CPT represente uno de los ejemplos más llamativos dentro de los fármacos antitumorales, en el que la dualidad, estructura y actividad antitumoral se vea más mermada a la hora de ser utilizada con beneficios clínicos. Parece evidente que, además de los esfuerzos propios de los estudios en fármacos antitumorales asociados a la toxicidad, resistencia tumoral, etc, los avances con CPT implican la obtención de derivados “estructuralmente estables”, que no disminuyan la actividad terapéutica y que permitan mantener inalterada el mayor tiempo posible la forma de lactona.

33 (a) Fleury, F.; Kudelina, I.; Nabiev, I. *FEBS Lett.* **1997**, *406*, 151. (b) Nabiev, I.; Fleury, F.; Kudelina, I.; Pommier, Y.; Charton, F.; Riou, J. F. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *55*, 1163. (c) Nabiev, I.; Fleury, F.; Beljebbar, A.; Manfait, M. *Spect. Biol. Mol.* **1995**, *12*, 541.

4. Mecanismo de acción

4.1. Topoisomerasas

Todos los procesos de actividad genética están acompañados de alteraciones en la tensión helicoidal del ADN. En consecuencia, la doble hélice se retuerce sobre sí misma, o se superenrolla, para poder mantenerse estable en toda su longitud. Esta tensión puede ser muy elevada en los procesos de transcripción y replicación, ya que las dos hebras, siempre enlazadas en la doble hélice, se ven forzadas a separarse de forma total o parcial. Debido a la enorme longitud y a la gran condensación de moléculas de ADN en los cromosomas, la tensión helicoidal no puede separarse de forma espontánea.³⁴

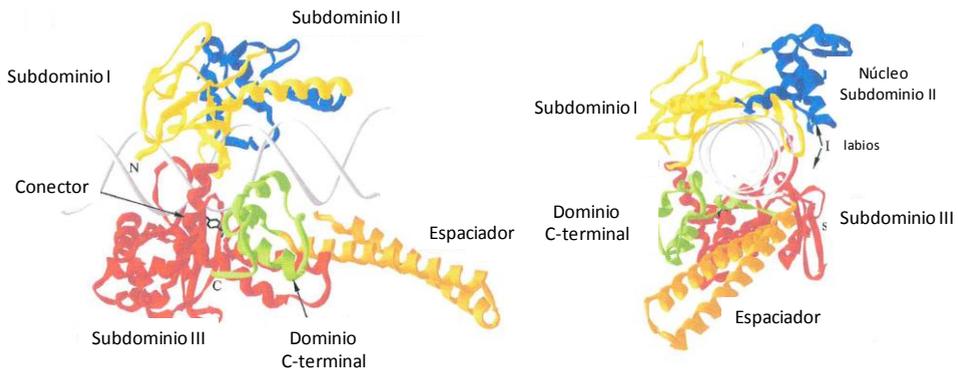


Figura 6. Vista lateral (izquierda) y frontal (derecha) de la Topoisomerasa I formando complejo con ADN de doble hebra. La Tirosina 723 (conector) se encuentra en el dominio C-terminal.^{34a}

34 (a) Champoux, J. J. *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, 70, 369. (b) Wang, J. C. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* **2002**, 3, 430. (c) Wang, J. C. *Q. Rev. Biophys.* **1998**, 31, 107.

La solución natural al problema lo ofrecen las denominadas topoisomerasas, que provocan cortes transitorios en las hebras del ADN para catalizar y guiar el desanudamiento y estiramiento de la doble hélice.³⁵

Las topoisomerasas son enzimas isomerasas que regulan la topología del ADN mediante acciones como la rotura, relajación, paso y reunificación de las hebras mediante mecanismos bien diferenciados que las clasifican en dos grupos: topoisomerasas I (Topo I, subtipos IA y IB) y topoisomerasas II (Topo II, subtipos IIA y IIB).³⁶

La Topo I corta únicamente una de las dos hebras de la doble hélice mediante la formación de un enlace fosfotirosil, permitiendo que un bucle de la hebra intacta pase a través de la hendidura resultante por la fractura. Posteriormente, un ataque nucleofílico del 5'OH fragmentado vuelve a unir los dos extremos reduciendo el enrollamiento negativo en un proceso de relajación. La formación de este “intermedio” covalente, enzima-ADN, conserva la energía libre del enlace fosfodiéster escindido, de modo que no necesita el aporte de ATP libre para sellar nuevamente la mella en el ADN³⁷ (Esquema 3).

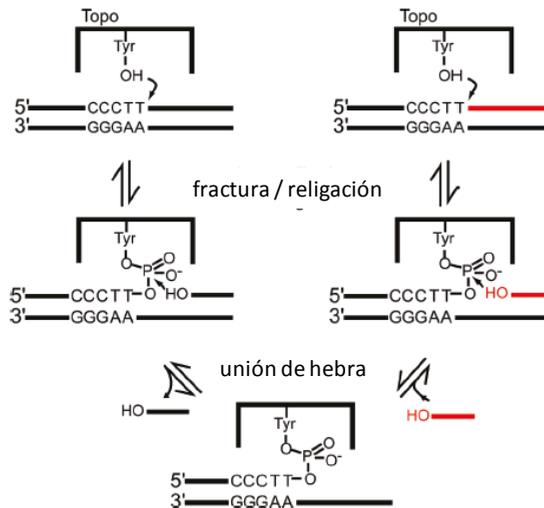
Por otro lado la Topo II corta simultáneamente las dos hebras del ADN y permite cruzar, a través de ese corte, a otra doble hélice de ADN. Con este mecanismo, un segmento de ADN puede “atravesar” a otro como si no existiera

35 (a) Berger, J. M. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1400*, 3. (b) Lance, S.; Matthew, R. R.; Xiayang, Q.; Wim, G. J. H.; Champoux, J. J. *Science* **1998**, *279*, 1534.

36 (a) Buhler, C.; Gadelle, D.; Forterre, P.; Wang, J. C.; Bergerat, A. *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 5157. (b) Bergat, A.; de Massy, B.; Gadelle, D.; Varoutas, P.C.; Nicolas, A.; Forterre, P. *Nature* **1997**, *386*, 414.

37 Para revisiones detalladas sobre Topo I: (a) Champoux, J. J. *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, *70*, 369. (b) Nelson, D. L.; Michael, M. Cox. “Genes and Chromosomes”, 2000, 3ª ed. 915. (c) Wendorff, T.; Schmidt, B.; Heslop, P.; Austin, A. A.; Berger, J. M. *J. Mol. Biol.* **2012**, *424*, 109. (d) Devlin, T. M. “*Bioquímica*”. Ed Reverté. **2006**, p.60.

gracias a la “puerta temporal” abierta por la enzima,³⁸ es decir, tras la relajación de la Topo I, la Topo II hace desaparecer, uno a uno, todos los nudos y entrecruzamientos de la doble hélice.



Esquema 3. Proceso reversible de fractura y religación de la Topo I con nueva hebra de ADN. La hebra original (negra) es fracturada durante el proceso de transesterificación y puede ser disociada del complejo ADN-Topo I. Una nueva hebra (roja) se asocia mediante un intermedio fosfotiosilado. Constantes de equilibrio omitidas.³⁹

Resulta evidente que la tensión y la topología del ADN son elementos que afectan directamente a los patrones de expresión de los genes, son parámetros que la célula modula, para “decidir”, si un gen se activa o no, o si una célula se duplica o no. Así pues, la implicación de estas enzimas en el proceso de replicación y proliferación celular los ha convertido en blancos terapéuticos de muchos agentes

38 Para revisiones detalladas sobre Topo II: (a) Berger, J. M.; Wang, J. C. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, *6*, 84. (b) Berger, J. M. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1400*, 3. (c) Wigley, D. B. *Structure* **1996**, *4*, 117. (d) Wang, J. C. *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65*, 635. (e) Nitiss, J. L. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 327. (f) Berger, J. M.; Gamblin, J.; Harrison, S. C.; Wang, J. C. *Nature* **1996**, *379*, 225.

39 Stahley, M. R.; Stivers, J.T. *Biochemistry* **2010**, *49*, 2786.

antitumorales,⁴⁰ por ejemplo, antieneoplásicos como la doxorubicina o la mitoxantrona actúan sobre la Topo II,⁴¹ mientras, la rebecamicina, nitidina, indolocarbazoles o feniliminazoles, hacen lo propio sobre la Topo I.⁴²

Si tenemos en cuenta que las células tumorales tienen un elevado nivel de replicación, tienen por tanto mucha actividad enzimática por parte de las topoisomerasas. Bloquear esta actividad permite evitar su proliferación.

4.2. El complejo ternario reversible: Topo I-ADN-CPT

La actividad citotóxica de la CPT se basa en la formación de un complejo no covalente y reversible formado por Topo I-ADN-CPT, llamado complejo ternario.⁴³

Extensos estudios *in vitro* sobre las propiedades de este complejo han propuesto que la CPT se une y estabiliza el estado de transición, en el punto en el que el grupo hidroxilo de la tirosina 723 de la Topo I se une covalentemente al ADN a través de su grupo fosfodiéster causando la ruptura de la hebra y formando el intermedio fosfortirosina, llamado complejo binario covalente. En ausencia de fármaco, el enlace fosfodiéster es recompuesto por religación con la liberación concomitante de la enzima finalizando la fase S del ciclo celular (Esquemas 4A y 5A).

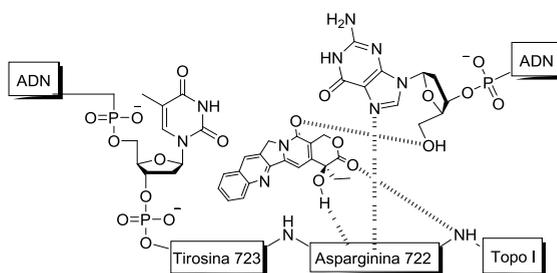
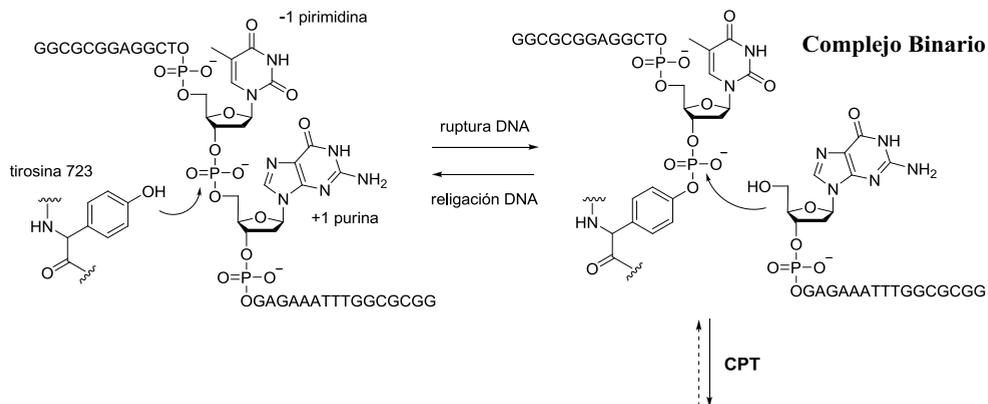
40 (a) Liu, L. F. *Annu. Rev. Biochem.* **1989**, 58, 351. (b) Pommier, Y.; Leo, E.; Marchand, C.; *Chem. Biol.* **2010**, 17, 421.

41 (a) Burden, D. A.; Osheroff, N. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, 1400, 139. (b) Hande, K. R. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, 1400, 173.

42 (a) Nettleton, D. E.; Doyle, T. W.; Kirshnan, B.; Matsumoto, G. K.; Clardy, J. *Tetrahedron Lett.* **1985**, 25, 4011. (b) Yamasita, Y.; Fujii, N.; Muracata, C.; Ashizawa, T.; Okabe, M.; Nakano, H. *Biochemistry*, **1992**, 31, 12069. (c) Wang, L.-K.; Jonhson, R. K.; Hecht, S. M. *Chem. Res. Toxicol.* **1993**, 6, 813.

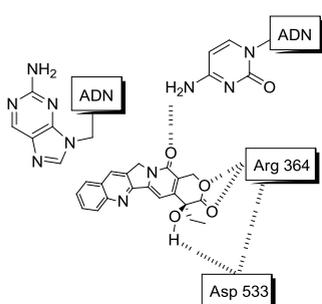
43 (a) Pommier, Y.; Tanizawa, A.; Kohn, K. W. *Adv. Pharmacol.* **1994**, 29B, 73. (b) Kohn, K. W.; Pommier, Y. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2000**, 922, 11. (c) Chen, A. Y.; Liu, L. F. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1994**, 34, 191.

A

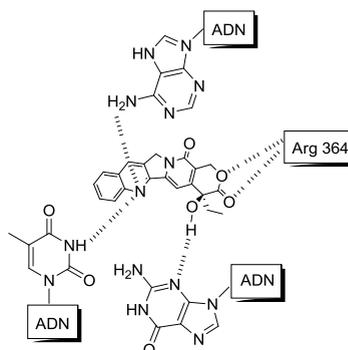


Complejo Ternario. Modelo de Pommier

B



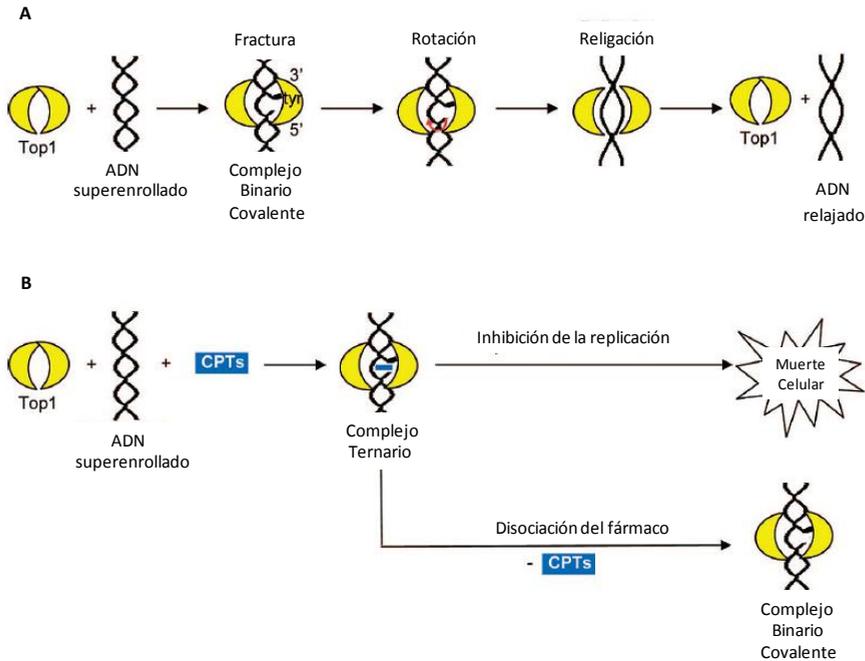
Complejo Ternario. Modelo de Hol



Complejo Ternario. Modelo de Pilch

Esquema 4. a) Mecanismo de ruptura y religación del complejo Topo I-ADN. Estabilización del complejo ternario según Pommier. b) Representación de la estabilización e interacciones del modelo ternario, Topo I-ADN-CPT, propuesto por Hol y Pilch.

Aunque el mecanismo concreto por el que la CPT se une al complejo binario no es totalmente conocido, parece aceptado que la potencia en la inhibición o “envenenamiento” de la TopoI se caracteriza por la persistencia del alcaloide en estabilizar el complejo ternario, disminuyendo los porcentajes de religación y en último caso la síntesis de ADN.⁴⁴



Esquema 5. (a) Proceso de relajación del ADN superenrollado por Topo I. (b) Modo de acción de la CPT.

44 (a) Hsiang, Y. H.; Lihou, M. G.; Liu, L. F. *Cancer Res.* **1989**, *49*, 5077. (b) Punchihewa, C.; Carver, M.; Yang, D. *Protein Sci.* **2009**, *18*, 1326. (c) Arimondo, P. B.; Thomas, C. J.; Oussedik, K.; Baldevrou, B.; Mahieu, C.; Halby, L.; Guianvarch, D.; Lansiaux, A.; Hecht, S. M.; Bailly, C.; Giovannangeli, C. *Mol. Cell. Biol.* **2006**, *26*, 324.

La falta de afinidad de la CPT por el ADN y por la Topo I en ensayos individualizados⁴⁵ y la resistencia de líneas celulares donde la Topo I había sido específicamente mutada en posiciones conocidas,⁴⁶ han dado lugar a numerosos modelos computacionales que confirman el mecanismo de inhibición.⁴⁷

El modelo propuesto por Pommier presupone que la intercalación del fármaco se produce maximizando tanto las interacciones que favorecen el apilamiento de la CPT como los puentes de hidrógeno con aminoácidos específicos del ADN.⁴⁸ Sin embargo, Kerrigan y Plich propusieron un modelo en el que el anillo E se introduce dentro del surco menor del ADN, y por lo tanto es la lactona la que forma parte de la coordinación del complejo binario, siendo el anillo A el que se sitúa hacia el surco mayor de la doble hélice.⁴⁹ Por otro lado, en el modelo de Hol, la CPT se sitúa parcialmente desplazada respecto a las anteriormente descritas, formándose un apilamiento entre los anillos AB y la purina +1⁵⁰ (Esquema 4B).

Si bien existen diferencias en la formación de algunas interacciones, en todas las predicciones se postula que al menos uno de los residuos Asn722, Arg365, Asp533 o Arg364 son esenciales en la unión de la CPT. Del mismo modo, todos los modelos coinciden en que el anillo E coordina tanto el hidroxilo como la lactona a diferentes posiciones del ADN y/o de la Topo I, dejando en algunos casos la quinolina o el carbonilo del anillo D para un nuevo punto de estabilización.

45 Hertzberg, R. P.; Caranfa, M. J.; Hecht, S. M. *Biochemistry* **1989**, *28*, 4629.

46 Pommier, Y.; Fujimori, A.; Hoki, Y.; Gupta, M.; Gariboldi, M. *Ed. John Wiley: Oxford* **1996**, p19.

47 Hertzberg, R. P.; Busby, R. W.; Caranfa, M. J.; Holden, K. G.; Johnson, R. K.; Hecht, S. M.; Kingsbury, W. D. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 1287.

48 Fan, Y.; Weinstein, J. N.; Kohn, K. W.; Shi, L. M.; Pommier, Y.; *J. Med. Chem.* **1988**, *41*, 2216

49 Kerrigan, J. E.; Pilch, D. S. *Biochemistry* **2001**, *40*, 9792.

50 Redinbo, M. R.; Stewart, L.; Kuhn, P.; Champoux, J. J.; Hol, W. G. J. *Science* **1998**, *279*, 1504.

5. Estudios sintéticos de Camptotecina

Desde el descubrimiento de las propiedades antitumorales de la CPT muchos investigadores centraron sus esfuerzos en obtener una ruta sintética capaz de obtener el fármaco con altos rendimientos.

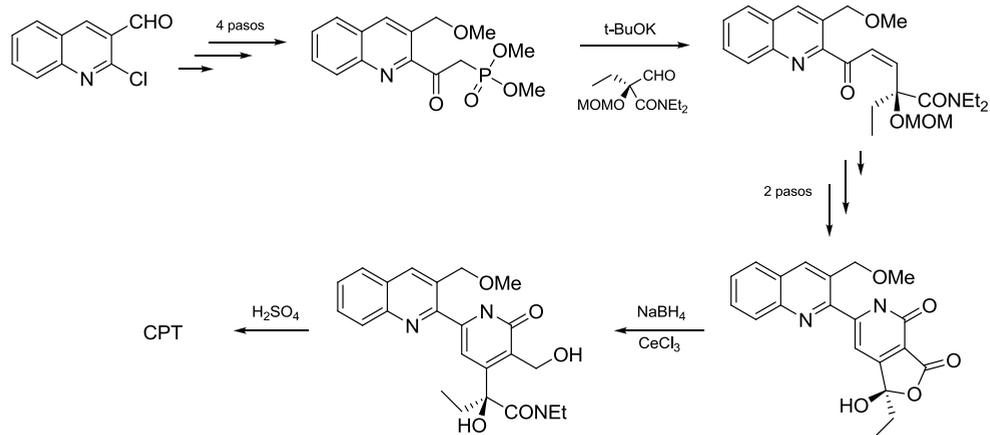
La primera síntesis asimétrica de la CPT fue publicada por Tawaga en 1989,⁵¹ donde mediante un derivado de N-tosil-R-Prolina como agente catalítico conseguía sintetizar el centro quiral del anillo E. En 1992, el grupo de Comins y *col.* presentaron la primera retrosíntesis basada en la formación del anillo C a partir de la reacción convergente de 2-cloroquinolina y el fragmento D-E de hidroxilactona enantioméricamente puro.⁵²

Ciufolini y Roschanger publicaron la síntesis de CPT utilizando una esterasa para obtener la estereoquímica correcta del C-20 (Esquema 6).⁵³ La estrategia consistía en la condensación del fosfonato obtenido desde la cloroquinolona comercial con el aldehído correspondiente para dar la enona con rendimientos del 80%. Posteriores pasos de oxidación con dióxido de selenio, desprotección y reducción de la lactona permiten obtener el diol que se acidifica para la obtención de CPT.

51 Ejima, A.; Terasawa, H.; Sugimori, M; Tagawa, H. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2639.

52 (a) Commins, D. L.; Baevsky, M. F.; Hong, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10971. (b) Comins, D. L., Hong H., Gao, J. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *30*, 5331.

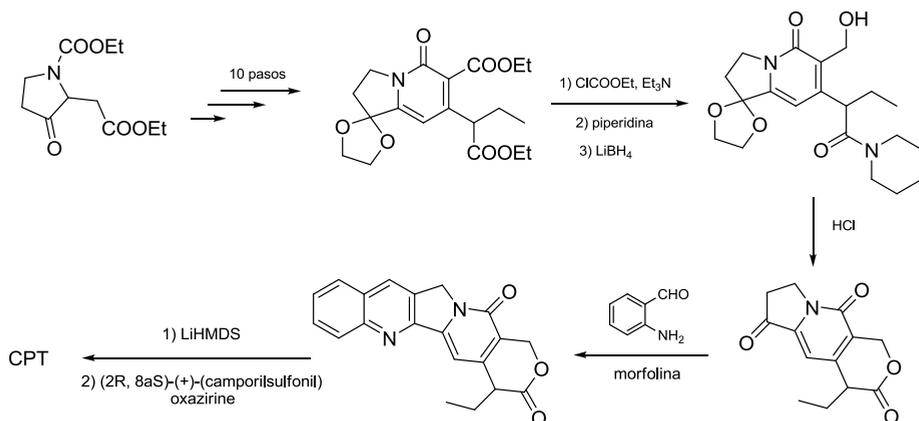
53 (a) Ciufolini, M. A.; Roschanger, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 1692. (b) Ciufolini, M. A.; Roschanger, F. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 11049. (c) Ciufolini, M. A.; Roschanger, F. *Targets in Heterocyclic Systems* **2000**, *4*, 25.



Esquema 6. Síntesis de Ciufolini y col. para la obtención de CPT.

Por otro lado, Nagao y *col.* describieron una nueva ruta sintética para la obtención del esqueleto 20-deoxyCPT a partir del acetal obtenido en una secuencia de 10 pasos desde la dietoxicarbonilpirrolidinona (Esquema 7).⁵⁴ Posteriores tratamientos con etilcloroformato, seguido de piperidina y reducción con LiBH_4 , dieron el alcohol que se acidifica y condensa para aislar el esqueleto inicialmente mencionado que, finalmente, es hidroxilado en C-20 mediante el reactivo quiral de Davis. Esta estrategia resultó de alto interés para la obtención de funcionalizaciones en la posición 20.

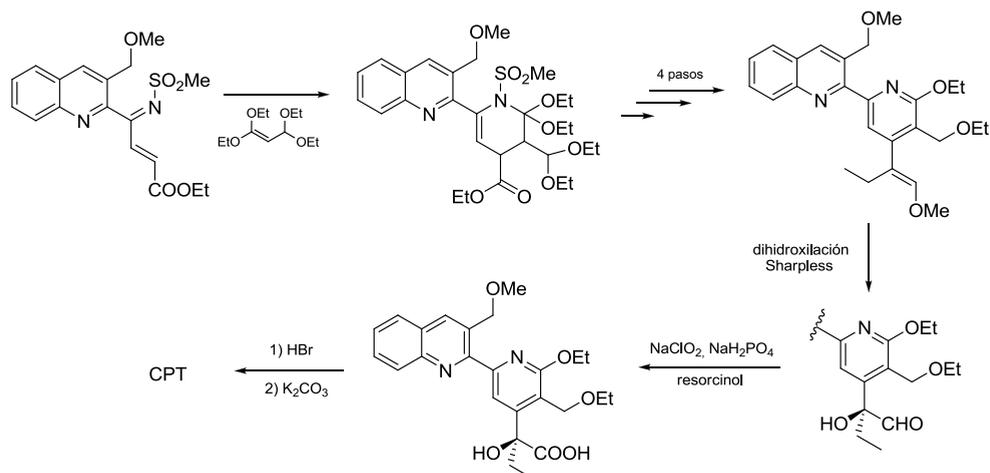
54 Tagami, K.; Nakazawa, N.; Sano, S.; Nagao, Y. *Heterocycles* **2000**, 53, 771.



Esquema 7. Síntesis de Nagao y col. para la obtención de CPT.

Blagg and Boger propusieron la síntesis de la CPT basada en la cicloadición de Diels-Alder del dieno N-sulfonil-1-aza-1,3-butadieno con el correspondiente dienófilo para la obtención del precursor de los anillos A, B, C.⁵⁵ Sucesivas reacciones con etóxido sódico, ioduro de zinc y trietilsilano dan lugar a eliminaciones secuenciales para obtener el intermedio quinolínic, del que se obtienen sus isómeros tras su etinilación y posterior olefinación de Wittig. El alcohol terciario en C-20 se introduce mediante la dihidroxilación asimétrica de Sharpless, para obtener el aldehído que a su vez es oxidado en condiciones estándar. Finalmente, la eliminación en condiciones ácidas de ambos éteres bencílicos y del éter ariletílico permite obtener el alcaloide, previa ciclación intramolecular catalizada por carbonato potásico (Esquema 8).

55 Blagg, B. S.; Boger, D. L. *Tetrahedron* **2002**, 58, 6343.



Esquema 8. Síntesis de Blagg y col. para la obtención de CPT.

La síntesis total de la forma racémica de la CPT fue publicada, por primera vez, por el grupo de Benassar, mediante la adición de un enolato a la forma de sal de piridinio que se forma durante la construcción del anillo C (Figura 7).⁵⁶

56 Benassar, M.-L.; Zulaica, E.; Juan, C.; Alonso, Y.; Bosch, J. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 4765.

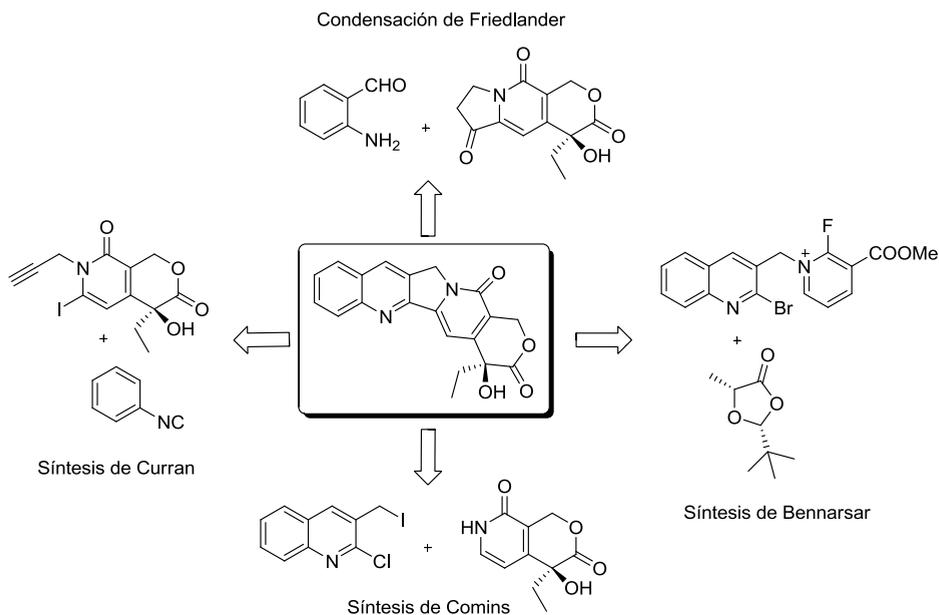


Figura 7. Esquema general de retrosíntesis de CPT mediante diferentes metodologías.

Sin embargo, la que se considera una de las síntesis más elegantes de CPT fue desarrollada por el Prof. Curran en la U. de Pittsburg como parte de su programa de investigación, centrado en ciclaciones radicalarias de isonitrilos para la formación de esqueletos quinolínicos.⁵⁷

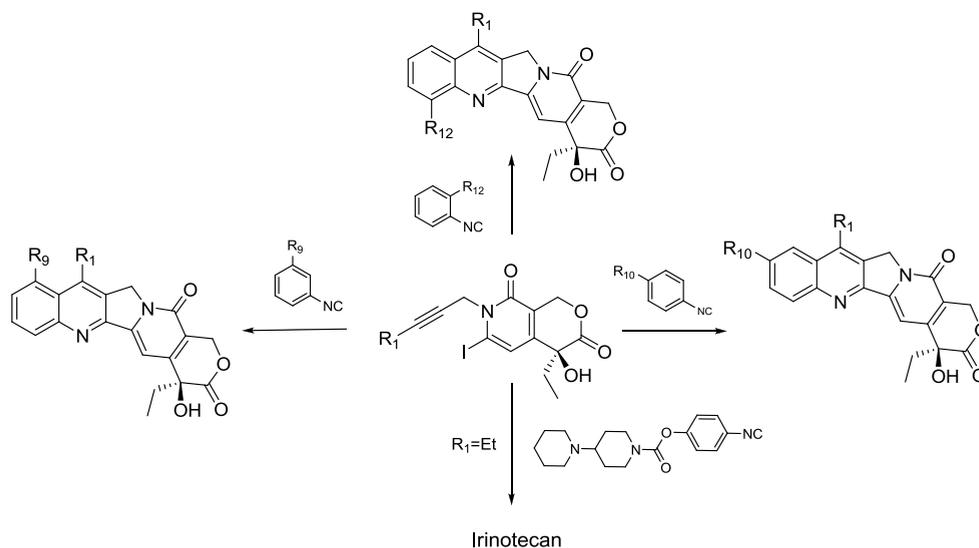
Una vez desarrollada la síntesis del núcleo D-E, modificaciones en la posición 7 eran fácilmente introducidas durante el paso de N-propargilación.⁵⁸ Como se muestra en el Esquema 9, sustituciones en posiciones 9, 10 o 12 se llevaban a cabo utilizando fenilnitrilos, en condiciones sencillas y con alta tolerancia de grupos funcionales de distinta naturaleza.⁵⁹ Bajo estas condiciones, la síntesis de Irinotecan se obtenía con un 30% de rendimiento mediante la alquilación de la

57 (a) Curran, D. P.; Liu, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 2127. (b) Ryu, I.; Sonoda, N.; Curran, D.P. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 177.

58 Yabu, K.; Masumoto, S.; Kanai, M.; Du, W.; Curran, D. P.; Shibaski, M. *Heterocycles* **2003**, *59*, 360.

59 Du, W.; Curran, D. P. *Synlett.* **2003**, *9*, 1299.

iodoamida con bromuro etilpropargílico y posterior anulación radicalaria con el isonitrilo piperopiperacínico.⁶⁰



Esquema 9. Esquema general para la obtención de derivados de CPT mediante la reacción radicalaria de Curran. Síntesis de Irinotecan.

La condensación de Friedlander es una de las reacciones más conocidas y más aplicadas en la formación de quinolinas dentro de la química sintética.⁶¹ Esta reacción fue utilizada a principios de los 70 por Stork, Danishefsky y Rapoport, entre otros, para la síntesis total de CPT racémica.⁶² Posteriormente, la optimización de la metodología y los mayores esfuerzos se centraron en la obtención de la cetohidroxilactona tricíclica, enantioméricamente pura (anillos

60 Curran, D. P.; Ko, S.-B.; Josien, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 2638.

61 (a) Jia, C.-S.; Zhang, Z.; Tu, S.-J.; Wang, W.-G. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 104. (b) Manske, R. H. *Chem. Rev.* **1942**, *30*, 113.

62 (a) Danishefsky, S.; Etheredge, S. J. *J. Org. Chem.* **1974**, *14*, 3430. (b) Tang, C.; Rapoport, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 8615. (c) Stork, G.; Schultz, A. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 4074. (d) Hutchinson, C. R. *Tetrahedron* **1981**, *37*, 1047.

CDE), necesaria para condensarse con 2-formilanilina (Figura 7).⁶³

Los buenos rendimientos, la alta reproducibilidad y amplia versatilidad para la obtención de derivados de CPT en estas condiciones, permitió el aislamiento de nuevos análogos sustituidos en los anillos A-B utilizando aminocetonas o aldehídos y el esqueleto lactónico. De esta manera, compuestos hexacíclicos como lurtotecan,⁶⁴ solubles en agua como el CKD-602⁶⁵ o productos naturales como el chaboside⁶⁶ o el glucósido de CPT⁶⁷ fueron aislados (Figura 8).

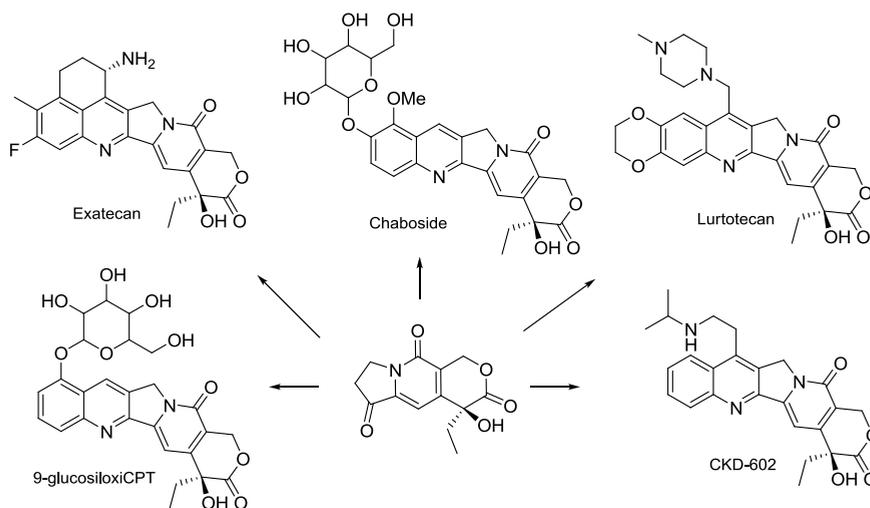
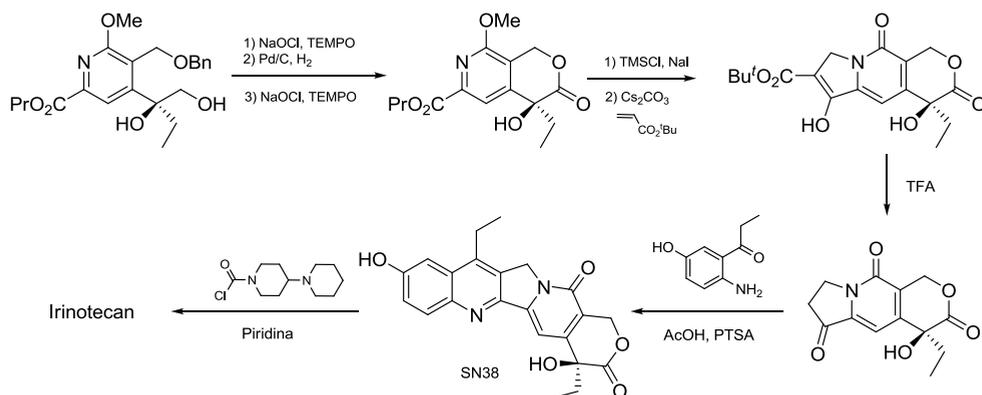


Figura 8. Derivados de CPT sintetizados por condensación de Friedlander a partir del esqueleto CDE.

- 63 (a) Ejima, A.; Terasawa, H.; Sugimori, M.; Tagawa, H. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 2639. (b) Ejima, A.; Terasawa, H.; Sugimori, M.; Tagawa, H. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1990**, 27.
- 64 Luzzio, M. J.; Besterman, J. M.; Emerson, D. L.; Evans, M. G.; Lackey, K.; Leitner, P. L.; McIntyre, G.; Morton, B.; Myers, P. L.; Peel, M. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 395.
- 65 Jew, S.-S.; Kim, M. G.; Kim, H.-J.; Roh, E.-Y.; Park, H.-G.; Kim, J. K.; Han, H. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 1797.
- 66 Aimi, N.; Ueno, M.; Hoshino, H.; Sakai, S. *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 5403.
- 67 Kitajima, M.; Nakamura, M.; Watanabe, A.; Takayama, H.; Aimi, N. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 1* **1998**, 389.

La eficacia de la condensación de Friedlander en procesos de escalado fue demostrada por Henegar y col. en la compañía Pharmacia & Upjohn para la comercialización del Irinotecan.

En este caso, el esqueleto CDE se obtenía en una secuencia de tres pasos desde la forma (*S*) del diol aromático, el cual era oxidado y desprotegido para obtener la lactona desde la que se obtenía el ester tricíclico mediante una condensación de Dieckman. La posterior descarboxilación proporcionaba el sustrato de Friedlander que se condensaba con la anilina correspondiente para dar 7-etil-10-hidroxiCPT (SN38), la acilación del derivado de CPT proporcionaba el Irinotecan (Esquema 10). La ruta desarrollada por la compañía utilizaba reactivos de partida asequibles y se obtenía el producto final con un rendimiento total del 6.8% (99.5% ee) en 18 pasos de reacción. El proceso se escaló en planta piloto para obtener >35kg del intermedio tricíclico esterificado.⁶⁸



Esquema 10. Proceso escalado para la síntesis de Irinotecan mediante condensación de Friedlander.

68 Henegar, K. E.; Ashford, S. W.; Baughman, T. A.; Sih, J. C.; Gu, R. –L. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6588.

6. Relación entre la estructura química y la actividad

Uno de los objetivos de la química médica es la búsqueda de nuevos fármacos que resulten más potentes más selectivos y menos tóxicos en su actividad terapéutica. Desafortunadamente, a pesar de los avances actuales en química computacional, predicción molecular etc., no existen pautas concretas capaces de determinar el éxito en la obtención de un nuevo fármaco.

Del análisis de los diversos procesos que se han puesto en juego para el desarrollo de nuevas entidades, pueden distinguirse cuatro estrategias fundamentales: a) estudio u observación de los productos de origen natural o sintético, b) cribado sistemático de familias de compuestos, c) diseño racional de compuestos a partir de una diana terapéutica y d) mejora de los fármacos ya existentes.⁶⁹

La finalidad de esta última estrategia suele ser la modificación estructural de fármacos ya conocidos o compuestos llamados *cabeza de serie*, con la intención de mejorar el perfil terapéutico o toxicológico, así como las propiedades fisicoquímicas de la entidad, de modo que resulten más adecuadas para la formulación galénica o que representen una mejora de sus características organolépticas.⁷⁰ Las modificaciones químicas de compuestos activos son necesarias para establecer y optimizar su distribución, su farmacocinética, su estabilidad y su acción terapéutica. Sin embargo cualquier cambio, afectará a la totalidad de la molécula en alguno de sus aspectos físico-químicos y por lo tanto se producirá una modulación en su comportamiento farmacológico. En la mayoría de

69 (a) Delgado A.; Minguillón, C.; Joglar, J.; *Introducción a la síntesis de fármacos*. Ed. Síntesis **2003**. p.16-19. (b) Roth, H. J.; Kleemann, A.; Horwood, E. *Pharmaceutical Chemistry*, Vol 1. **1988**. p.23-35.

70 (a) Cirilo, A. D.; Llombart M. C; Tamargo, J. J. *Introducción a la química terapéutica*. Ed. Diaz de Santos. **1999**. p13-29. (b) Camps, P. G.; Vázquez, C. S.; Escolano, M. C. *Química farmacéutica I. Tomo I*. U. de Barcelona. **2001**. p19-29.

los casos se establece un compromiso entre la mejora que presenta la modificación y la deficiencia o limitación que esta misma suele provocar.⁷¹

El desarrollo de nuevas rutas sintéticas ha permitido la obtención de nuevos derivados de CPT que han facilitado la identificación de aquellas posiciones o modificaciones capaces de aumentar la actividad antitumoral del fármaco en función de la naturaleza química del sustituyente.

En este punto es importante señalar, la contribución que tienen estos estudios a la hora de mejorar el conocimiento del mecanismo de acción del fármaco y su importancia a la hora de aportar datos de alto valor farmacológico como los mecanismos de transporte, la resistencia tumoral, solubilidad, compatibilidades con otros fármacos, etc.

A día de hoy, se han establecido algunos conceptos que se consideran esenciales para mantener la actividad antitumoral de la CPT: (a) el grupo 20-(*S*)-hidroxilo en el anillo E en forma de lactona, (b) la unidad de piridona en el anillo D y (c) la planaridad del sistema pentacíclico ABCDE. Los detalles de las modificaciones realizadas en el alcaloide se exponen a continuación.

6.1. Modificaciones en la quinolina (anillos A y B)

Hasta la fecha, los dos únicos derivados de CPT aprobados para uso clínico, Topotecan e Irinotecan, presentan sustituciones en la quinolina.

Los anillos A y B han demostrado ser los más receptivos a la hora de realizar sustituciones manteniendo o aumentando la actividad terapéutica. Las modificaciones llevadas a cabo incluyen adiciones sobre el heterociclo o el reemplazamiento completo por diferentes anillos conjugados. La sustitución del anillo de la quinolina por otros sistemas aromáticos ha demostrado tener actividad

71 (a) Thomas, G.; *Fundamentals of Medicinal Chemistry*. Ed. J.W. & Sons. **2004**. p57-61. (b) Foye, W. O. *Principios de química farmacéutica*. Ed. Reverté **1991**. p 21-34.

farmacológica, sin embargo ninguno ha conseguido igualar la actividad de la CPT,⁷² consecuentemente, la mayoría de los estudios posteriores se centraron en adiciones sobre los carbonos del heterociclo original.

Monosustituciones en las posiciones 9 y 10 por grupos OH, NH₂, haluros u otros grupos electronegativos, aumentan la inhibición de la Topo I,⁷³ mientras modificaciones en la posición 11 y 12 son claramente desfavorables.⁷⁴

Se han observado notables excepciones en el caso de análogos con alta capacidad de inhibición de la Topo I que presentaban modificaciones 10, 11-(metilendioxi), 10, 11-(etilendioxi), 11-fluoro o 11-ciano (Tabla 1).

Evidencias experimentales, concluyeron que, sustituciones de grupos funcionales de pequeño tamaño en el carbono 10, no interfieren en el mecanismo de acción de la CPT, mientras que grupos voluminosos reducen considerablemente la actividad farmacológica.

El Irinotecan, confirma este razonamiento, ya que presenta un grupo 4-piperidinopiperidina unido al carbono 10 via enlace carbamato y su capacidad para estabilizar el complejo TopoI-ADN es muy baja. Sin embargo, estudios *in vivo*, demostraron que los niveles de 7-etil-10-hidroxiCPT (SN38) en plasma eran elevados tras la administración del derivado, lo cual confirmó que el Irinotecan funciona como un profármaco, donde las carboxilesterasas hepáticas tienen especial afinidad para metabolizarlo a SN-38⁷⁵ (Figura 9). Durante la administración intravenosa de Irinotecan, síndromes tóxicos colinérgicos son

72 Lackey, K.; Besterman, J. M.; Fletcher, W.; Leitner, P.; Morton B.; Sternbach, D. D. *J. Med Chem.* **1995**, 38, 906.

73 Carrigan, S. W.; Fox, P. C.; Wall, M. E.; Wani, M. C.; Bowen, J. P. *J. Comput. Aided. Mol. Design* **1997**, 11, 71.

74 Wani, M. C.; Nicholas, A. W.; Wall, M. E. *J Med. Chem.* **1986**, 29, 2358.

75 (a) Wu, M.H.; Yan, B.; Humerickhouse, R.; Dolan, M.E. *Clin. Cancer Res.* **2002**, 8, 2696. (b) Morishita, Y.; Fujii, M.; Kasakura, Y.; Takayama, T. *J. Intern. Med. Res.* **2005**, 33, 84. (c) Rivory, L. P.; Bowles, M. R.; Robert, J.; Pond, S. M. *Biochem. Pharm.* **1996**, 52, 1103. (d) Harel, M.; Hyatt, J. L. *Chem. Biol. Interact* **2005**, 157, 153. (e) Morton, C. L.; Wadkins, R.M.; Danks, M. K. *Cancer Res.* **199**, 59, 1458.

frecuentemente observados y asociados a la interacción del fármaco con la acetilcolinesterasa.⁷⁶

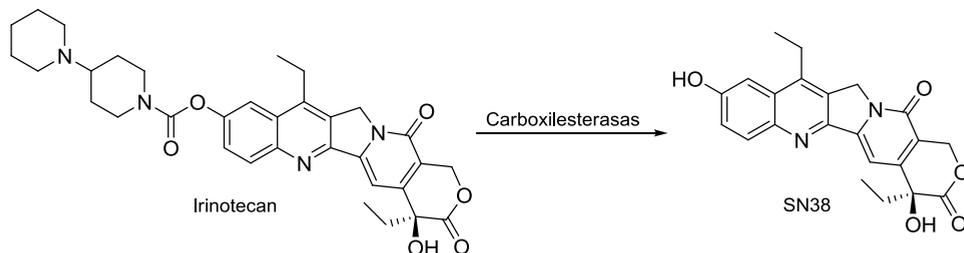
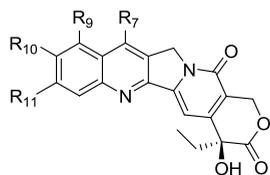


Figura 9. Metabolización de Irinotecan a SN38 en presencia de esterasas.

Especial consideración requiere el derivado 9-nitroCPT (Rubitecan) (Tabla 1) del que se ha demostrado que permanece en cierto equilibrio metabólico con la forma 9-aminoCPT.⁷⁷ El derivado aminado es especialmente sensible a procesos de oxidación que dan lugar a multitud de metabolitos de degradación altamente tóxicos.⁷⁸ Sin embargo, la introducción del grupo nitro proporcionó un amplio espectro de actividad antitumoral en ensayos *in vitro* y una farmacocinética favorable para su administración oral, llevando sus estudios clínicos hasta fase III avanzada para cáncer de páncreas.⁷⁹

- 76 (a) Gandia, D.; Abigeres, D.; Armand, J. P.; Chabot, G.; Da Costa, L.; de Forni, M. *J. Clin. Oncol.* **1993**, *11*, 196. (b) Abigeres, D.; Chabot, G. G.; Armand, J. P.; Gouyette, A.; Gandia, D. *J. Clin. Oncol.* **1995**, *13*, 210. (c) Valencak, J.; Raderer, M.; Kornek, G. V.; Henja, M. H. L. *J. Natl. Cancer Inst.* **1998**, *90*, 160.
- 77 (a) Schoffski, P.; Herr, A.; Vermorker, J. B.; Van der Brade, J.; Beijnen, J. H.; Rosing, H.; Volk, J. *Eur. J. Cancer* **2002**, *38*, 807. (b) Raymond, E.; Campone, M.; Stupp, R.; Menten, J.; Chollet, P.; Lesimple, T. *Eur. J. Cancer* **2002**, *38*, 1348.
- 78 Li, K.; Chen, X.; Zhong, D.; Li, Y. *Drug Metabol. Disp.* **2003**, *31*, 729.
- 79 (a) Clark, J. W. *Exp. Opin. Invest. Drugs* **2006**, *15*, 71. (b) Burris, H. A.; Rivkin, S.; Reynolds, R.; Harris, J.; Wax, A.; Gerstein, H.; Mettinger, K. L.; Staddon A. *Oncologist* **2005**, *10*, 183. (c) Papish, S. W.; Ramanathan, J.; Pincus, M.; Hirmand, H.; Burris, H. A. *J. Clin. Onco.* **2005**, *23* 4165.

Tabla 1. Derivados de CPT modificados en el anillo quinolíncico.



Análogo	R ₁₁	R ₁₀	R ₉	R ₇	IC ₅₀ μM (topoI) ^a
Camptotecina	H	H	H	H	0.6-1.4
Topotecan	H	OH	CH ₂ N(Me) ₂	H	1.1
Irinotecan	H		H	Et	100
SN-38	H	OH	H	Et	1.1
9-AminoCPT	H	H	NH ₂	H	0.9
Rubitecan	H	H	NO ₂	H	N.D
GI-149893		H	H		0.42
Lurtotecan		H	H		0.18
Exatecan	F	Me		H	N.D
DB-67	H	OH	H		N.D
Gimatecan	H	H	H	HC=NOC(Me) ₃	N.D

^aConcentración de fármaco que produce el 50% de la inhibición del complejo ADN-TopoI.

Un estudio desarrollado por el Centro Nacional del Cáncer indicó que un aumento en la lipofilia de la CPT permitiría repeler, en cierta medida, la afinidad de esta por la ASH⁸⁰ y por lo tanto estabilizar la forma de lactona aumentando su tiempo de vida media en circulación.

80 Tanizawa, A.; Fujimori, A.; Fujimori, Y.; Pommier, Y. *J. Natl. Cancer. Inst.* **1994**, *86*, 836.

En este sentido, el grupo del Prof. Curran, sintetizó una serie de derivados de CPT con grupos silicio en posición 7, denominados silatecanos,⁸¹ uno de ellos, el 7-(*tert*-butildimetilsilil)-10-hidroxiCPT (DB67, Tabla 1)⁸² presentó niveles de actividad semejantes a la CPT *in vivo*, y su nivel de toxicidad controlado le permitió ser seleccionado para ensayos clínicos.⁸³

Zunino y col. demostraron que la introducción de determinados sutituyentes en la quinolina, como por ejemplo, grupos iminometil⁸⁴ y oximinometil,⁸⁵ eran un método alternativo para aumentar la lipofilia de la CPT, y al igual que los silatecanos, estos nuevos derivados, con alteraciones en C-7, demostraron una elevada estabilidad de la lactona y una eficacia antitumoral superior en términos de inhibición del crecimiento tumoral y porcentajes de respuesta. De este modo las sustituciones en posición 7 y 9 se han considerado de alto interés en la química sintética de las CPTs.

6.2. Modificaciones en los anillos C y D

Un número reducido de estudios se han enfocado hacia la modificación de los anillos C-D. Alteraciones en el esqueleto principal como la sustitución del

81 (a) Pollack, I. F.; Erff, M.; Bom, D.; Burke, T. G.; Strode, J. T.; Curran, D. P. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 4898. (b) Du, W.; Bashir, K.; Blumbergs, P.; Subramanian, P.; Curran, D. P. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *451*, 458.

82 Bom, D.; Curran, D. P.; Kruszewski, S.; Zimmer, S. G.; Strode, J. T.; Kohlhagen, G.; Du, W.; Chavan, A. J.; Fraley, K. A.; Bingcang, A. L.; Latus, L. J.; Pommier, Y.; Burke, T. G. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3970.

83 www.clinicaltrials.gov identifier number: NCT00389480. "Study of AR-67 (Formerly DB-67) in adult patients with refractory or metastatic solid malignancies".

84 Dallavalle, S.; Merlini, L.; Morini, G.; Musso, L.; Penco, S.; Beretta, G. L.; Tinelli, S.; Zunino, F.; *Eur. J. Med. Chem.* **2004**, *39*, 507.

85 Dallavalle, S.; Ferrari, A.; Biassoti, B.; Merlini, L.; Penco, S.; Gallo, G.; Marzi, M.; Martinalli, R.; Pisano, C.; Carineni, N.; Perego, P.; Pratesi, G.; Zunino, F. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 3264.

pentaciclo por su homólogo de seis carbonos o la eliminación de la piridona han dado como resultado pérdidas de actividad muy elevadas.⁸⁶

Los carbonos 5 y 14 de los anillos C-D respectivamente, son los únicos accesibles para posibles modificaciones en la estructura original (Figura 10).

Crothers y Crow describieron la actividad de una serie de análogos sustituidos en C-14 con una considerable disminución de la actividad.⁸⁷

Las alteraciones en C-5 han demostrado cierta flexibilidad, mientras grupos funcionales tipo hidroxilo, hidroximetilo, y acetoxi no mostraron actividad antineoplásica en ninguna línea tumoral,⁸⁸ sustituciones de grupos alcoxi eran bien toleradas siempre y cuando estuvieran acompañadas por adiciones de grupos hidroxilo o nitro en la quinolina.⁸⁹

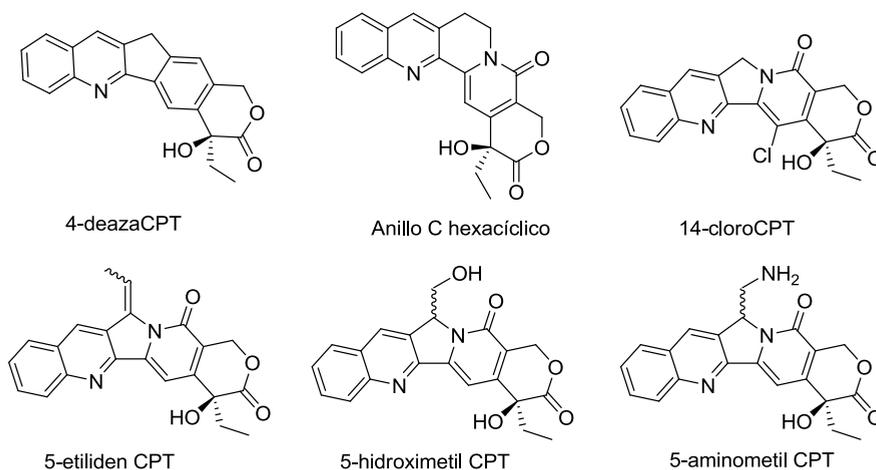


Figura 10. Análogos sustituidos en los anillos C-D.

- 86 (a) Ihara, M.; Noguchi, K.; Ohsawa, T.; Fukumoto, K.; Kametani, T. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 3150. (b) Kurihara, T.; Tanno, H.; Takemura, S.; Harusawa, S. *J. Heterocycl. Chem.* **1993**, *30*, 643.
- 87 Crow, R. T.; Crothers, D. M.; *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 4160.
- 88 Sawada, S.; Nokata, K. I.; Furuta, T.; Yokokura, T.; Miyasaka, T. *Chem Pharm. Bull.* **1991**, *39*, 2574.
- 89 Subrahmanyam, D.; Sarma, V. M.; Venkateswarlu, A.; Sastry, T. V.; Kulakarni, A. P.; Rao, D. S.; Reddy, K. V. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2013.

Por otro lado, Terasawa y *col.* publicaron resultados *in vitro* de análogos 5-etilidenos sobre líneas P388 aceptables.⁹⁰ Este resultado, junto a la actividad mostrada por ésteres fluoroetilados parece indicar que las modificaciones en C5 son relativamente favorables cuando la planaridad de la estructura es levemente alterada. Sin embargo, la exclusividad de estas alteraciones y la reducida actividad que han presentado sus derivados han hecho que alteraciones en estas posiciones no sean interesantes a la hora de desarrollar nuevas estructuras con potencial clínico.

6.3. Modificaciones en el anillo E

Las alteraciones realizadas en el anillo de lactona han servido para subrayar la importancia del grupo hidroxilactona en la actividad de la CPT.

Hertzberg y *col.* cambiaron la funcionalidad de la lactona por una lactama, hidrolíticamente más estable, y de igual modo, sintetizaron derivados con grupos carbinol lactama, tiolactonas e imidas, pero en todos los casos los resultados mostraron una clara inactividad frente a la inhibición de la Topo I⁹¹ (Figura 11).

La estereoquímica del C-20 ha demostrado ser crucial, ya que la forma racémica “R” de la CPT, es completamente inactiva.⁹² Se ha planteado por algunos autores, que el grupo hidroxilo, además de los enlaces con la Topo I y el ADN, podía ser susceptible de formar puentes de hidrógeno intramoleculares con el carbonilo de la lactona, siendo ambas premisas, esenciales para “fijar” el anillo E en el proceso de estabilización del complejo ternario.⁹³

90 Sugimori, M.; Ejima, A.; Oshuki, S.; Matsumoto, K.; Kawato, Y.; Yasuoaka, M.; Tagawa, H.; Terasawa, H. *Heterocycles* **1994**, *38*, 81.

91 Hertzberg, R. P.; Caranfa, M. J.; Holden, K. J.; Jakas, D. L.; Gallager, G.; Mattern, M. R.; Jonhson, R.K.; Kingsbury, W. D. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 715.

92 Wall, M. E.; Wani, M. C.; Nicholas, A. W.; Manikumar, G.; Tele, C.; Besterman, J. M. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 2689.

93 (a) Wang, X.; Zhou, X.; Hecht, S. M. *Biochemistry* **1999**, *38*, 4374. (b) Fan, Y.; Weinstein, J. N.; Kohn, K. W.; Shi, L. M.; Pommier, Y. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2216.

En este sentido, sustituciones como 20-amino, 20-cloro/bromo o 20-deoxi, donde el carácter dador-aceptor de puentes de hidrogeno es diferente al hidroxilo de la CPT, mostraron mínima estabilización del complejo ternario (Figura 11).

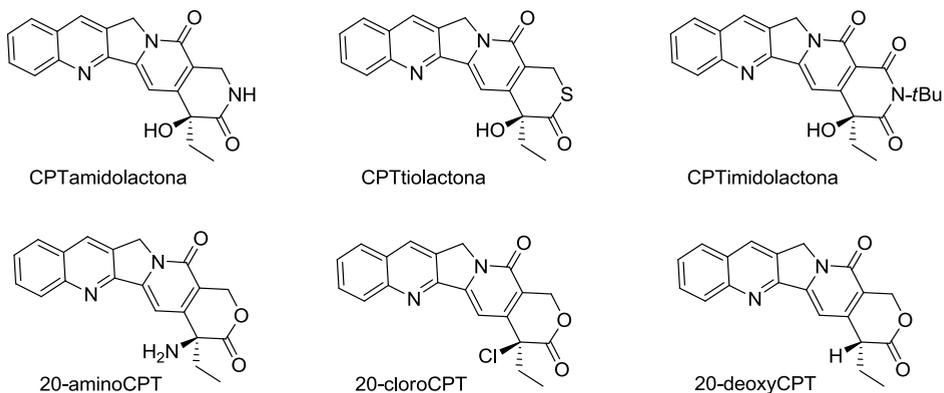


Figura 11. Análogos sustituidos en el anillo E.

La sustitución del grupo α -hidroxilactona por su homólogo β -hidroxilactona fue publicada por primera vez por Lavergne y col.⁹⁴ (Figura 12). El derivado obtenido, HomoCPT, presentó elevada actividad antitumoral y potente capacidad de inhibir la topo I, además, la presencia de un anillo E de siete miembros aumentaba la estabilidad de la forma de lactona por encima de las 24h. a pH fisiológico.

94 Lavergne, O.; Lesueur-Ginot, L; Pla, Rodas, F.; Bigg, D. *Bioog. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 2235.

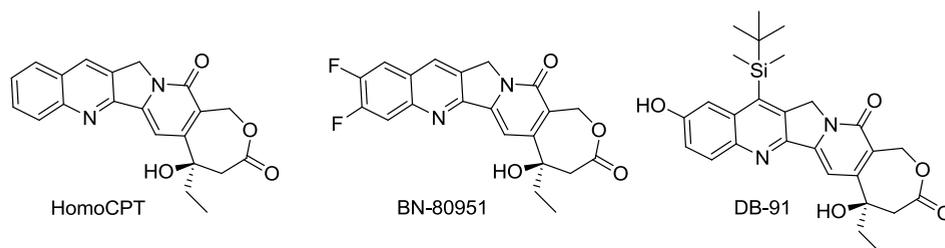


Figura 12. HomoCPT y derivados.

La eficacia de este tipo de modificación condujo al desarrollo y estudio de numerosos nuevos derivados.⁹⁵ Entre estos, el 10,11-difluorohomoCPT (BN-80915) se encuentra actualmente en fase II para cáncer de pulmón de células pequeñas.⁹⁶

Curran y *col.* introdujeron grupos funcionales sililados en el esqueleto homoCPT, dando lugar a compuestos altamente lipofílicos con elevada estabilidad en plasma. El análogo 10-hidroxi-7-(tert-butildimetilsilil)homoCPT (DB-91) (Figura 12) fue sometido a estudios comparativos con su homólogo DB-67 (Tabla 1) para establecer posibles correspondencias entre las lactonas de seis o siete miembros en compuestos sililados. Los resultados determinaron que, aunque el tiempo de vida media *in vivo* del DB-91 era considerablemente mayor, su actividad antitumoral, tanto *in vitro* como *in vivo*, era mucho más limitada que la mostrada por la estructura lactonizada de seis miembros.⁹⁷

95 Lavergne, O.; Lesueur-Ginot, L.; Pla, Roda, F.; Kaprzyk, P. G.; Pommier, J.; Demarquay, D.; Prévost, G.; Ulibarri, G.; Rolland, A.; Schiano, L. A.; Harnet, J.; Pons, D.; Camara, J.; Bigg, D. C. H. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 5410. (b) Garbada, A. E.; Du, W.; Isarno, T.; Tangirala, R. S.; Curran, D. P. *Tetrahedron*, **2002**, *58*, 6329. (c) Wall, M. E.; Wani, M. C.; Nicholas, A. W.; Manikumar, G.; Tele, C.; Moore, L.; Trueslade, A.; Leitner, P.; Besterman, J. M. *J. Med. Chem* **1993**, *36*, 2689.

96 www.clinicaltrials.gov identifier number: NCT00080015. “*Diflomotecan (BN80915) Administered Once Every 3 Weeks in Treating Patients With Sensitive Small Cell Lung Cancer (SCLC)*”.

97 Yeh, T.-K.; Li, C.-M.; Chen, C.-P.; Chuu, J.-J.; Huang, C.-L.; Wang, H.-S.; Shen, C.-C.- Lee, T.Y.; Chang, C.-Y.; Chang, C.-M.; Chao, Y.-S.; Lin, C.-T.; Chen, C.-T. *Pharmacol. Res.* **2010**, *61*, 108.

El extenso trabajo realizado hasta la fecha con la CPT en términos de relacionar su estructura química con su actividad antitumoral demuestra el interés que ha despertado su potencial terapéutico. Según los estudios publicados hasta el momento se puede concluir que: *a)* los anillos CDE son necesarios e inalterables tanto en configuración como en estructura química, salvo la excepción, de la posible sustitución del anillo de lactona de seis miembros por su homólogo de siete, *b)* las posiciones 7 y 9 son potencialmente modificables, *c)* las posiciones 10 y 11 son alterables excepcionalmente, siendo preferente la introducción de un nuevo ciclo no aromático entre ambas (Figura 13).

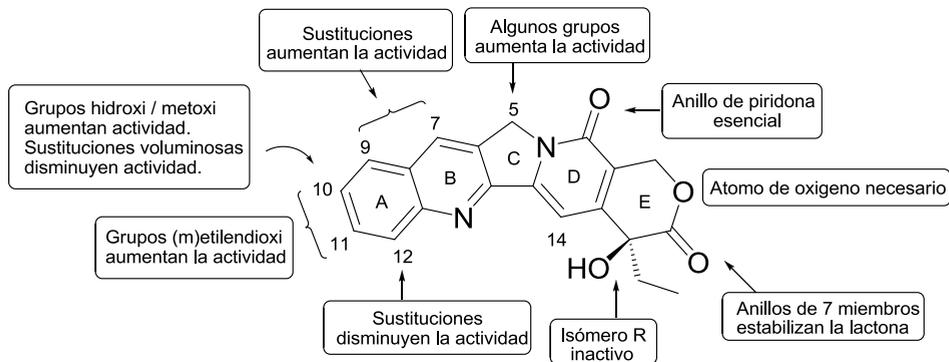


Figura 13. Esquema general de la estructura y modificaciones en la CPT frente a la actividad.

7. Estudios semisintéticos para la obtención de derivados de CPT

Frente a la síntesis total o convergente, compleja y en muchos casos de bajo rendimiento, los procedimientos semisintéticos han permitido obtener numerosos derivados de una gran variedad de fármacos de forma efectiva, fiable y directa.⁹⁸ Todos los análogos de CPT que han alcanzado fases clínicas avanzadas, así como los finalmente aprobados por las agencias reguladoras, Topotecan e Irinotecan, pueden obtenerse mediante procesos semisintéticos centrados en modificaciones 7, 9 y 10 a partir de CPT, SN38 o 10-hidroxiCPT (10HCPT).

Las posiciones restantes han sido alteradas en menor medida debido a la menor actividad mostrada.

7.1. Reactividad de la posición 10

Prácticamente la totalidad de las modificaciones realizadas en C-10 se obtienen a partir del derivado 10-hidroxycamptotecina (10HCPT).

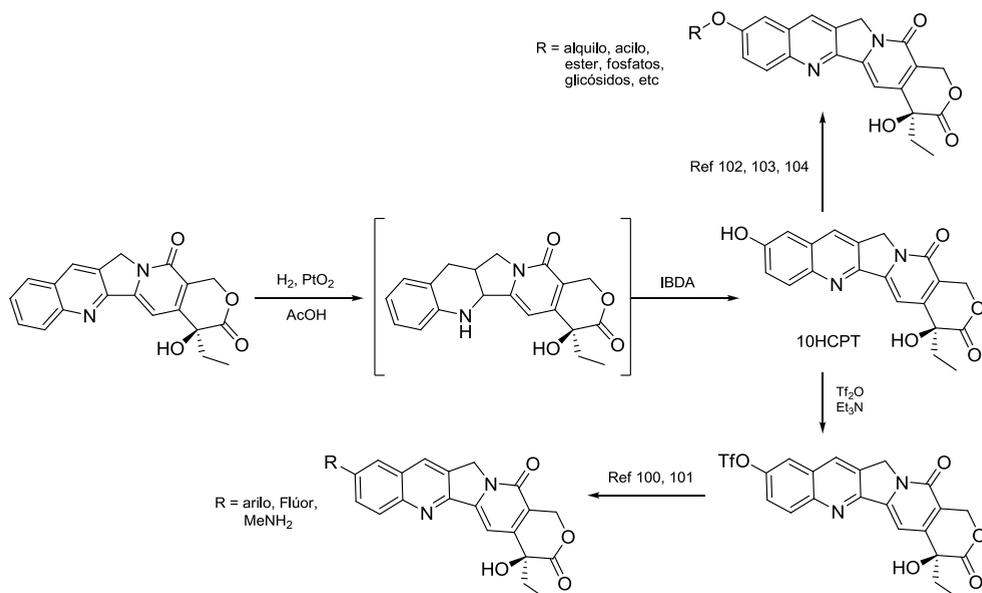
La preparación de este compuesto ha sido optimizada y actualmente se desarrolla exclusivamente mediante dos posibles rutas semisintéticas, la primera es la hidrogenación catalítica de la CPT y su posterior oxidación en una secuencia one-pot,⁹⁹ y la segunda, menos extendida, es un proceso fotoquímico a partir del N-óxido de CPT.¹⁰⁰

98 (a) Gennari, C.; Vulpetti, A.; Donhi, M.; Mongelli, N.; Vanotti, E. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1723. (b) Acton, N. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 790. (c) Kim, N-C.; Kinghorn, D.; Darrick, S. H. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 223. (d) Journet, M.; Cai, D.; DiMichele L. M.; Hughes, D.L.; Larsen, R. D.; Verhoeven, T. R.; Reide, P. J. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2411. (e) Hofle, G.; Bohlendorf, B.; Fecker, T.; Sasse, F.; Kunze, B. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1967. (f) Brandt, G. E. L.; Schmidt, M. D.; Prisinzano, T. E.; Blagg, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6495.

99 (a) Woob, J. L.; Fortunak, J. M.; Mastrocola, A. R.; Mellinger, M.; Burk, P. L. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 5739. (b) Sekhar, N. M.; Anjaneyulu, Y.; Acharyulu, P. V. *Synth. Comm.* **2011**, *41*, 2828. (c) Fu, Q.; Chen, Z. *Synthesis* **2006**, *12*, 1940.

100 Xu, C. Y.; Huang, M. Z. *Chin. Chem. Lett.* **2006**, *17*, 883.

Posteriormente, el grupo hidroxilo ha sido modificado con multitud de grupos funcionales, para obtener, 10-AriloCPTs, mediante condiciones de Suzuki,¹⁰¹ 10-FluoroCPT previa estannalización,¹⁰² 10-MetilaminoCPT a partir del triflato,¹⁰³ 10-EtoxiCPTs,¹⁰⁴ así como la incorporación de unidades fosfato, sulfato o glicósidos,¹⁰⁵ entre otras modificaciones (Esquema 11).



Esquema 11. Proceso semisintético para la obtención de derivados de CPT sustituidos en posición 10.

101 Jiao, Y.; Liu, H.; Geng, M.; Duan, W. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 2071.

102 Furuya, T.; Strom, E.; Ritter, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1662.

103 Shu, A. Y. L.; Jakas, D.; Heys, R. *J. Label. Comp. Radiopharm.* **1990**, *11*, 1265.

104 Li, Q.; Zu, Y.; Shi, R.; Yao, L.; Fu, Y.; Yang, Z.; Li, L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *14*, 7175.

105 Yaegashi, T.; Nokata, K.-I.; Sawada, S.; Furuta, T.; Yokokura, T.; Miyasaka, T. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 131.

7.2. Reactividad de la posiciones 5 y 14

Las modificaciones en C-5 y C-14 son muy limitadas mediante procesos semisintéticos. 5-hidroxiCPT y 5-alcoxiCPT se obtienen haciendo reaccionar el alcaloide en medio alcohólico con tricloruro de hierro y ácido sulfúrico, obteniéndose aminoalquilaciones a partir de la forma hidroxilada en condiciones básicas¹⁰⁶ (Esquema 12). 5-FluoroCPT y grupos electrófilos fueron incorporados en la misma posición, en un único paso, por Zunino y col.¹⁰⁷

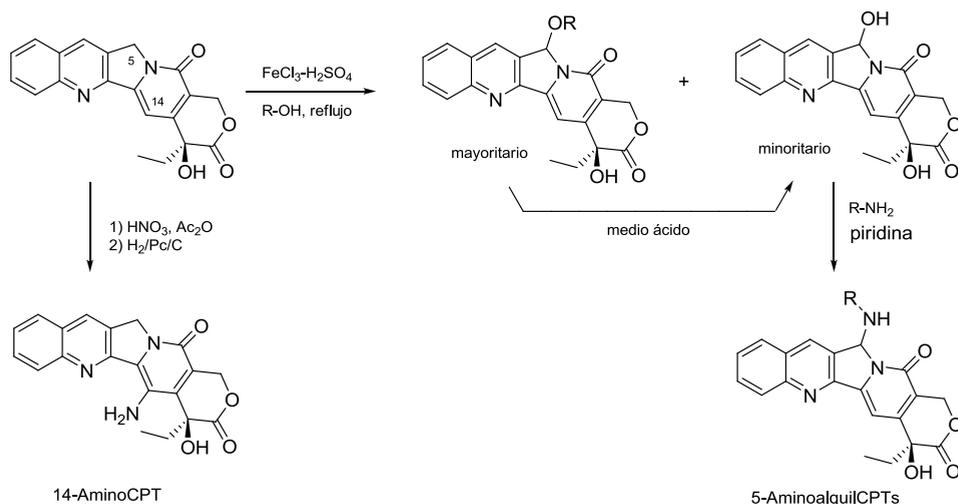
La nitración de C-14 fue publicada por primera vez haciendo reaccionar CPT con exceso sales de nitronio tetrafluoroboradas en anhídrido acético, sin embargo, el rendimiento era del 20% y siempre se obtenía el alcaloide acetilado.¹⁰⁸ Recientemente, la compañía Threshold Pharma observó, que en presencia de ácido nítrico y en ausencia de sales, se obtenía, regioselectivamente, 14-nitroCPT, de forma cuantitativa (Esquema 12). La posterior reducción en condiciones estándar permitía obtener el compuesto aminado que ha demostrado un excelente perfil terapéutico en ensayos *in vitro* e *in vivo*.¹⁰⁹

106 Subrahmanyam, D.; Sarma, V. M.; Venkateswarlu, T.; Sastry, T. V. R. S.; Kulakarni, A. P.; Srivinas, R. A.; Reddy, K. V. R. S. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, 7, 2013.

107 Samori, C.; Guerrini, A.; Varchi, G.; Fontana, G.; Bombardelli, E.; Tinelli, S.; Beretta, G. L.; Zunino, F.; Battaglia, A. *J. Med. Chem.* **2009**, 26, 1029.

108 Cao, Z. *J. Chem. Perkin, Trans.* **1996**, 1, 2629.

109 Duan, J.-X.; Cai, X.; Meng, F.; Sun, J.; Liu, Q.; Jung, D.; Jiao, H.; Matteuci, J.; Jung, B.; Bhupathi, D.; Ahluwalia, D.; Matteuci, M. *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 1715.



Esquema 12. Semisíntesis de 14-AminoCPT y derivados 5-AminoalquilCPTs.

7.3. Reactividad del anillo E de la lactona

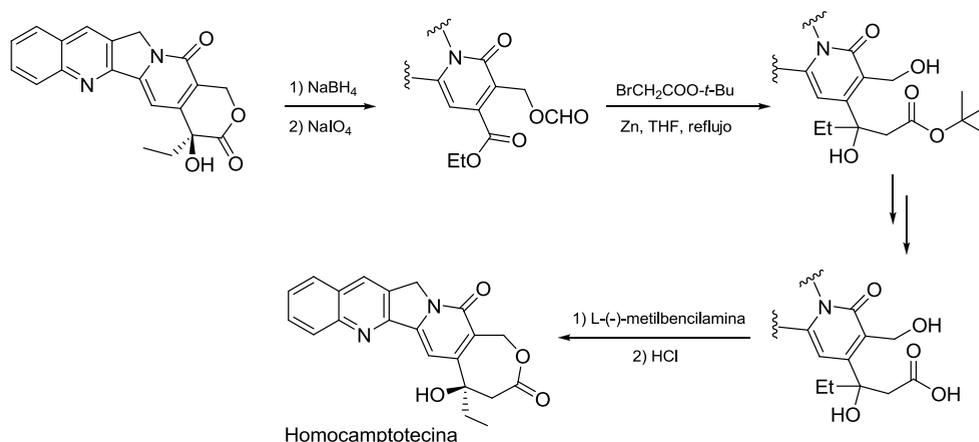
Al igual que las posiciones 14 y 5, la demostrada necesidad de mantener el anillo de lactona intacto para preservar la actividad antitumoral de los derivados de CPT, ha condicionado el reducido número de metodologías desarrolladas para alterar el anillo E.

La elevada estabilidad química *in vivo* demostrada por la familia de las homoCPTs llevó al desarrollo de una secuencia semisintética capaz de aislar el derivado con rendimientos aceptables (42%).

La reducción con borohidruro sódico de CPT proporciona el correspondiente 1, 2-diol, que es oxidado con ácido periódico para dar cetoformiloxi-mapicina. La reacción de Reformatsky con bromoacetato de *t*-butilo permite aislar el β-hidroxiéster, cuyo tratamiento con ácido trifluoroacético dio homoCPT.¹¹⁰

110 Lavergne, O.; Leseur- Ginot, Roadas, F. P.; Bigg, D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 2235.

La propuesta semisintética puede, en principio, ser aplicada sobre cualquier sustitución presente en el esqueleto de la CPT (Esquema 13).¹¹¹



Esquema 13. Semisíntesis de homocamptotecina.

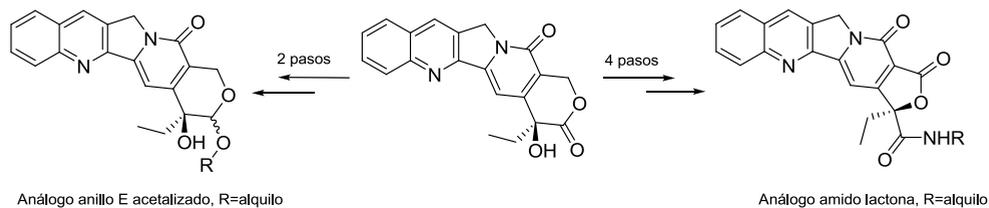
Más recientemente, intentos para ensayar la actividad de anillos lactónicos, estructuralmente diferentes, de forma rápida y concluyente, han fructificado gracias a rutas semisintéticas capaces de aislar análogos de lactonas de cinco miembros con amido modificaciones en posición γ ampliamente modificables (Esquema 14).¹¹²

Del mismo modo, sustituciones del carbonilo 21 por grupos alcóxidos permite obtener derivados acetálicos de forma eficiente¹¹³ (Esquema 14).

111 Govindachari, T. R.; Ravindranath, K.; Viswanathan, N. *J. Chem. Soc. Perk. Trans. 1* **1974**, 1215.

112 Li, M.; Tang, W.; Zeng, F.; Lou, L.; You, L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 6441.

113 Zu, L.; Zhuang, C.; Lei, N.; Guo, Z.; Sheng, C.; Dong, G.; Wang, S.; Zhang, Y.; Yao, J.; Miao, Z.; Zhang, W. *Eur. J. Med Chem.* **2012**, *56*, 1.



Esquema 14. Procesos semisintéticos para la modificación del anillo E.

7.4. Reactividad de la posición 7

De acuerdo con la reactividad del núcleo de quinolina, la posición 7 es claramente reactiva mediante un procedimiento semisintético radicalario de tipo Minisci.¹¹⁴ La reacción de Minisci se considera un proceso esencial a la hora de obtener derivados de CPT con alteraciones en C-7.

La extraordinaria eficacia y amplias posibilidades que ofrece la metodología han permitido obtener multitud de derivados con sustituyentes de diferente naturaleza con extraordinario potencial terapéutico. De esta manera, alquilaciones,¹¹⁵ acilaciones,¹¹⁶ hidroxialquilaciones,¹¹⁷ aminoalquilaciones,¹¹⁸ entre otras, se obtienen en un único paso, con rendimientos elevados (Esquema 15).

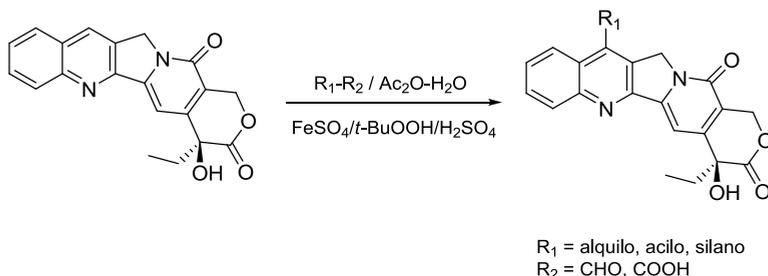
114 (a) Minisci, F.; Bernardi, R.; Bertini, F.; Galli, R.; Perchinummo, M. *Tetrahedron* **1971**, *27*, 3575. (b) F. Fontana, F. Minisci, M. C. N. Barbosa, E. Vismara *J. Org. Chem* **1991**, *56*, 2866. (c) Ducton, M. A. *J. Med. Chem. Comm.* **2011**, *2*, 1135.

115 Wang, X.; Wen, J.; Li, G.; You, T. *Synth. Commun.* **2005**, *35*, 3163.

116 Liu, Y.-Q.; Dai, W.; Wang, C.-Y.; Morris, S. L.; Zhou, X.-Z.; Li, W.-Q.; Lee, K.-H. *Bioorg. Med. Chem Lett.* **2012**, *22*, 7659.

117 Sawada, S.; Nokata, K.-I.; Furuta, T.; Yokokura, T.; Miyasaka, T. *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, *39*, 2574.

118 Xie, Z.-F.; Ootsu, K.; Akimoto, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 2189.



Esquema 15. Reacción general de Minisci sobre el sustrato de CPT.

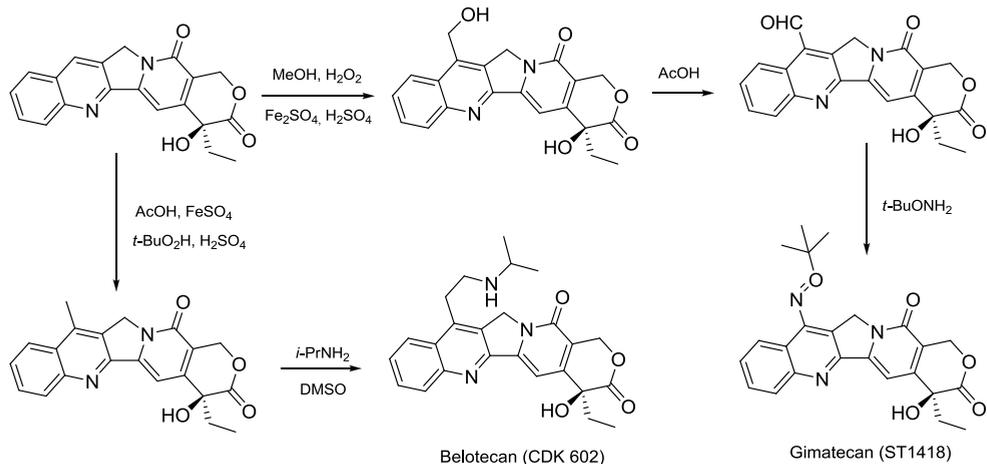
El Gimatecan (ST1481) es un derivado lipofílico de CPT que ha demostrado amplia actividad antitumoral, tanto en administración oral como intravenosa, en fases I y II en gliomas y tumores sólidos respectivamente.¹¹⁹

Merlini y *col.* diseñaron su semisíntesis a partir del análogo hidroximetilado, obtenido por reacción de Minisci y posterior tratamiento en condiciones ácidas para obtener el aldehído que finalmente es condensado para aislar Gimatecan con un 87% de rendimiento (Esquema 16).¹²⁰ Esta ruta de formilación en posición 7 ha sido extensamente utilizada para obtener ariliminometil¹²¹ y oxiiminometilderivados.¹¹⁸

119 (a) Supko, J. G.; Alderson, L.; Wen, P.; Cassidy, K.; Pace, S.; Obrocea, M. *J. Clin. Oncol. ASCO Ann. Meeting Proc.* **2004**, 22, 2039. (b) Zhu, A. X.; Ready, N. E.; Clark, J. W.; Safran, H.; Lynch, T. J.; Carminati, P. *Proc. Am. Soc. Clin. Onco.* **2003**, 22, abst. 557. (c) Dallavalle, S.; Delsoldato, T.; Ferrari, A.; Merlini, L.; Penco, S.; Carenini, N.; Perego, P.; Pratesi, G.; Zunino, F. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 3963.

120 Dallavalle, S.; Ferrari, A.; Biasotti, B.; Merlini, L.; Penco, S.; Gallo, G.; Marzi, M.; Tinti, M. O.; Martinelli R.; Pisano, C.; Carminati, P.; De Cesare, M.; Pratesi, G.; Zunino, F. *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 3264.

121 Dallavalle, S.; Merlini, L.; Morini, G.; Musso, L.; Penco, S.; Beretta, G. L.; Tinelli, S.; Zunino, F. *Eur. J. Med. Chem.* **2004**, 39, 507.



Esquema 16. Procesos semisintéticos para la obtención de Gimitecan y Belotecan.

De igual interés, puede considerarse la actividad del derivado soluble en agua Belotecan, CDK-602. El fármaco ha alcanzado fase clínica II, para tumores de ovario, gástricos, cáncer de pulmón de células pequeñas y tumores cervicales, con resultados prometedores.¹²² Su proceso semisintético es una simple y sencilla secuencia de dos pasos con rendimientos superiores al 70%, donde intervienen la reacción de Minisci en MeOH y posterior reacción de Mannich en DMSO (Esquema 16).¹²³

La familia de los llamados, derivados de CPT silatecanos, aumentó considerablemente el carácter lipofílico de todos los análogos sintetizados hasta el

122 (a) Kim, H. K.; Bang, Y. J.; Heo, D. S.; Shin, S. G.; Kim, N. K. *Proc. Am. Soc. Clin. Onco.* **2002**, *21*, abst. 393. (b) Song, Y.; Seo, S. S.; Bang, S. B.; Kang, S. B.; Nam, J. H.; Ryu, S. Y. *Proc. Am. Soc. Clin. Onco.* **2003**, *22*, abst. 1877. (c) Lee, J. H.; Lee, S. J.; Yeol, R. B.; park, K.; Kim, N. K. *Proc. Am. Soc. Clin. Onco.* **2004**, *22*, abst. 7210. (d) www.clinicaltrials.gov identifier number: NCT00430144. “Belotecan (CKD-602) in Recurrent or Progressive Carcinoma of Uterine Cervix”.

123 Ahn, S. K.; Choi, N. S.; Jeong, B. S.; Kim, K. K.; Journ, D. J.; Kim, J. K. *J. Heterocycl. Chem.* **2000**, *37*, 1141.

momento, proporcionando una mejoría en la biodisponibilidad y en la farmacocinética.

Dos derivados de esta familia han sido ampliamente estudiados y han alcanzado fases clínicas avanzadas. Karenitecin® (BNP1350), ha sido desarrollado por la compañía BioNumerik utilizando un único paso según la alquilación de Minisci con rendimientos superiores al 50%.¹²⁴

El compuesto ha alcanzado cinco fases II, entre las que se encuentran, melanoma metastásico, cáncer de ovario avanzado, tumores cerebrales, etc, y una fase III para cáncer de ovario epitelial.¹²⁵

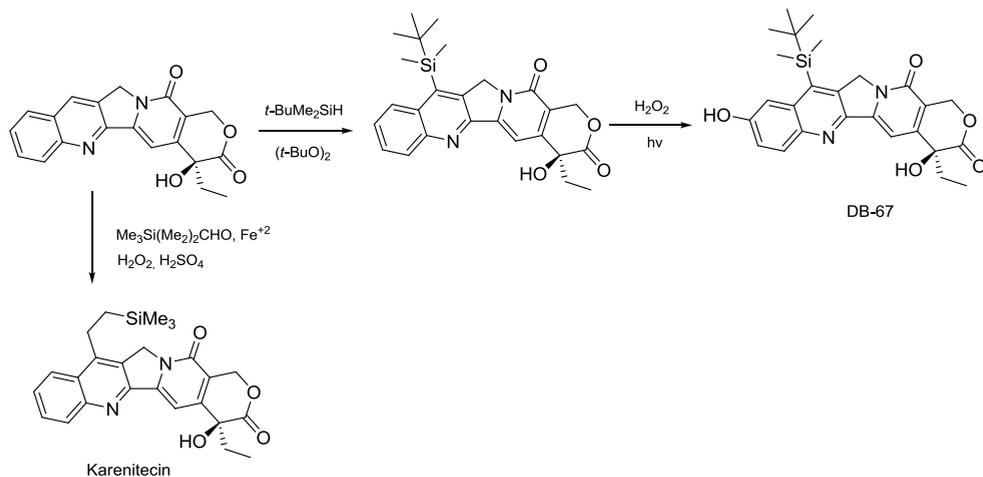
El derivado DB67, en estudios clínicos actualmente,¹²⁶ se obtiene directamente desde la CPT via sililación radicalaria en presencia de tiol, posterior oxidación e irradiación en dioxano. Sin embargo, el rendimiento total de la semisíntesis en estas condiciones es reducido (20%) (Esquema 17).¹²⁷

124 Haridas, K.; Hausheer, F. H. *U. S. patent 6057303*, **2000**.

125 (a) Daud, A.; Valkov N.; Centeno, B.; Derderian, J.; Sullivan, P.; Munster, P.; Urbas, P.; Deconti, R.C.; Berghorn, E. *Clin. Cancer. Res.* **2005**, *15*, 3009. (b) Kavanagh, J. J.; Sill, M. W.; Ramirez, P. T.; Warshal, D.; Pearl, M. L.; Morgan, M. A. *Int. J. Gynecol. Cancer.* **2008**, *18*, 460. (c) www.clinicaltrials.gov identifier number: NCT00054119. “*Karenitecin in Treating Patients With Persistent or Recurrent Ovarian Epithelial Cancer or Primary Peritoneal Cancer*”.

126 www.clinicaltrials.gov identifier number: NCT00389480. “*Study of AR-67 (Formerly DB-67) in Adult Patients With Refractory or Metastatic Solid Malignancies*”.

127 Du, W.; Kaskar, B.; Blumbergs, P.; Subramanian, P. K.; Curran, D. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *11*, 451.



Esquema 17. Proceso semisintético para la obtención de Karenitecin y DB67.

Si bien la metodología radicalaria puede considerarse la más aplicada por su potencial reactividad, interesantes modificaciones se han podido llevar a cabo mediante la activación de la posición 7 a partir del N-óxido de la quinolina de la CPT. La regioselectividad obtenida permite halogenar C-7 que es utilizado como material de partida en reacciones de acoplamiento de Sonogashira o de Suzuki para introducir unidades alquílicas¹²⁸ o heterociclos¹²⁹ respectivamente, así como aminosustituciones y reacciones de tipo click.¹³⁰

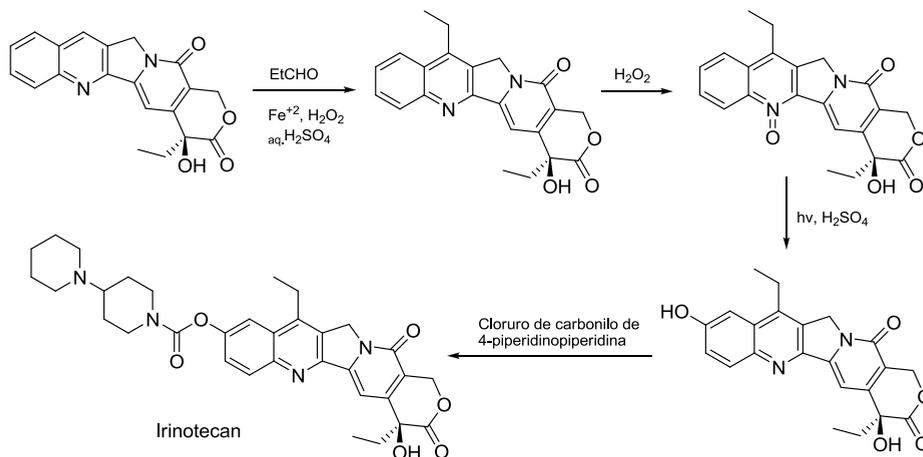
Posiblemente, junto con la obtención del derivado Karenitecin y del Topotecan, uno de los ejemplos más evidentes del potencial de las metodologías semisintéticas, dentro del campo de las CPTs, sea la obtención de Irinotecan. El profármaco se aísla en una secuencia de cuatro pasos, donde el grupo etilo se introduce en posición 7 mediante reacción de Minisci, posteriormente el grupo

128 Luo, Y.; Gao, H.; Li, Y.; Huang, W.; Lu, W.; Zhang, Z. *Tetrahedron*, **2006**, 62, 2465.

129 Wang, L.; Huang, Y.; Zhang, J.; Tong, L.; Chen, Y.; Lu, W.; Huang, Q. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, 24, 1597.

130 Wang, L.; Yuan, W.; Zhang, J.; Tong, L.; Luo, L.; Chen, Y.; Lu, W.; Huang, Q. *Chin. J. Chem.* **2014**, 32, 157.

hidroxilo mediante una reacción fotoquímica desde la forma N-óxido y finalmente la unidad piperopiperacina mediante acilación, obteniendo el análogo con rendimientos del 65% desde la CPT (Esquema 18).¹³¹



Esquema 18. Semisíntesis de Irinotecan (Camptosar®).

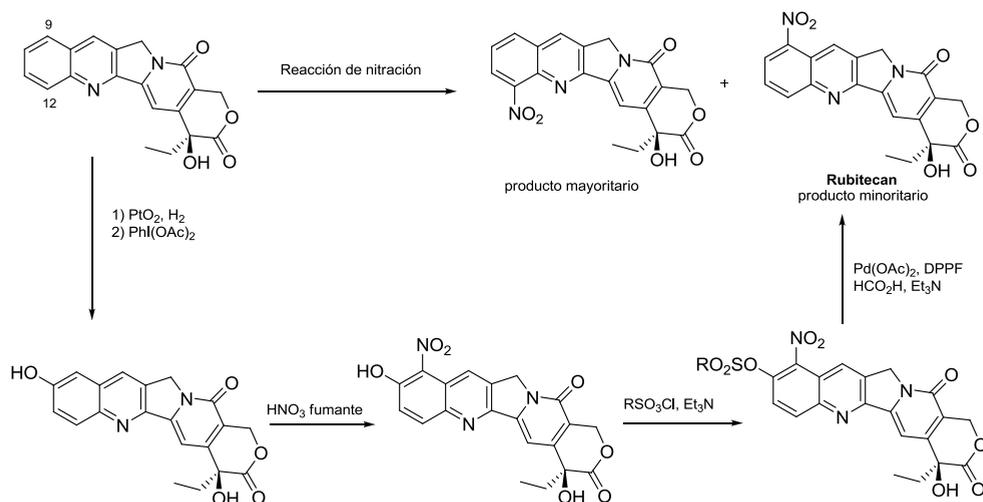
7.5. Reactividad de la posición 9

Al contrario que ocurre con la posición 7, las modificaciones en C-9, requieren una sustitución electrofílica en una posición desactivada, que generalmente da lugar a reacciones con mínimos rendimientos y mezclas de sustituciones en posición 12. Para evitar esta falta de selectividad, las reacciones se realizan usando como reactivo de partida 10HCPT, donde el grupo hidroxilo aumenta la reactividad del anillo A. Sin embargo, la naturaleza de los sustituyentes que se han podido introducir hasta el momento en C-9 es extremadamente limitada.

131 (a) Sawada, S.; Yokokura, T.; Miyasaka, T. *Ann. NY. Acad. Sci.* **1996**, 803, 13. (b) Sawada, S.; Okayima, S.; Aiyama, R.; Nokata, K.; Furuta, T.; Yokokura, T.; *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, 39, 1446.

El derivado 9-nitroCPT (Rubitecan, Orathecín[®]), es un claro ejemplo de la ausencia de regioselectividad a la hora de abordar las modificaciones en dicha posición. La nitración convencional con ácido nítrico y sulfúrico da lugar al derivado sustituido en C-9 con bajos rendimientos (menos del 10%) y compleja purificación.¹³² Resultados semejantes se han obtenido utilizando nitrato potásico y nitrato de Talio (KNO₃/TlNO₃) como agentes nitrantes en ácido sulfúrico concentrado.¹³³

La alternativa a este proceso consiste en la obtención de la 10HCPT mediante una secuencia de reducción-oxidación utilizando CPT como material de partida. La nitración permite aislar el análogo 9-nitro-10-HCPT con un 80% de rendimiento. Posterior sulfonación y reducción selectiva con acetato de paladio permite obtener el compuesto deseado con un rendimiento total del 45% (Esquema 19).¹³⁴



Esquema 19. Proceso semisintético y optimización para la obtención del Rubitecan.

132 Wani, M. C.; Nicholas, A. W.; Wall, M. E. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 2358.

133 Cao, Z.; Armstrong, K.; Shaw, M.; Petry, E.; Harris, N. *Synthesis*, **1998**, *12*, 1724.

134 (a) Cabri, W.; Candiani, I.; Zarini, F.; Penco, S.; Bedeschi, A. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 9197.
(b) Fu, Q. Q.; Chen. *Z. Synthesis* **2006**, *12*, 1940.

Los ensayos clínicos del Rubitecan alcanzaron numerosas fases I y II para tratamientos de cáncer de pulmón, próstata, ovario, estómago, leucemia y melanomas, entre otros,¹³⁵ llegando a alcanzar fase III y estatus de “medicamento huérfano”¹³⁶ para tumores de páncreas.¹³⁷

La transposición de Claisen,¹³⁸ ha sido aplicada para la introducción de pequeños grupos alquílicos en posición 9.

De esta manera, grupos etilo, alilo, propilo, etc, son añadidos de forma sencilla en secuencias de dos o tres pasos con rendimientos aceptables a partir de 10HCPT (Esquema 20). Estudios biológicos centrados en este tipo de modificaciones, demostraron que el derivado 9-alil-10HCPT, también llamado Chimmitecan,¹³⁹ presentaba actividad antitumoral, acumulación celular y datos

135 Schoffski, P.; Claus, Y.; Herr, A.; Vermorken, J. B.; Beijnen, J. H.; Volk, J.; Ganser, A.; Adank, S.; Botma, H. J. *Eur. J. Cancer* **2002**, *38*, 807. (b) Baka, S.; Ranson, M.; Lorigan, P.; Danson, S.; Linton, K.; Mettinger, K.; Thatcher, N. *Eur. J. Cancer*. **2005**, *41*, 1547. (c) www.clinicaltrials.gov identifier number: NCT00005875. “*Nitrocamptothecin in Treating Patients with Metastatic Melanoma*”. (d) www.clinicaltrials.gov identifier number: NCT00005876. “*Nitrocamptothecin in Treating Patients With Locally Advanced or Metastatic Stomach Cancer that cannot be Removed During Surgery*”. (e) www.clinicaltrials.gov identifier number: NCT00006230. “*Nitrocamptothecin in Treating Patients With Advanced Ovarian Cancer*”.

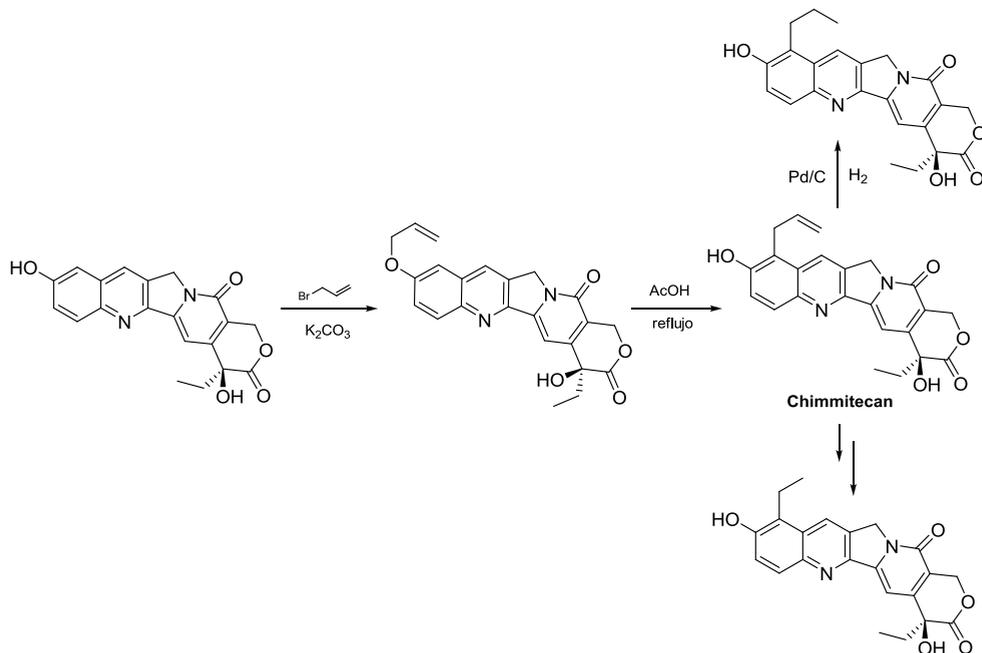
136 Medicamento destinado a establecer un diagnóstico, prevenir o tratar una enfermedad que afecte a menos de cinco personas por cada diez mil en la U. Europea. Medicamento destinado a establecer un diagnóstico, prevenir o tratar una enfermedad que en la actualidad no tenga tratamiento efectivo.

137 (a) Jacobs, A. D.; Burris, H. A.; Rivkin, P. S.; Ritch, P. D.; Eisenberg, P. S. *J. Clin. Onco.* **2004**, *22*, 4013. (b) Papish, S. W.; Ramanathan, J.; Pincus, M.; Hirmand, H.; Burris, H. A.; *J. Clin. Onco.* **2005**, *23*, 4165.

138 (a) Claisen, L. *Chem. Berichte* **1912**, *45*, 3157. (b) Rhoads, S. J.; Raulins, N. R. *Org. Lett.* **1975**, *22*, 1.

139 Huang, M.; Gao, H.; Chen, Y.; Joel, J.; Zhu, H.; Cai, Y.; Zhang, X.; Miao, Z.; Jiang, H.; Zhang, J.; Shen, H.; Lin, L.; Lu, W.; Ding, J. *Clin. Cancer. Res.* **2007**, *13*, 1298.

farmacocinéticos suficientemente válidos para iniciar ensayos clínicos en tumores sólidos.¹⁴⁰



Esquema 20. Proceso semisintético para la obtención de Chimmitecan y derivados 9-alkil sustituidos.

La reacción de Mannich¹⁴¹ ha dado lugar a una gran cantidad de derivados hidrosolubles mediante la introducción de aminometilaciones sobre el C-9 del sustrato de 10HCPT¹⁴² (Esquema 21).

140 www.clinicaltrials.gov identifier number: NCT01832298. “Study of Simmitecan Hydrochloride in the Treatment of Advanced Solid Tumor”.

141 (a) Mannich, C.; Krosche, W. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **1912**, 250, 647. (b) Mannich, C. *Arch. Pharm.* **1917**, 255, 261. (c) Thompson, B. B. *J. Pharm. Sci.* **1968**, 57, 715. (d) Roman, G. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 89, 743.

142 Kingsbury, W.; Boehm, J. C.; Jakas, D. R.; Holden, K. C.; Hecht, S. M.; Gallager, G.; Caranfa, M. J.; Faucette, L. F.; Jonhson, R.; Hertzberg, R. *J. Med. Chem.* **1991**, 34, 98.

OBJETIVOS I

Según los estudios mostrados en la sección anterior, las modificaciones en las posiciones 7 y 9 de la CPT se han confirmado como las más efectivas a la hora de mejorar las propiedades terapéuticas del alcaloide. Sin embargo, desde un punto de vista puramente sintético, introducir estas alteraciones en tales posiciones es notablemente diferente.

Más allá de los desarrollos estándar dirigidos hacia la obtención de derivados basados en reacciones ya descritas y extensamente estudiadas dentro del campo de las CPTs, el objetivo de esta parte de la presente tesis doctoral, se centrará en:

1-El desarrollo de una nueva ruta sintética, que sea capaz tanto de permitir la síntesis racional de una amplia variedad de nuevos compuestos de alto carácter lipofílico sustituidos en el C-9, como de aportar una metodología sencilla, eficaz y de alto rendimiento en concordancia con los procesos descritos a escala industrial para otros derivados de alto interés clínico.

2-El potencial terapéutico de los compuestos sintetizados bajo esta premisa se analizará en términos de actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo*, mientras la permeabilidad *in vitro* será ensayada ante una posible administración oral.

3-En esta misma línea de investigación, se estudiará la posible obtención de derivados hexacíclicos de CPT mediante rutas semisintéticas novedosas y de alto rendimiento y se procederá a la evaluación de la actividad antitumoral, estabilidad y biodisponibilidad oral.

RESULTADOS Y DISCUSION I

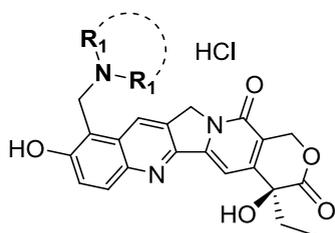
1. Derivados 9-amidometílicos y 9-imidometílicos de 20-(S)-Camptotecina

Resultados precedentes han demostrado que la introducción de grupos hidrofóbicos en la estructura de la CPT, proporcionan una rápida acumulación celular y aumentan la estabilidad del anillo de lactona.¹⁴⁸ Además, cálculos moleculares anteriormente publicados han demostrado la presencia de un extenso número de moléculas de agua en la interfase del complejo binario ADN-TopoI.¹⁴⁹ De esta manera, puede evidenciarse que el agua u otras interacciones por puentes de hidrógeno son, en cierta medida, responsables de estabilizar el complejo ternario, y por lo tanto, los análogos capaces de formar o permitir dichos enlaces deberían dar lugar a complejos ADN-TopoI-análogo más estables.

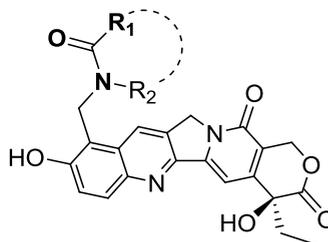
148 Bom, D.; Curran, D. P.; Chavan, A. J.; Kruszewski, S.; Zimmer, S. G.; Fraley, K. A.; Burke, T. *G. J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3018.

149 (a) Staker, B. L.; Hjerrild, K.; Feese, M. D.; Behnke, C. A.; Burgin Jr., A. B.; Stewart, L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2002**, *99*, 15387. (b) Wadkins, R. M.; Bearss, D.; Manikumar, G.; Wani, M. C.; Wall, M. E.; Von Hoff, D. D. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 6679

En consecuencia, consideramos que, la introducción de grupos amida o imida, en una posición favorable de la CPT, proporcionaría oxígenos carbonílicos capaces de actuar como aceptores de enlace de hidrógeno y mayor carácter hidrofóbico sobre la molécula. En este sentido, se planteó que, si la reacción de Mannich era eficaz para la obtención de derivados aminométicos hidrosolubles en posición 9, la reacción de Tscherniac-Einhorn (T-E), no ensayada anteriormente en este tipo de compuestos, proporcionaría una batería semejante de análogos con funcionalizaciones neutras de tipo amido e imidométicas con nuevas posibilidades frente a las interacciones moleculares



Derivados hidrofílicos
de Mannich



R₁= alquilo
R₂=H, alquilo,
carbonilo

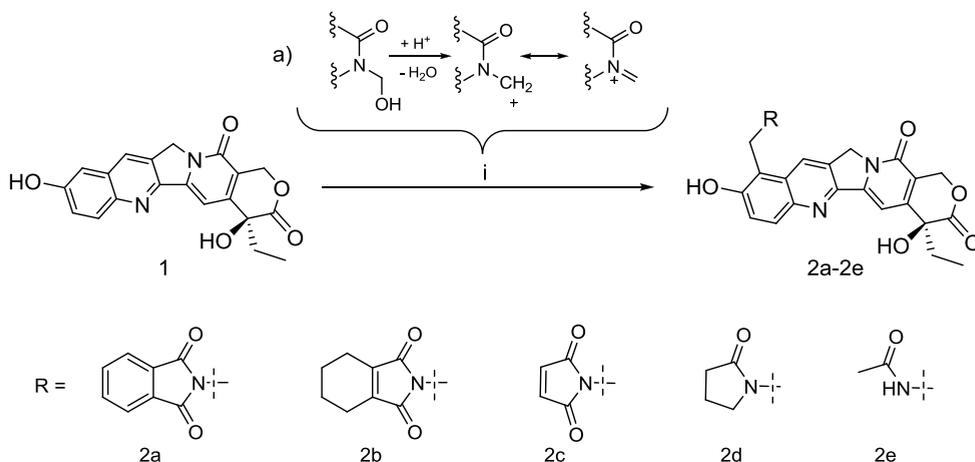
Derivados hidrofóbicos
de Tscherniac-Einhorn (T-E)

La reacción de T-E,¹⁵⁰ también considerada la condensación de iones metilenimonio con compuestos aromáticos en condiciones ácidas (Esquema 1, a)), si bien no es una reacción muy conocida, tiene un amplio espectro de aplicación en química orgánica para introducir grupos que, o son inaccesibles o bien requieren de muchos pasos para incorporarlos utilizando otras metodologías.¹⁵¹

150 Tramontini, M. *Synthesis* **1973**, 2, 703.

151 Olah, G. A.; Wang, Q.; Sandford, G.; Oxyzoglou, A. B.; Prakash, G. K. S. *Synthesis* **1993**, 11, 1077.

Esquema 1. Síntesis de 9-amidometil y 9-imidometil derivados de CPT. Formación y estabilización de los intermedios de T-E (reacción (a)).



^aReactivos y condiciones: (i) N-hidroximetilamida o N-hidroximetilimida, H_2SO_4 , de 0°C a temperatura ambiente.

Se sintetizaron nuevos derivados de CPT mediante una reacción directa utilizando 10HCPT (**1**) y N-hidroximetilamidas o N-Hidroximetilimidas como materiales de partida (Esquema 1). En primer lugar los iones metilenimonio se generaron insitu en exceso de ácido sulfúrico a 0°C , a continuación, **1** se introduce en estado sólido dejándose a temperatura ambiente y monitorizándose por TLC (Esquema 1*i*). Tras la finalización, el crudo se precipita añadiendo agua en baño de hielo y se filtra para su posterior purificación.

Es necesario señalar que la ausencia de disolvente es necesaria para que se produzca la reacción. Mientras que ácidos como el sulfúrico o el ácido triflico fueron igual de efectivos, la presencia de disolventes como DMF, AcOH, MeNO_2 , dioxano, etc, no dieron reacción o apenas se obtuvieron trazas de producto incluso a temperaturas elevadas. De igual modo, la reacción *one pot* de **1** con ftalamida y diferentes aldehídos fue infructuosa. Como esperamos, la reacción de T-E utilizando como producto de partida CPT, Rubitecan o 10-MetoxiCPT no dio lugar a ningún tipo de modificación.

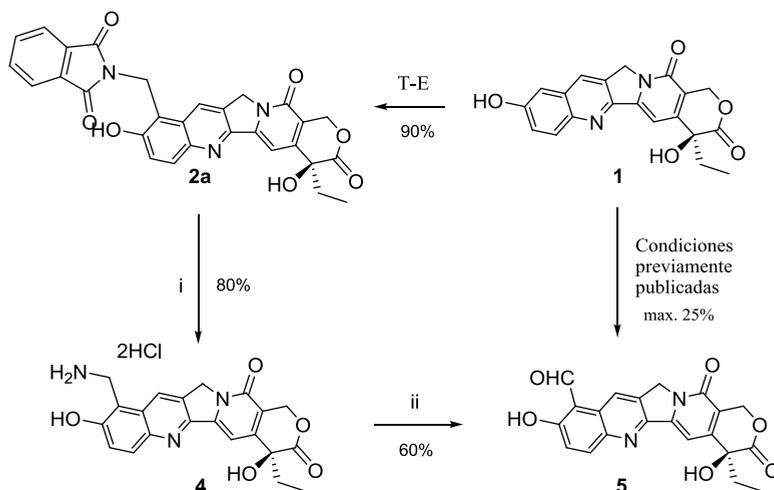
Para realizar un estudio sobre el tipo de sustitución más adecuado, se hizo reaccionar, N-hidroximetilftalimida, N-hidroximetil-3,4,5,6-tetrahydroftalimida, N-hidroximetilmaleimida, N-hidroximetil-2-pirrolidinona y N-hidroximetilacetamida, con el fin de incorporar imidas bicíclicas, amida cíclica y acetamida a la estructura de **1**. Los derivados obtenidos fueron sometidos a estudios *in vitro e in vivo* de citotoxicidad, así como estudios de permeabilidad sobre células Caco2 (ver posteriormente apartado 1.1, 1.2 y 1.3).

La dificultad para funcionalizar la posición 9 de la CPT se ha visto reflejada en diferentes investigaciones, por ejemplo, Dallavalle y col. publicaron la complejidad que supone obtener el derivado 9-formil-10-HCPT (**5**) desde **1** de forma eficiente.¹⁵²

El análogo **5** es un intermedio de alto interés, necesario para introducir modificaciones de diversas características como por ejemplo, imino sustituciones. Sin embargo, numerosas metodologías bien conocidas como la reacción de Duff, NaOH en cloroformo, la reacción con formaldehído y SnCl₄, o α,α -diclorometilmetileter y TiCl₄ han fallado o han dado rendimientos erráticos (Esquema 2).

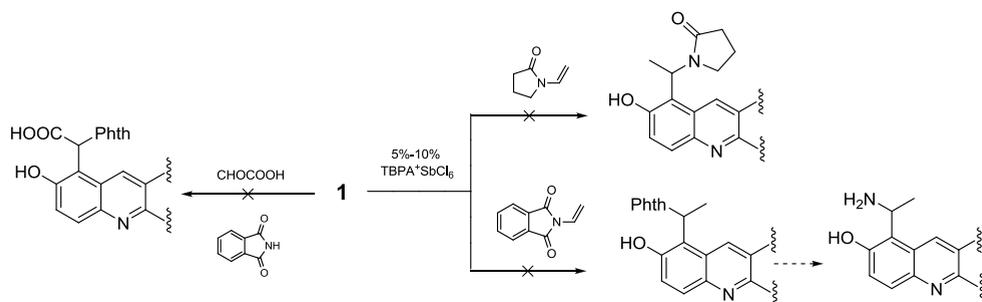
La reacción de T-E nos permitió funcionalizar la posición 9 de la CPT de forma efectiva y con amplio espectro de posibilidades químicas. Por ejemplo, el alto rendimiento con el que se obtiene el análogo 9-ftalimídico, **2a**, nos permitió aislar el derivado soluble en agua, 9-aminometil-10HCPT, **4**, y el compuesto formilado **5**, en una secuencia de dos pasos con un rendimiento total del 43%, mediante la eliminación del grupo ftalimida seguida de la reacción de Sommelet (Esquema 2).

152 Dallavalle, S.; Rocchetta, D. G.; Musso, L.; Merlini, L.; Morini, G.; Penco, S.; Tinelli, S.; Beretta, G. L.; Zunino, F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2781.

Esquema 2. Síntesis de 9-formyl-10HCPT^a

^aReactivos y condiciones: (i) HCl conc. reflujo 12h.; (ii) HOAc/H₂O, HMTA reflujo 4h.; H₃O⁺ reflujo 1h.

Desafortunadamente, la posibilidad de aumentar la diversidad de análogos con sustituyentes amidométicos mediante condiciones de alquilación de Friedel-Crafts con enamidas, efectiva sobre sustratos como el naftol,¹⁵³ fue ineficaz utilizando 6-hidroxiquinolina o **1** como moléculas de partida (Esquema 3).

**Esquema 3.** Semisíntesis no efectiva para la obtención de 9-metilamidometil derivados y 9-carboxiamido alquilaciones sobre 10HCPT.

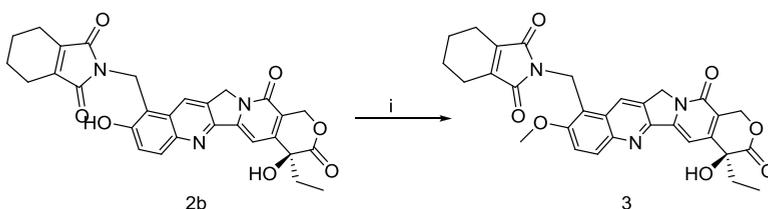
Del mismo modo, la incorporación de ácido ftalimidoglicólico o amidas glicoxiladas a la posición 9 mediante condiciones de T-E en *one-pot* o previo aislamiento del ácido, no dio los productos de amidoalquilación ni imidoalquilación (Esquema 3).

1.1 Estudios *in vitro* de actividad antitumoral. Relación estructura/actividad

Para establecer un comportamiento general de los compuestos obtenidos, la actividad citotóxica de los derivados **2a-2e** y **4** fue ensayada sobre líneas tumorales cervicales humanas (Hela) como se muestra en la Tabla 1. Los resultados mostraron, que las modificaciones metilmaleimida, amida cíclica o amida secundaria, **2c**, **2d** y **2e** respectivamente, así como la incorporación del grupo hidrofílico aminometílico, desactivaban el fármaco, mientras que el grupo ftalimida (**2a**) proporcionaba cierta inhibición celular. Sin embargo, la introducción de la unidad tetrahydroftalimida resulta altamente efectiva, mostrando, en el derivado **2b**, mayor actividad antiproliferativa que el Topotecan.

Con el fin de intentar mejorar la actividad de este análogo, y dado que estudios anteriormente publicados presentaron un aumento de la citotoxicidad en compuestos donde la posición 10 había sido modificada¹⁵⁴, sintetizamos el derivado metoxilado, **3** (Esquema 4) y se evaluó sobre un panel tumoral más amplio.

Esquema 4. Metoxilación del derivado 2b.



Reactivos y condiciones: (i) $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{SO}_2$, K_2CO_3 , DMF, 80°C , 4h.

Tabla 1. Citotoxicidad de los derivados de CPT sobre diferentes líneas tumorales. IC₅₀ (nM)^a

Órgano	Linea celular	Valores de IC ₅₀ (nM)									
		Topotecan	CPT	1	2a	2b	2c	2d	2e	3	4
Cervical	Hela	376	24	210	1274	214	>5000	>5000	>5000	173	>500
Sangre	MOLT-4	19	0.04	----	---	15	----	----	----	14	----
	K562	500	31	----	---	>500	----	----	----	109	----
Ovario	A2780	33	13	----	---	41	----	----	----	28	----
Próstata	PC3	62	78	----	----	103	----	----	----	51	----
Pecho	MDA-MB231	>500	12	----	----	>500	----	----	----	500	----
	MCF7	63	26	----	----	159	----	----	----	78	----
Pulmón	A543	354	99	----	----	346	----	----	----	226	----
	A549	33	2	19	160	100	----	----	----	30	----
Colorectal	HT29	205	10	69	280	221	----	----	----	188	----
	HCT116	38	3	7	110	98	----	----	----	16	----
Páncreas	Miapaca	120	22	100	>500	234	----	----	----	90	----
	BXPC3	143	10	67	>500	446	----	----	----	116	----
	Panc-1	>500	32	280	>500	>500	----	----	----	>500	----

^aActividad antitumoral medida por ensayo MTT después de 72h. de exposición al fármaco. Topotecan, CPT y 10HCPT se usaron como compuestos de referencia. Zonas sombreadas representan, la línea celular HeLa como referencia inicial de actividades y comparativa establecida entre topotecan y 3.

Los datos de citotoxicidad a las 72h. revelaron un aumento de la potencia del compuesto **3** en comparación con su derivado hidroxílico en todo el panel tumoral, y mayor actividad que el Topotecan en todas las líneas excepto MCF-7.

Más concretamente, el derivado **3**, se mostró cinco y dos veces más potente que el Topotecan en línea de leucemia mieloide crónica (K562) y línea colorectal (HCT116) respectivamente y más activo que la CPT en línea tumoral de próstata (PC3).

La amplia diferencia de actividad observada entre la forma hidroxilada y la forma metoxilada así como el tamaño voluminoso del grupo incorporado a la estructura nos hizo suponer posibles diferencias espaciales entre ambos derivados. Los cálculos computacionales en estado de mínima energía mostraron una evidente alteración en la conformación de las moléculas. Mientras el sustituyente se mantiene, en ambos casos, en planos perpendiculares al hexaciclo de CPT, la forma

metoxilada “obliga” a que el bicyclo se desplace hasta formar un ángulo de 90° con respecto al esqueleto de CPT (Figura 1).

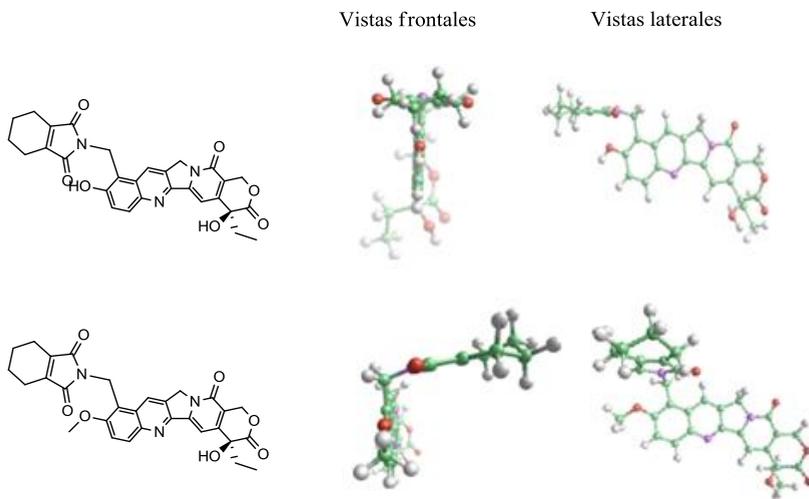


Figura 1. Simulación computacional frontal y lateral de los derivados 2b y 3 en estado de mínima energía.

Con nuestras posibilidades experimentales, no pudimos establecer conclusiones que relacionasen actividad y conformación espacial de ambos derivados, sin embargo suponemos una situación sinérgica, en la que la lipofilia aumenta en la forma metoxilada, aumentando de esta manera la posible acumulación, y por otro lado, la conformación o bien favorece la estabilización del complejo ternario o, al menos, no lo distorsiona.

1.2 Actividad antitumoral *in vivo*

Dada la eficacia *in vitro* del derivado **3**, se decidió examinar su actividad antitumoral *in vivo* en un modelo de xenoinjerto tumoral colorectal (HT29) en ratones atómicos. Se inyectaron, via intraperitoneal, Irinotecan, como fármaco de referencia para tratamientos colorectales, SN38, como agente activo del Irinotecan

y los derivados **2b** y **3** como agentes de estudio, en dosis de 3mg/Kg por semana durante 33 días.

Los resultados mostraron que el derivado **2d** y el SN38 tienen un actividad muy semejante con una reducción del volumen tumoral del 35% y 38% respectivamente, mientras el Irinotecan mejora levemente esta actividad en un 44%. Sin embargo la mejor respuesta se obtuvo con el derivado **3** mostrando una pendiente de actividad favorable a partir del día 27 con una inhibición final del 60% frente al control

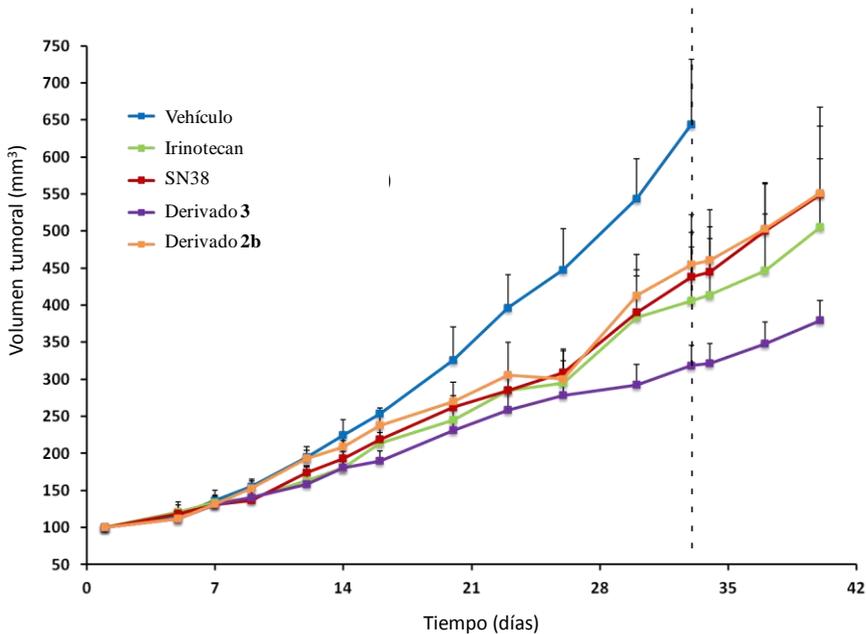


Figura 2. Inhibición del crecimiento tumoral en xenoinjerto colorectal (HT29) de los derivados 2b y 3. Administración i.p. una vez por semana (3mg/Kg). Valores obtenidos por triplicado.

Tabla 2. Eficacia antitumoral de los derivados y fármacos de referencia.

Inhibición del crecimiento tumoral= $(1-\Delta T/\Delta C)\times 100$				
	Irinotecan	SN38	2b	3
HT29	44%	38%	35%	60%

Eficacia terapéutica expresada en términos de inhibición del crecimiento tumoral siendo $\Delta T/\Delta C$ el ratio de diferencia entre el crecimiento tumoral del grupo tratado y el grupo control.

1.3 Ensayos *in vitro* de biodisponibilidad oral

El elevado carácter hidrofóbico de los derivados sintetizados y la alta actividad antitumoral *in vitro* de **3** nos llevó a estudiar el potencial de los mismos ante una posible administración oral.

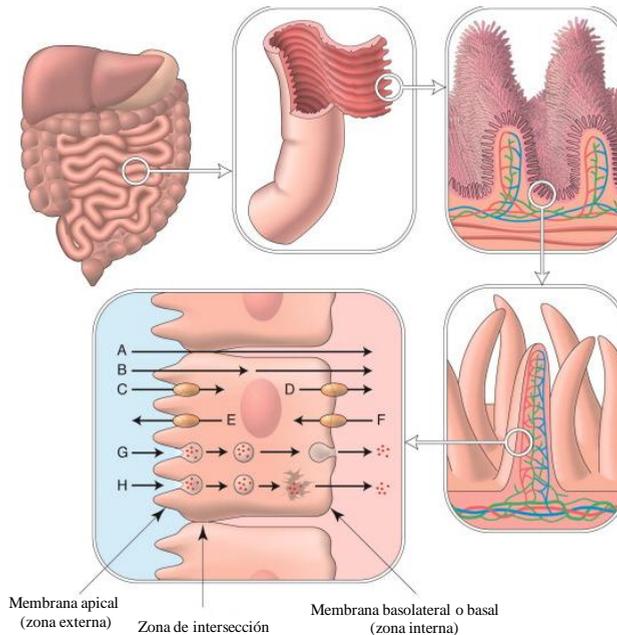


Figura 3. Esquema de transporte a través de la barrera intestinal. (A-B, difusión pasiva), (C-F, transporte facilitado por proteínas de membrana), (G y H, trancitosis y endocitosis respectivamente).

El transporte intestinal de la CPT, 10HCPT, Topotecan y distintos derivados sintetizados, fue ensayado utilizando el modelo de cultivo celular Caco2.

Existen diversos trabajos que han demostrado una buena correlación entre la fracción absorbida de distintos fármacos en humanos y los valores de permeabilidad aparente o efectiva calculada mediante el empleo de células Caco2.¹⁵⁵

155 (a) Karlsson, J.; Kuo, S. M.; Ziemniak, J.; Artursson, P. *Br. J. Pharmacol.* **1993**, *110*, 1009. (b) Lennernas, H. *J. Pharm. Pharmacol.* **1997**, *49*, 627.

Los ensayos de permeabilidad se determinaron en dirección apical-basal (Pab, sentido absorbivo) y en dirección basal-apical (Pba, sentido secretorio), en presencia o ausencia de azida sódica (SAz) como agente inhibidor de los transportadores que intervienen activamente en los procesos.

Como se observa en la Figura 4, para una concentración fija de $50\mu\text{M}$ de fármaco, tanto CPT como 10HCPT, muestran una alta velocidad de transporte en ambos sentidos, mientras **2e** es mínimamente permeable. Topotecan, **2b** y **3** muestran un comportamiento propio de un transporte activo donde la velocidad de secreción es mucho mayor que la de adsorción. El compuesto **2b** apenas muestra permeabilidad de absorción, sin embargo la velocidad de apical a basal, del compuesto **3** es tres veces mayor que la del Topotecan ($0,5 \times 10^{-5}$ cm/s frente $0,17 \times 10^{-5}$ cm/s) (Figura 4) y claramente menos dependiente de las proteínas de membrana, con valor de Pab/Pba más próximo a uno.

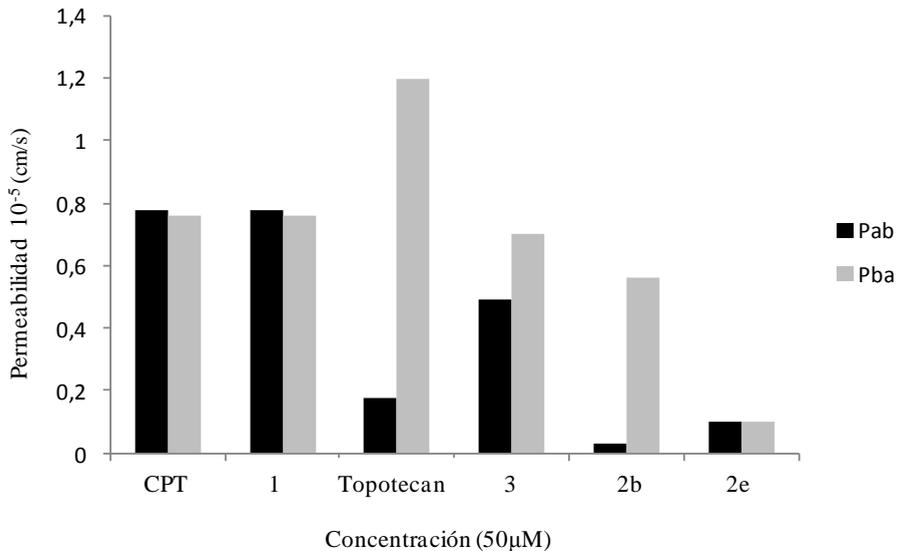


Figura 4. Gráfica de permeabilidad en línea celular Caco2 para CPT, 10HCPT, Topotecan y derivados.

Todos los compuestos se vieron afectados cuando se bloquean los transportadores con SAz (1mM) (Figura 5). De esta manera, se observa que CPT y 10HCPT son altamente dependientes del transporte activo y dejan de ser fármacos con una velocidad de permeabilidad aceptable cuando los transportadores dejan de funcionar. El Topotecan y el derivado **3** mostraron valores de permeabilidad efectiva semejantes en dichas condiciones ($0.30 \cdot 10^{-5}$ cm/s y $0.26 \cdot 10^{-5}$ cm/s, respectivamente, Figura 5) y mayores que cualquier otro derivado. Sin embargo el Topotecan, tanto en condiciones de transporte activo como pasivo, muestra una alta dependencia frente a transportadores de membrana, nuestros datos confirmaron que es un sustrato muy afin a la glicoproteína-P,¹⁵⁶ mientras que el derivado **3** mantiene unos ratios Pab/Pba más próximos a uno.

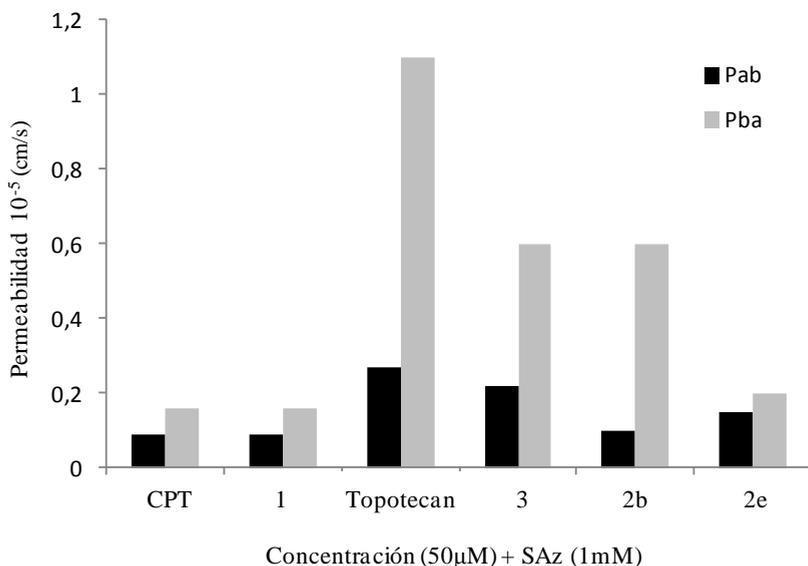


Figura 5. Gráfica de permeabilidad en línea celular Caco2 para CPT, 10HCPT, Topotecan y derivados en presencia de SAz.

156 (a) Proteína de membrana celular ampliamente distribuida encargada de expulsar una gran cantidad de sustancias fuera de la célula con una amplia especificidad de sustrato. Pertenece a la familia de los transportadores ABC y es responsable de la disminución de la acumulación de fármacos en muchas células. (b) Hendricks, C. B.; Rowinsky, E. K.; Grochow, L. B. *Cancer Res.* **1992**, 52, 2268.

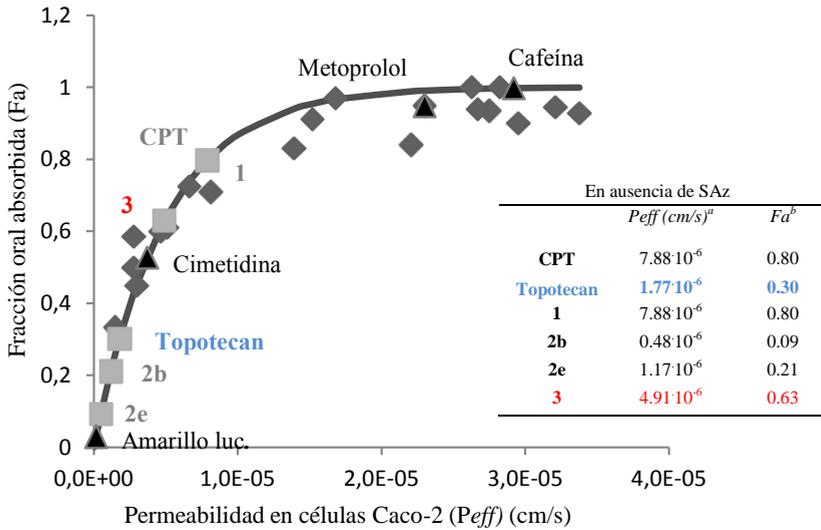


Figura 6. Valores de los coeficientes de permeabilidad efectiva (P_{eff}) calculados experimentalmente y de la fracción oral absorbida en humanos (F_a) calculada por interpolación según la gráfica estandar de correlación (izquierda)^b en dirección Pab ($50\mu\text{M}$) en ausencia de SAz. Rombos correspondientes a la representación de la curva validada entre F_a y P_{eff} de células Caco2. Cuadrados correspondientes a los valores de los compuestos. Triángulos correspondientes a patrones de alta (metoprolol y cafeína), media (cimetidina) y baja (amarillo luc.) permeabilidad. Valores numéricos de ambos parámetros (tabla derecha).

La curva de correlación que existe entre la permeabilidad en células Caco2, en sentido Pab, y la fracción oral absorbida en humanos (F_a) para distintos compuestos patrón, ha sido previamente publicada y es ampliamente utilizada para obtener datos teóricos de absorción *in vivo* a partir de resultados *in vitro*.

El valor de la permeabilidad efectiva (P_{eff}) en estudios *in vitro* se considera crucial para establecer el valor de la fracción oral absorbida y por lo tanto determinar la viabilidad de la administración oral de los candidatos en estados iniciales de desarrollo. La correlación entre ambos factores es conocida y previamente validada sobre compuestos patrón y representa la máxima fracción absorbida posible en condiciones de solubilidad limitada.

De esta manera, la interpolación de los resultados de P_{eff} en la curva (Figura 6) proporciona los valores F_a de los derivados de CPT ensayados. Los resultados obtenidos mostraron que tanto el Topotecan como el derivado **3** muestran niveles

de Fa menores a la CPT, que presenta un valor de 0.8, sin embargo el derivado de T-E se absorbe el doble que el Topotecan.

2. Derivado hexacíclico 9,10-[1,3]-Dioxinocamptotecina

Estudios previamente publicados que relacionan la estructura y la actividad de las modificaciones realizadas sobre el alcaloide establecen que la incorporación de un nuevo anillo sobre el esqueleto pentacíclico aumenta la actividad antitumoral y el carácter lipofílico de la CPT.¹⁵⁷ En particular, combinaciones para unir las posiciones 10- y 11-, 7- y 9- o posición 9- y 10-, mediante anillos de oxazina, furano y dihidrofuranos, han sido especialmente activas, probablemente porque proporcionan mayor planaridad a la molécula.¹⁵⁸ El alto potencial de estos derivados se ha visto reflejado en compuestos como Exatecan o Lurtotecan, desarrollados respectivamente hasta fase III y fase II clínica y anteriormente expuestos en la introducción de este trabajo.

157 Sugimori, M.; Ejima, A.; Ohsuki, K.; Uoto, K.; Mitsui, I.; Matsumoto, K.; Kawato, Y.; Yasuoaka, M.; Sato, H.; Tgawa, H.; Teresawa, H. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 3033-3039

158 Gao, H.; Zhang, X.; Chen, Y.; Pang, t.; Sun, J.; Xu, J.; Ding, J.; Li, C.; Lu, W. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3233-3236. (b) Kim, -K. D.; Ryu, D. H.; Lee, J. H.; Lee, H.; Kim, -W. Y.; Chang, G.; Choi, W.-S. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1594-1602

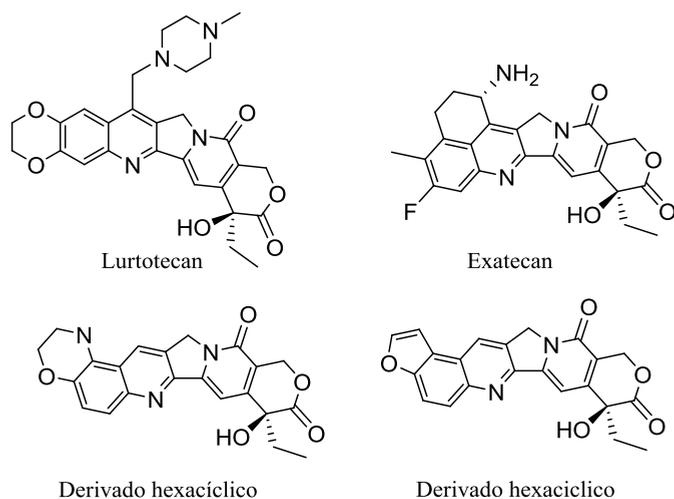
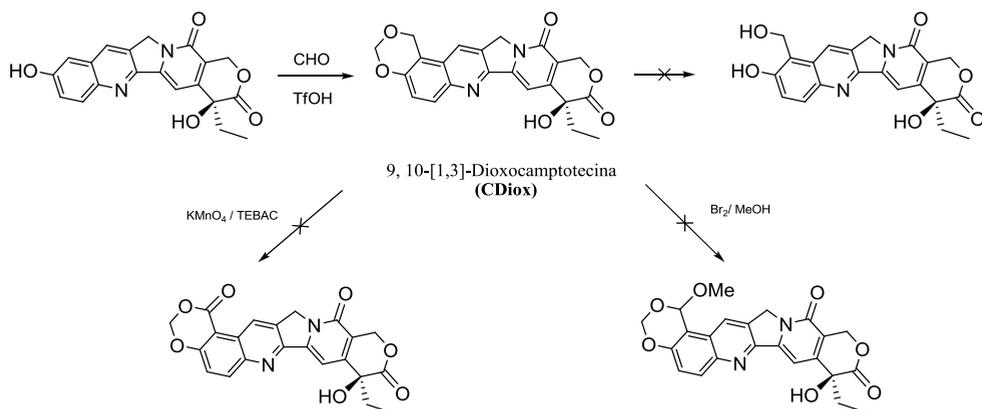


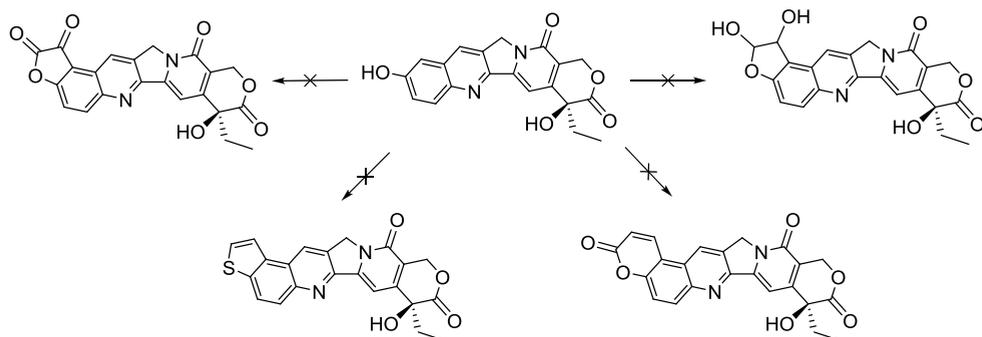
Figura 7. Derivados hexacíclicos de CPT.

En el desarrollo de nuestros estudios semisintéticos para la obtención de nuevas ciclaciones sobre el anillo A, observamos que la condensación de **1** con formalina proporcionaba la forma 9,10 dioxinocamptotecina (CDiox) de forma altamente efectiva, obteniendo con ácido tríflico rendimientos cuantitativos en ausencia de disolvente o en presencia de DMF o MeNO₂. El derivado resultó extremadamente resistente a la hidrólisis incluso en presencia de HCl conc. y dio lugar a productos de degradación ante los intentos de oxidación en condiciones estándar, KMnO₄ / TEBAC (Esquema 6).



Esquema 6. Semisíntesis del derivado CDiox. Ejemplos de desarrollos infructuosos para la modificación del anillo dioxino sobre el esqueleto de CPT.

Posteriores ensayos para obtener nuevos hexaciclos fueron infructuosos en una amplia variedad de condiciones. Productos esperados por condensaciones como 9,10-[2,3]-furanodiolCPT, furaronas o 9, 10-tiofenoCPT por sustitución nucleofílica ácida, entre otros, no fueron efectivas. Del mismo modo, condiciones de Perkin, Peachmann o Knoevenagel se aplicaron sobre el sustrato de 10HCPT de forma ineficaz para obtener lactonaso hidrolactonas de seis miembros sobre el anillo A. Resultados semejantes se obtuvieron utilizando catalizadores de Pd^{+2} , Pt^{+2} , Au^{+3} en presencia de ácidos propiólicos o propinicos (Esquema 7).



Esquema 7. Procesos semisintéticos infructuosos para la obtención de nuevos derivados hexacíclicos.

2.1 Estudios *in vitro* de actividad antitumoral

La actividad antitumoral de CDiox sobre un panel de cinco células tumorales humanas incluyendo, cáncer cervical (HeLa), adenocarcinoma de colon (Caco-2), melanoma (A375), leucemia linfocítica aguda (Jurkat) y cáncer de mama hormono-independiente (MDA-MB-231) demostró que, el derivado hexacíclico es tan potente como el Topotecan y Rubitecan en líneas tumorales Caco2, Jurkat y MDA-MB435 y levemente menos activo en línea A375. La tendencia antiproliferativa que parece desprenderse de los datos obtenidos indica que la incorporación del anillo 1,3-dioxino no merma la capacidad antiproliferativa del alcaloide original.

Tabla 2. Citotoxicidad de CDiox sobre diferentes líneas tumorales. IC₅₀ (nM)^a

	HeLa	Caco-2	A375	Jurkat	MDA-MB435
CPT	30	131	187	110	342
Topotecan	380	119	162	127	473
Rubitecan	343	112	138	128	479
CDiox	345	104	186	124	476

^aActividad antitumoral medida por ensayo MTT después de 72h de exposición al fármaco. CPT, Topotecan y Rubitecan se usaron como compuestos de referencia. Datos correspondientes a valores de IC₅₀. Líneas tumorales humanas: *HeLa* (cáncer cervical), *Caco-2* (adenocarcinoma de colon), *A375* (melanoma), *Jurkat* (leucemia linfocítica aguda), *MDA-MB231* (cáncer de mama hormono-independiente).

Dada la aceptabilidad de la modificación introducida en términos de citotoxicidad con el resto de fármacos y la propia CPT, se realizaron estudios de estabilidad en presencia de la albumina sérica humana (ASH).

La preferencia de la ASH para unirse a la forma carboxilada de la CPT y sus derivados, desplazando el equilibrio hacia la forma inactiva del alcaloide, ha sido extensamente estudiada.¹⁵⁹ La influencia de dicha proteína sobre CDiox fue analizada en términos de actividad antitumoral *in vitro*. La presencia de ASH (0.1%) aumentó la concentración de CPT necesaria para inhibir el 50% del cultivo

¹⁵⁹ Ver capítulo de introducción de la presente tesis doctoral.

tumoral A357, pasando de 187nM/L a 350nM/L (~2 veces), sin embargo concentraciones semejantes fueron suficientes en CDiox y Topotecan para reducir la línea celular (Figura 8).

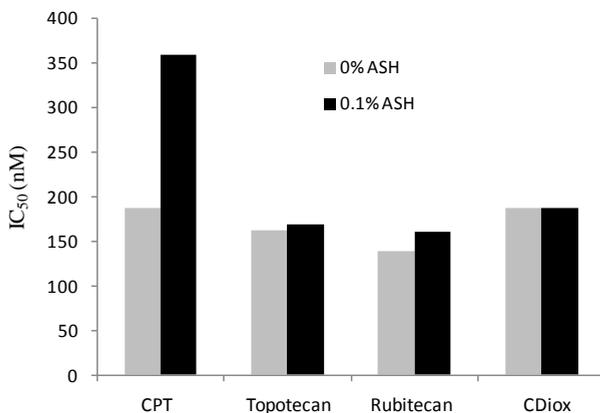


Figura 8. Influencia de la ASH en la citotoxicidad en células A375 de CDiox, CPT y derivados.

2.2 Ensayos *in vitro* de biodisponibilidad oral

La actividad antitumoral de CDiox, su estabilidad y el aumento de su carácter lipofílico debido a la incorporación del anillo acetálico sobre el anillo de la quinolina, revelaron una actividad terapéutica válida y una posible mejora de la permeabilidad frente a compuestos previamente estudiados.

Al igual que los estudios de permeabilidad anteriores, los ensayos se realizaron en sentido fisiológico (de lumen intestinal hacia plasma, Pab) y en sentido inverso (Pba) a distintas concentraciones.

Los resultados obtenidos mostraron una extremadamente baja permeabilidad del Topotecan a pesar de su efectividad como fármaco de administración oral. En concordancia con los resultados descritos previamente en la literatura, el ratio Pba/Pab es claramente mayor que uno, lo que se considera un comportamiento estándar de los sustratos con flujo de salida.

Sin embargo la CPT y CDiox muestran un comportamiento diferente al Topotecan. Los valores de Pba/Pab son próximos a uno en ambos fármacos,

observándose una tendencia de disminución de la permeabilidad al aumentar la concentración del flujo, excepto a concentración 50 μ M, donde la absorción aumenta considerablemente. Los resultados obtenidos mostraron un comportamiento más efectivo frente a la absorción a concentraciones altas de CDiox en comparación con CPT (Figura 9).

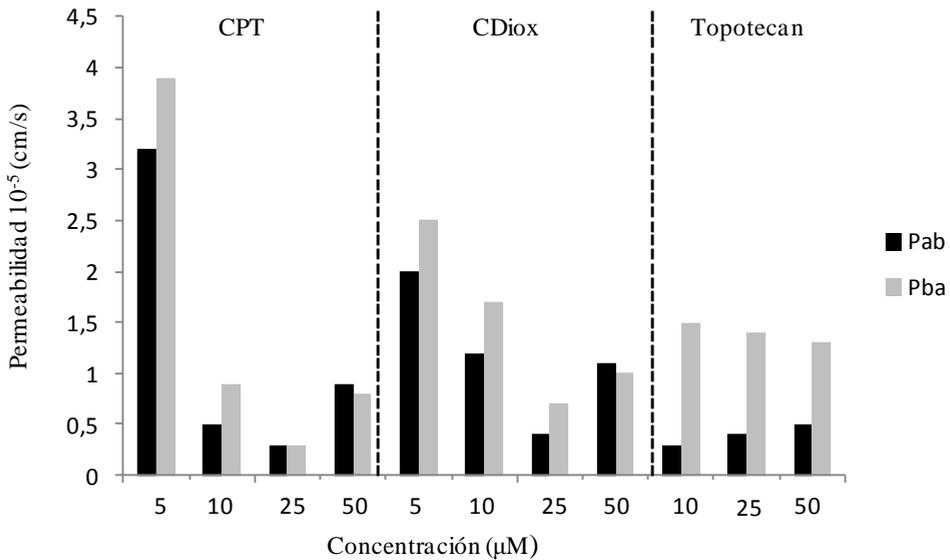


Figura 9. Valores de permeabilidad Pab y Pba a diferentes concentraciones de CPT, Topotecan y CDiox en líneas celulares Caco-2.

Para evaluar si el CDiox era un sustrato dependiente de transporte energético, se realizaron ensayos de permeabilidad a la máxima concentración en presencia de azida sódica (SAz) como inhibidor metabólico de los transportadores de membrana. Los resultados mostraron que no existen diferencias cuantitativas apreciables que indiquen la mediación de un transportador activo en la permeabilidad del hexaciclo ($9.84 \cdot 10^{-6}$ cm/s frente $9.74 \cdot 10^{-6}$ cm/s) (Tabla 3).

Tabla 3. Valores de permeabilidad (cm/s) de CDiox (50µM) en presencia y ausencia de SAz.

	Pe _{eff} en ausencia de SAz	Pe _{eff} en presencia de SAz
CDiox (Pab)	$1.00 \cdot 10^{-5} \pm 8.45 \cdot 10^{-7}$	$8.05 \cdot 10^{-6} \pm 5.02 \cdot 10^{-7}$
CDiox (Pba)	$9.84 \cdot 10^{-6} \pm 5.43 \cdot 10^{-7}$	$9.73 \cdot 10^{-6} \pm 4.87 \cdot 10^{-7}$

Medidas tomas por triplicado

La interpolación del valor de permeabilidad de CPT, Topotecan y CDiox sobre la representación, indica que la fracción absorbida del nuevo derivado es tres veces mayor que la del Topotecan y levemente mayor que la CPT (Figura 10).

Los resultados mostrados demuestran que el derivado CDiox presenta una permeabilidad valida para su administración oral, y al contrario que el Topotecan no muestra afinidad sobre la Pgp, considerado un transportador estándar en los procesos de resistencia tumoral.

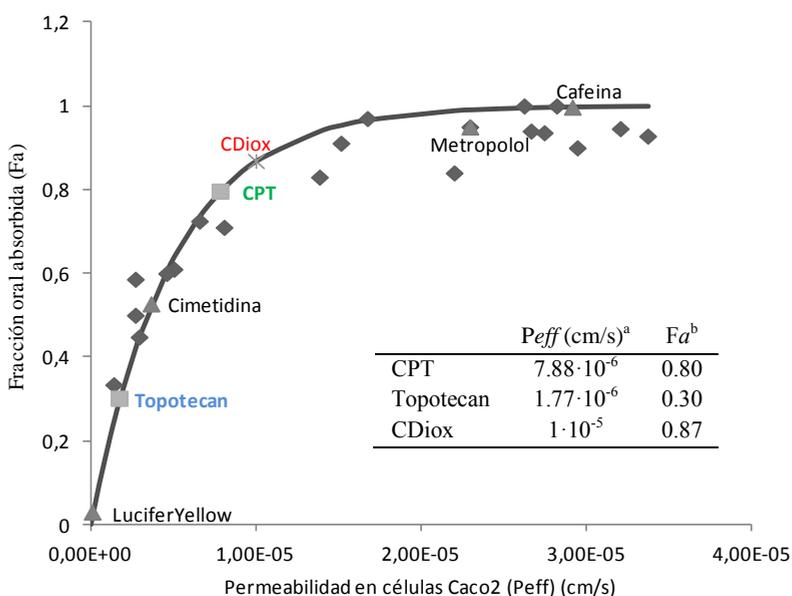


Figura 10. ^aValores de los coeficientes de permeabilidad efectiva (Pe_{eff}) calculados experimentalmente y de la ^bfracción oral absorbida en humanos (Fa) calculada por interpolación según la gráfica estandar de correlación en dirección Pab (50µM) en ausencia de SAz. Rombos correspondientes a la representación de la curva validada entre Fa y Pe_{eff} de células Caco2. Cuadrados correspondientes a los valores de los compuestos. Triángulos correspondientes a patrones de alta (metropopol y caféina), media (cimetidina) y baja (amarillo luc.) permeabilidad. Valores numéricos de ambos parámetros (tabla insertada).

2.3 Ensayos *in situ* de permeabilidad

La elevada permeabilidad mostrada por CDiox en los ensayos *in vitro* nos llevó a estudiar el comportamiento de dicho fármaco en modelos de permeabilidad *in situ*. Esta metodología consiste en perfundir regiones específicas a lo largo del tracto intestinal del animal anestesiado con una disolución del fármaco. En este sistema se calcula la desaparición del compuesto del lumen intestinal donde, por lo general, se asume que el fármaco desaparecido es igual al fármaco absorbido.

Los valores del coeficiente de absorción (K_a), calculado experimentalmente a partir de concentraciones iniciales y finales confirmaron, que en estas condiciones, el derivado Cdiox sigue siendo mejor absorbido que la CPT y el Topotecan (Figura 11).

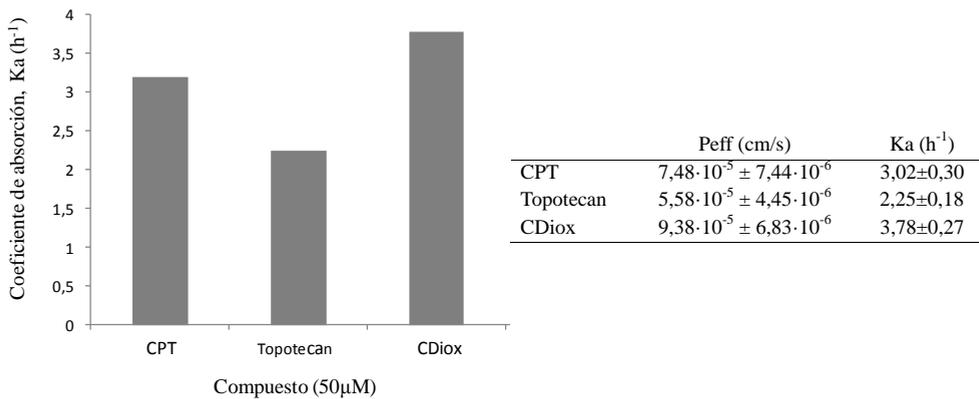


Figura 11. Coeficiente de absorción, K_a , y valores de permeabilidad, P_{eff} , obtenidos en modelo *in situ*. Representación grafica de K_a (izquierda) y tabla numérica para ambos factores (derecha). Datos correspondientes a la medida de seis experimentos independientes.

CONCLUSIONES I

1-Del trabajo realizado durante esta tesis doctoral podemos concluir que la reacción de Tscherniac-Einhorn (T-E) se postula como una metodología eficaz para la obtención de derivados lipofílicos sustituidos en posición 9 por grupos amidometílicos e imidometílicos de distinta naturaleza.

2-De entre los análogos obtenidos observamos que, modificaciones imidometílicas voluminosas son activas si la posición 10 está metoxilada, probablemente debido a los puentes de hidrógeno que pueden producirse entre los carbonilos del grupo imida en la estabilización del complejo ternario ADN-TopoI-CPT.

3-El derivado 3 ha demostrado mayor actividad *in vitro* que el Topotecan en todas las líneas tumorales ensayadas y un 60% de disminución de crecimiento tumoral *in vivo* en tumores colorectales en comparación con el Irinotecan (44%) y SN38 (33%).

4-Los estudios de biodisponibilidad oral, desarrollados sobre la permeabilidad del fármaco *in vitro* y su correlación teórica en la fracción oral absorbida en humanos han demostrado que el derivado 3 se absorbe dos veces más que el Topotecan.

5-Más allá de la síntesis de nuevos derivados hidrofóbicos, la reacción de T-E se ha mostrado altamente efectiva proporcionando análogos de CPT considerados “compuestos claves” a la hora de sintetizar nuevas estructuras. Por ejemplo, el derivado soluble en agua, 4, o el compuesto 5 han sido obtenidos con excelentes rendimientos y ambos son susceptibles de nuevas y diversas modificaciones. Podemos concluir en este sentido que la metodología funcionaliza la posición 9.

6-Dentro del campo semisintético, hemos demostrado que bajo condiciones sencillas podemos obtener el hexaciclo 9, 10-[1,3]-DioxoCPT (CDiox) de forma cuantitativa desde el sustrato de 10HCPT. El derivado mostró valores de IC₅₀ semejantes a CPT, Topotecan y Rubitecan en las líneas tumorales ensayadas. Los estudios biológicos desarrollados demostraron que la presencia del acetal cíclico sobre el anillo A de la quinolina aumentó la estabilidad de la estructura en

presencia de ASH y mejoró sustancialmente la biodisponibilidad oral del fármaco tanto en ensayos *in vitro* como *in situ*.

Podemos pues concluir que en el presente trabajo se ha conseguido obtener nuevos derivados de CPT con superior actividad antitumoral y absorción intestinal frente a los fármacos de referencia. Los análogos sintetizados han sido obtenidos mediante nuevas rutas semisintéticas de alto rendimiento.

PARTE EXPERIMENTAL I

1. Métodos generales

Los reactivos y disolventes se obtuvieron de fuentes comerciales y se utilizaron sin purificación previa, mientras no se indique lo contrario. Los productos obtenidos se caracterizaron por ^1H - ^{13}C RMN, análisis elemental y masa exacta.

Los procesos de purificación se llevaron a cabo por cromatografía en columna, utilizando gel de sílice grado “flash” (SDS Chromatogel 60 ACC, 40-60 μm) y cromatografía en capa preparativa PLC, utilizando placas con 2mm de gel de sílice (Merck GF₂₃₄).

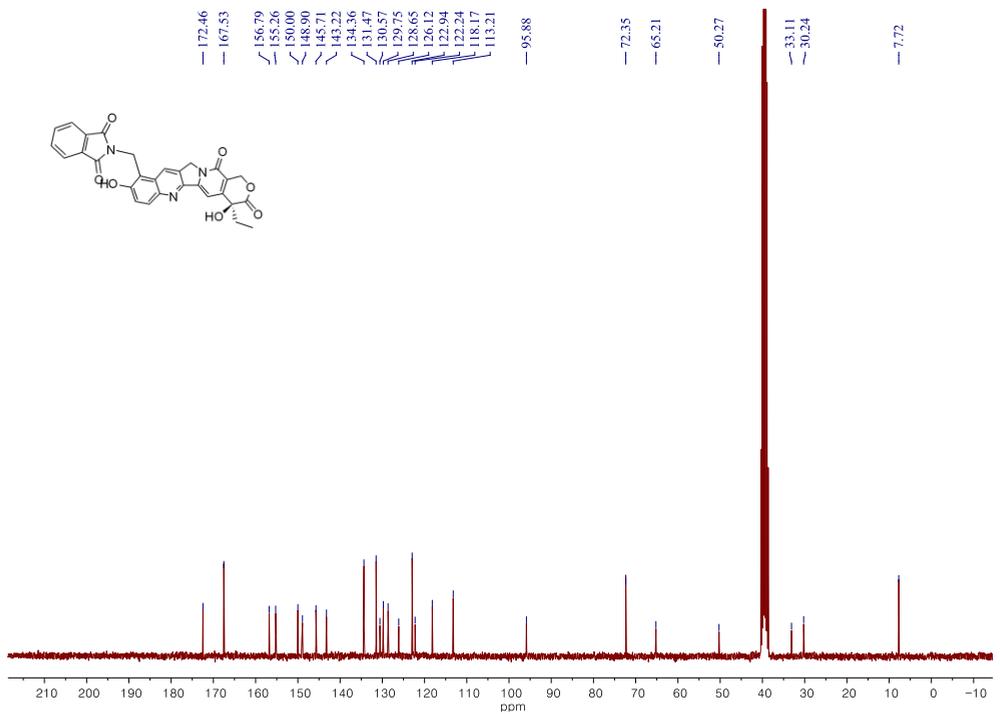
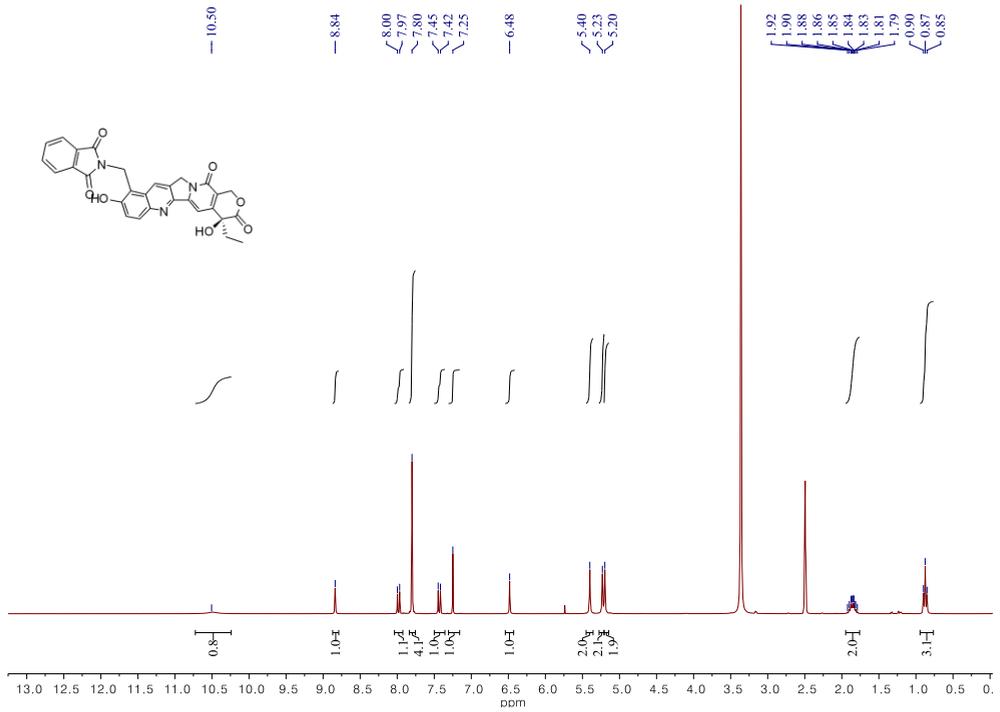
Los espectros de RMN se registraron a 25°C en un instrumento Bruker Advance 300MHz usando DMSO- d_6 o D₂O, conteniendo TMS como patrón interno. Los análisis elementales de los productos se determinaron por combustión química utilizando un analizador EA 1108 CHNS-O (Fisons Instruments).

1.1 Síntesis y caracterización de productos.

a) Procedimiento general para la síntesis de derivados 9-amidometílicos y 9-imidometílicos (2a-2e). Las correspondientes N-hidroximetilamidas o N-hidroximetilimididas (1eq.) se añadieron poco a poco a una disolución continuamente agitada de 10-hidroxyCPT (1.1eq) en ácido sulfúrico concentrado a 0°C. La reacción se siguió por TLC y se añadió agua y hielo cuando se consideró finalizada. El crudo de reacción precipitado se mantuvo en frío durante 12h, posteriormente se filtró y purificó por columna cromatográfica de gel de sílica (eluyente: CH₂Cl₂/MeOH 95:5).

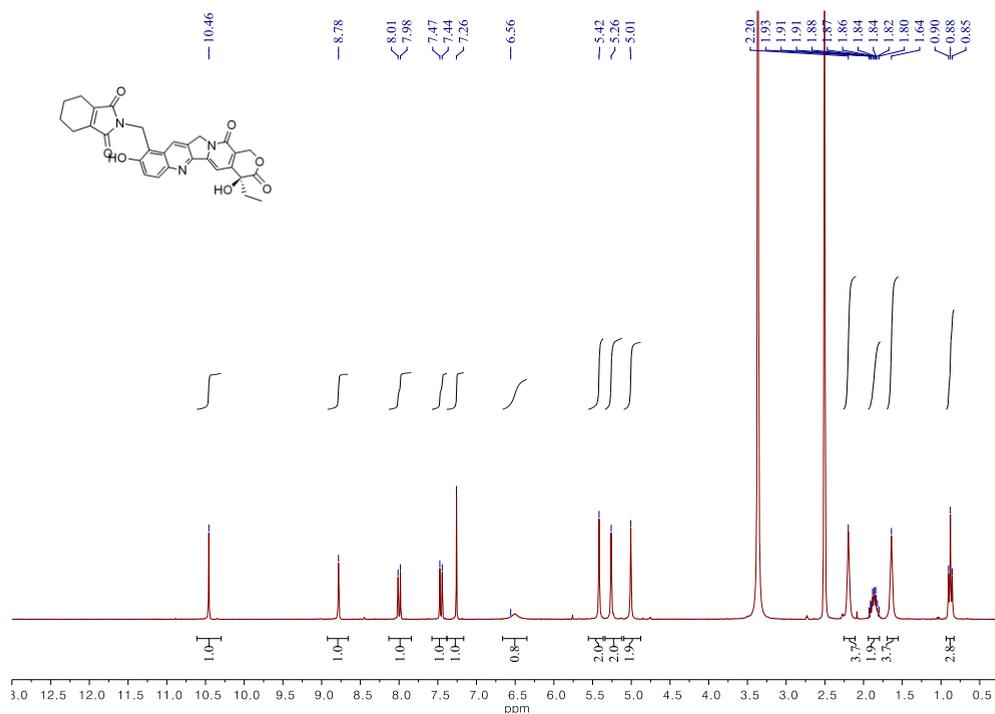
-20(S)-10-Hidroxi-9-ftalimidometilcamptotecina (2a)

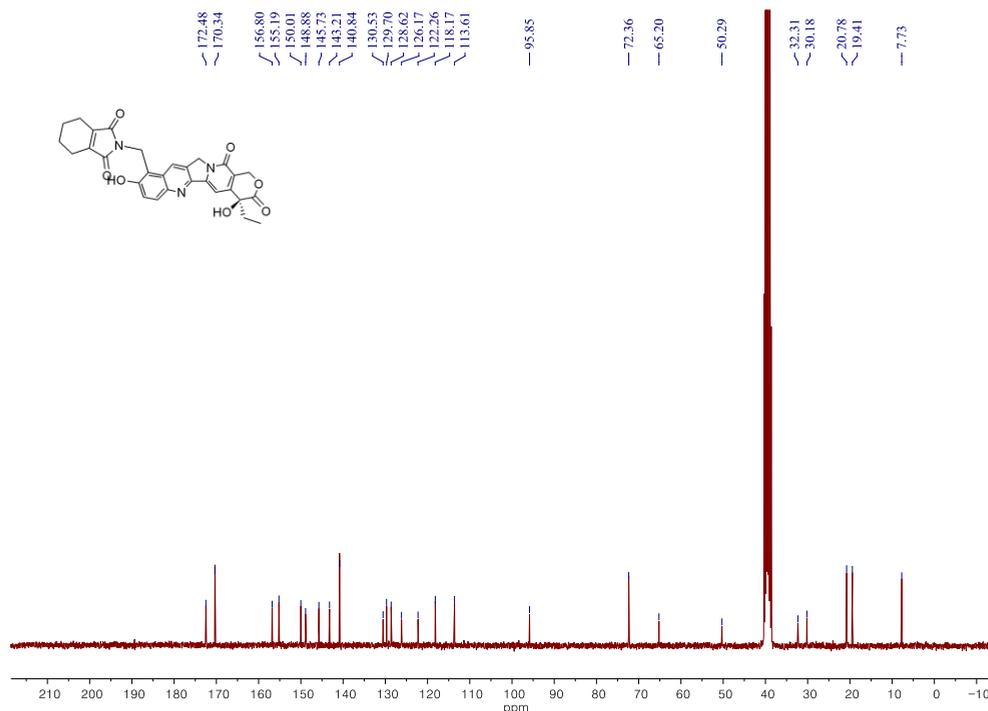
Rendimiento: 89%. Sólido amarillo ¹H-RMN (300 MHz; DMSO-d₆) δ: 0.87 (t, 3H, -CH₃, J=7.4 Hz); 1.82-1.90 (m, 2H, -CH₂); 5.23 (s, 2H, -CH₂-N); 5.26 (s, 2H, -CH₂-17); 5.40 (s, 2H, -CH₂-5); 6.48 (s, 1H, -OH); 7.26 (s, 1H, H-14); 7.45 (d, 1H, 1Ar, J=9.2Hz, H-11); 7.82 (s, 4H, -Ftal-4); 8.01 (d, 2H, 1Ar, J= 9.1Hz, H-12); 8.87 (s, 1H, 1Ar, H-7); 10.48 (s, 1H, -OH). ¹³C-RMN (300 MHz, DMSO) δ- 8.12, 30.61, 33.51, 50.68, 65.622, 72.75, 113.64, 118.60, 122.65, 123.36, 126.55, 129.06, 130.19, 130.99, 131.90, 134.77, 143.64, 146.13, 149.34, 150.40, 155.65, 157.20, 167.94, 172.87. HRMS(m/z): calcd. para C₂₉H₂₁N₃O₇(M+3H⁺): 526.1614, encontrado: 526.1589. Anal. Calcd. para C₂₉H₂₁N₃O₇ (523.14): C, 66.54; H, 4.04; N, 8.03. Encontrado: C, 66.65; H, 4.12; N, 8.15.



-20(S)-10-Hidroxi-9-(3, 4, 5, 6-tetrahidroftalimida)metilcamptotecina (**2b**)

Rendimiento 91%. Sólido amarillo. $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz; DMSO- d_6) δ : 0.87 (t, 3H, -CH₃, J=7.4 Hz); 1.64 (bs, 4H, Phth-4); 1.81-1.91 (m, 2H, -CH₂); 2.19 (bs, 4H, Phth-4); 5.01 (s, 2H, CH₂-N); 5.26 (s, 2H, CH₂-17); 5.41 (s, 2H, -CH₂-5); 7.25 (s, 1H, H-14); 7.45 (d, 1H, 1Ar, J=9.2Hz, H-11); 8.0 (d, 1H, 1Ar, J= 9.1Hz, H-12); 8.78 (s, 1H, 1Ar, H-7); 10.44 (s, 1H, -OH). $^{13}\text{C-RMN}$ (300 MHz, DMSO) δ - 7.73, 19.41, 20.77, 30.18, 32.31, 50.29, 65.21, 72.36, 95.85, 113.62, 118.18, 122.27, 126.18, 128.63, 129.71, 130.54, 140.85, 143.22, 145.74, 148.89, 150.02, 155.20, 156.81, 170.35, 172.50. HRMS (m/z): calcd. para C₂₉H₂₅N₃O₇(M+H⁺): 528.1771, encontrado: 528.1787. Anal. Calcd. para C₂₉H₂₅N₃O₇ (527.17): C, 66.03; H, 4.78; N, 7.97. Encontrado: C, 66.18; H, 4.90; N, 8.09.

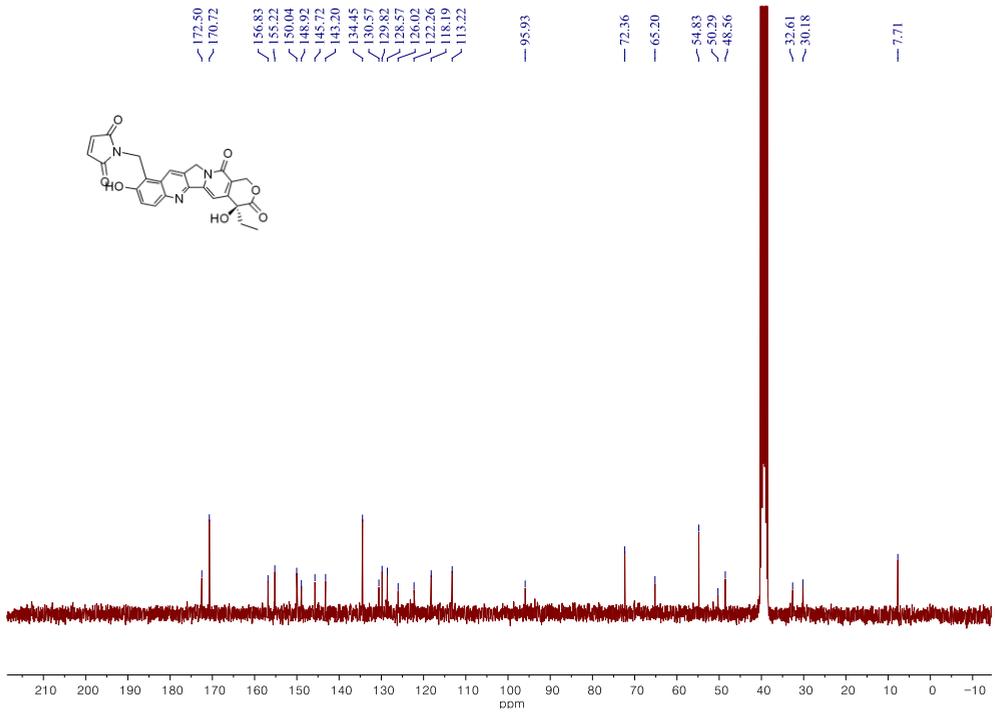
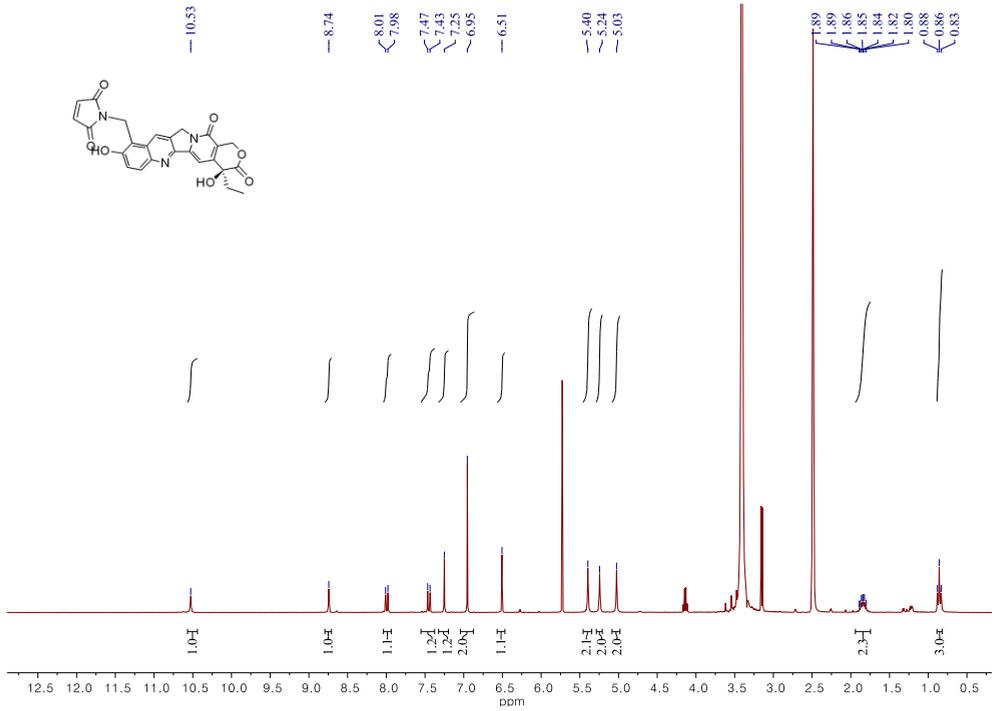




-20(S)-10-Hidroxi-9-maleimidometilcamptotecina (2c)

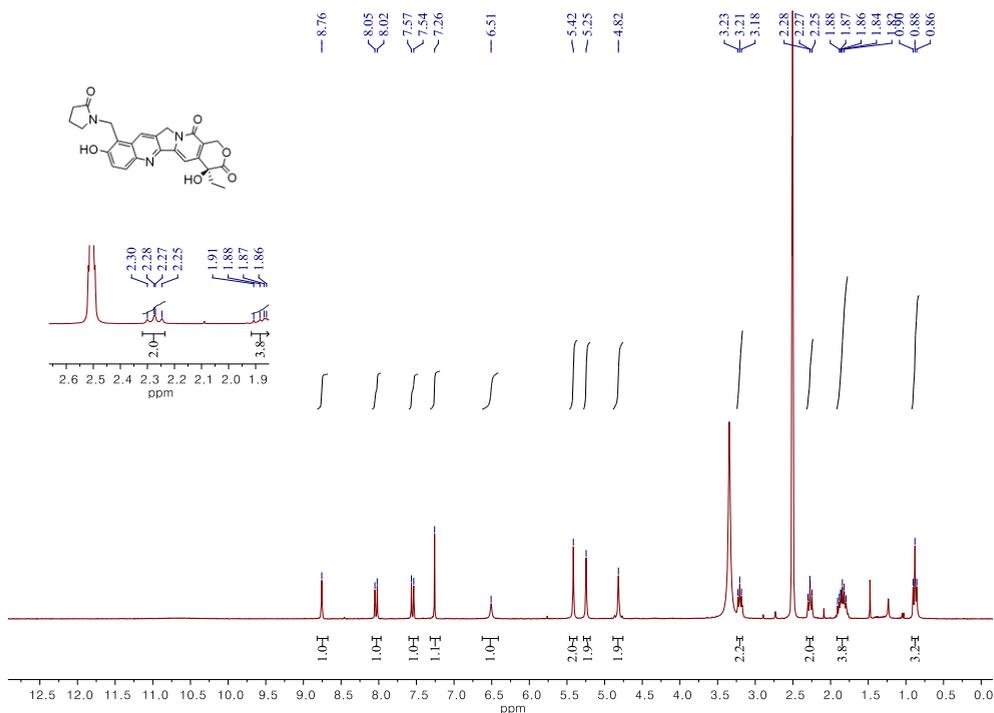
Rendimiento 50%. Sólido amarillo. $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz; DMSO-d_6) δ : 0.87 (t, 3H, $-\text{CH}_3$, $J=7.3$ Hz); 1.82-1.90 (m, 2H, $-\text{CH}_2$); 5.04 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{-N}$); 5.26 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{-17}$); 5.41 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{-5}$); 6.50 (s, 1H, $-\text{OH}$); 6.98 (s, 2H, $\text{CH}=\text{CH}$, $-\text{Mal-2}$); 7.26 (s, 1H, H-14); 7.47 (d, 2H, 1Ar, $J=9.1$ Hz, H-11); 8.01 (d, 1H, 1Ar, $J=9.1$ Hz H-12); 8.75 (s, 1H, H-7); 10.49 (s, 1H, $-\text{OH}$). $^{13}\text{C-RMN}$ (300 MHz, DMSO) δ -7.71, 30.18, 32.61, 38.56, 48.56, 50.29, 54.83, 65.20, 72.36, 95.93, 113.22, 118.19, 122.26, 126.03, 128.58, 129.83, 130.58, 134.46, 143.21, 145.73, 148.93, 150.05, 155.23, 156.84, 170.73, 172.52. HRMS (m/z): calcd. para $\text{C}_{25}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_7(\text{M}+\text{H}^+)$: 474.1301, encontrado: 474.1301. Anal. Calcd para $\text{C}_{25}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_7$ (473.12): C, 63.42; H, 4.05; N, 8.88. Encontrado: C, 63.55; H, 4.19; N, 8.99

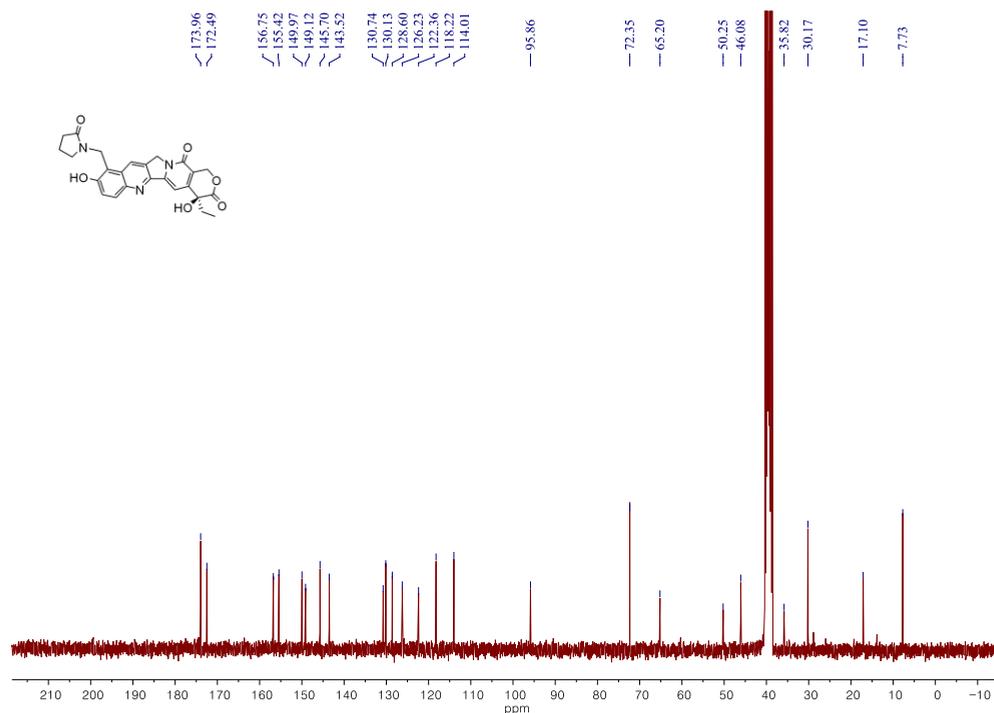
Parte I



-20(S)-10-Hidroxi-9-(2-pirrolidinona)metilcamptotecina (2d)

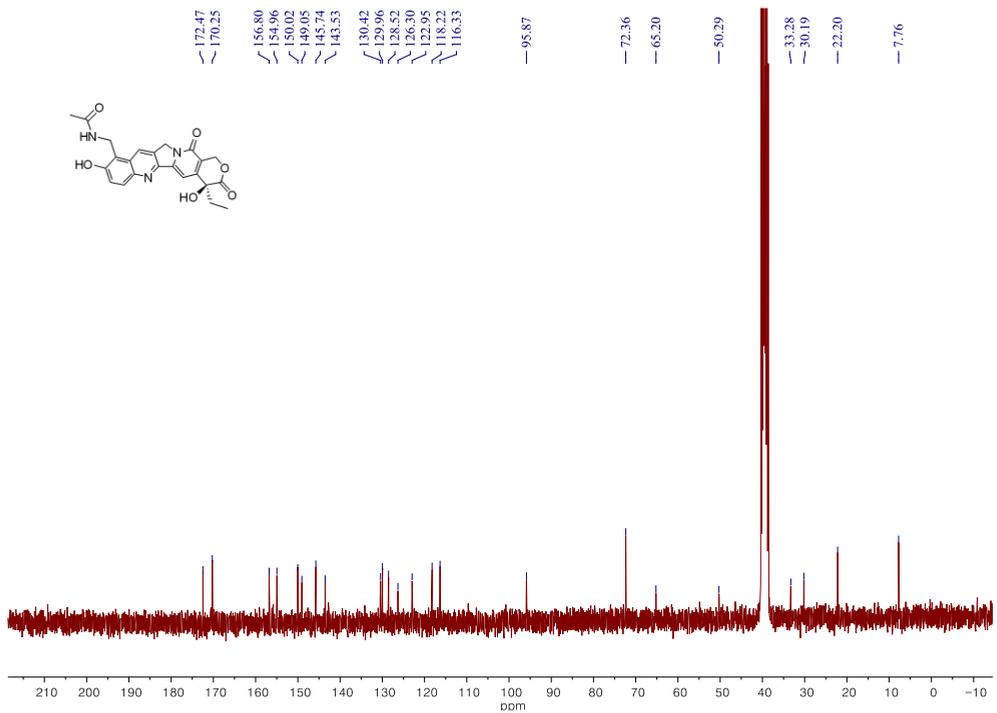
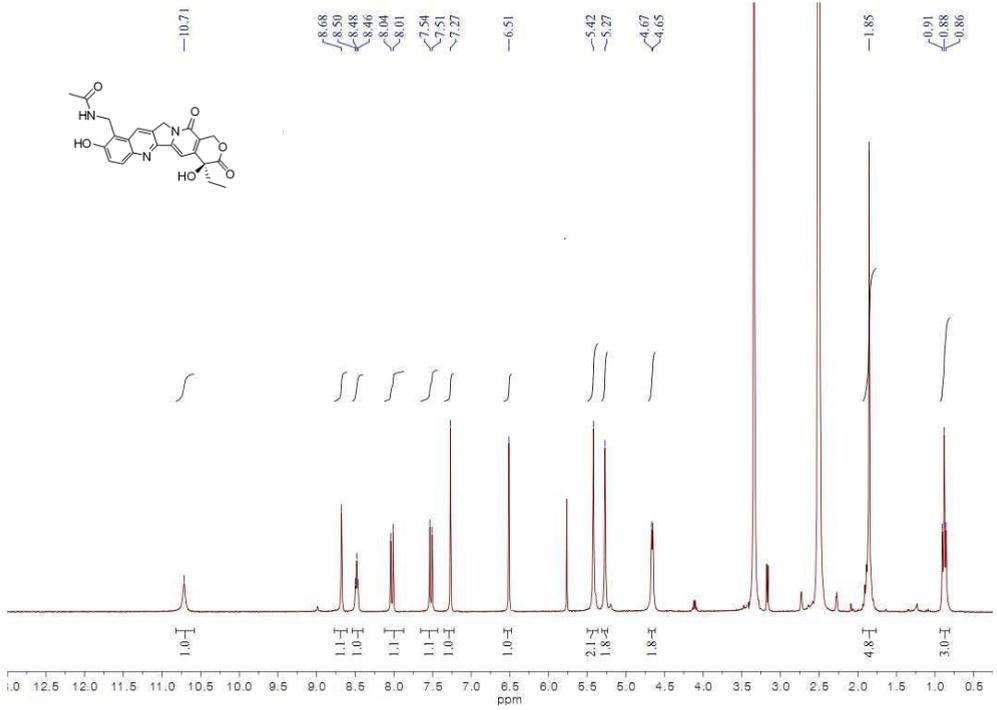
Rendimiento 74%. Sólido amarillo. $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz; DMSO-d_6) δ : 0.88 (t, 3H, $-\text{CH}_3$, $J=7.3$ Hz); 1.82-1.90 (m, 2H, $-\text{CH}_2$); 2.08-2.16 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-Me(O)-}$); 2.24-2.30 (m, 2H, $-\text{CH}_2(\text{O})-$); 3.17-3.26 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-N-}$); 4.81 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{-N}$); 5.26 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{-17}$); 5.47 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{-5}$); 6.96 (s, 1H, H-14); 7.55 (d, 1H, 1Ar, $J=9.1\text{Hz}$, H-11); 8.04 (d, 2H, 1Ar, $J=9.1\text{Hz}$, H-12); 8.76 (s, 1H, 1Ar, H-7). $^{13}\text{C-RMN}$ (300 MHz, DMSO) δ - 7.72, 17.10, 28.86, 30.17, 35.82, 46.08, 50.24, 65.20, 72.36, 95.87, 114.01, 118.23, 122.37, 126.23, 128.60, 130.14, 130.75, 143.53, 145.71, 149.13, 149.99, 155.44, 156.76, 172.50, 173.97. HRMS(m/z): calcd. para $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_6(\text{M}+\text{H}^+)$: 462.1656, encontrado: 462.1665. Anal. Calcd. para $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_6$ (461.16): C, 65.07; H, 5.02; N, 9.11. Encontrado: C, 65.20; H, 5.11; N, 9.20.





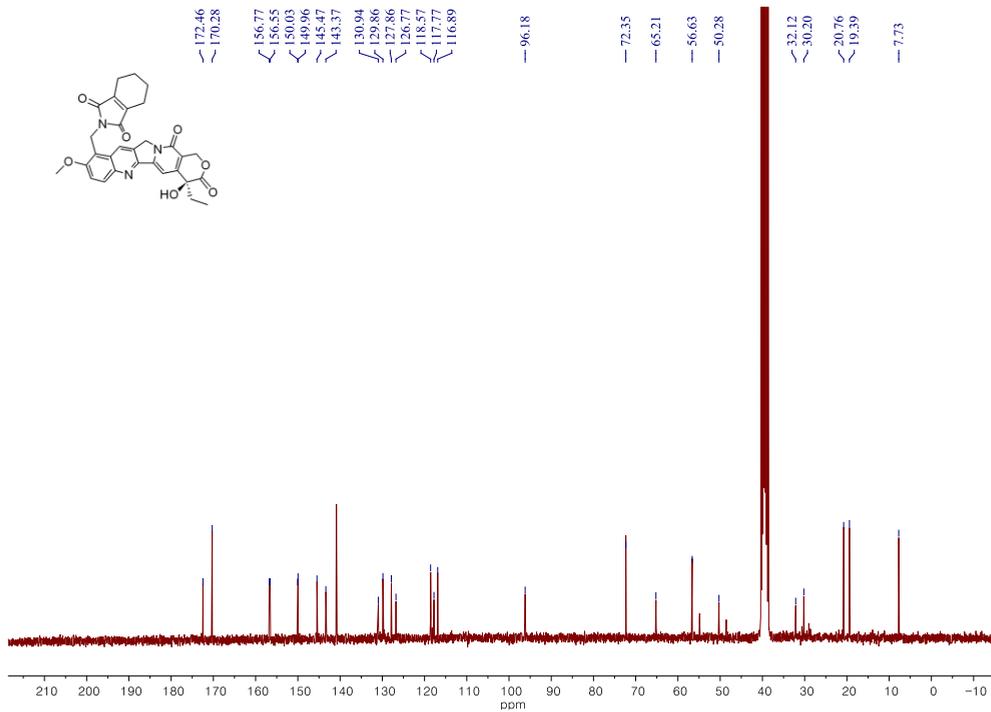
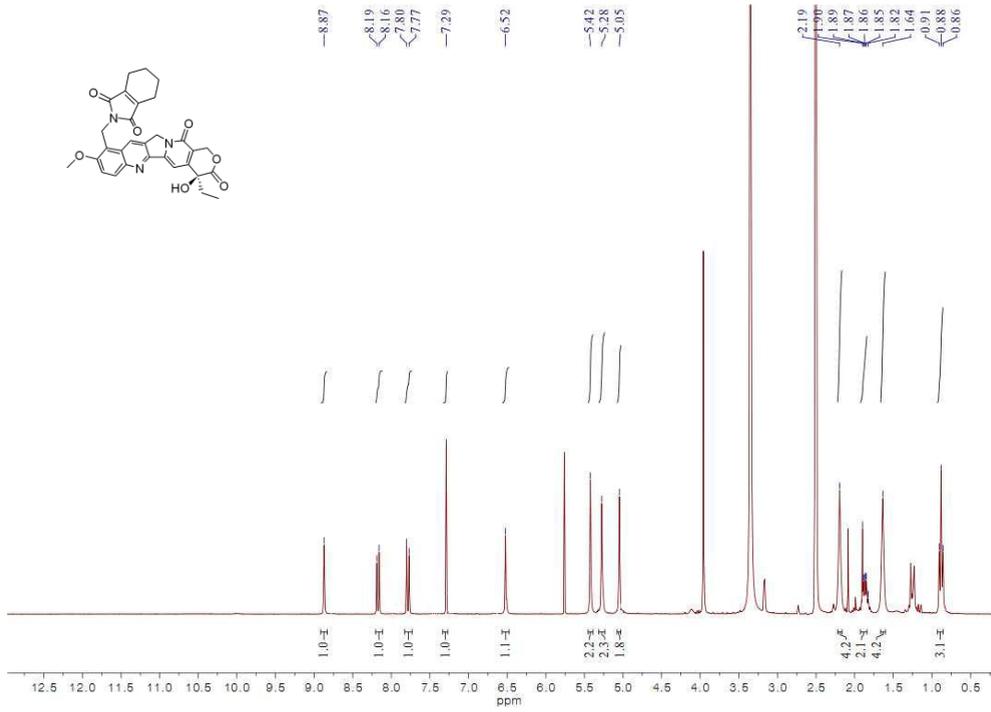
-20(S)-9-Acetamidometil-10-hidroxicamptotecina (2e)

Redimiento 64%. Sólido amarillo. ¹H-RMN (300 MHz; DMSO-d₆) δ: 0.88 (t, 3H, -CH₃, J=7.5 Hz); 1.85 (s, 5H, -CH₂-N(O)CH₃); 4.65 (d, 2H, -CH₂N-, J=4.8Hz); 5.26 (s, 2H, -CH₂-17); 5.42 (s, 2H, -CH₂-5); 6.51 (s, 1H, -OH); 7.26 (s, 1H, H-14); 7.52 (d, 2H, 1Ar, J= 9.1Hz, H-11); 8.02 (d, 1H, 1Ar, J=9.1Hz, H-12); 8.48 (t, 1H, -NHC(O)-, J=5.1Hz); 8.68 (s, 1H, 1Ar, H-7); 10.71 (s, 1H, -OH). ¹³C RMN (300 MHz, DMSO) δ- 7.76, 22.19, 30.19, 33.28, 65.21, 72.36, 95.87, 116.34, 118.23, 122.96, 126.31, 128.53, 129.97, 130.43, 143.55, 145.75, 149.06, 150.03, 154.97, 156.81, 170.26, 172.48. HRMS(m/z): calcd. para C₂₃H₂₁N₃O₆(M+H⁺): 436.1515, encontrado: 436.1509. Anal. Calcd. para C₂₃H₂₁N₃O₆ (435.14): C, 63.44; H, 4.86; N, 9.65. Encontrado: C, 63.50; H, 4.97; N, 9.77



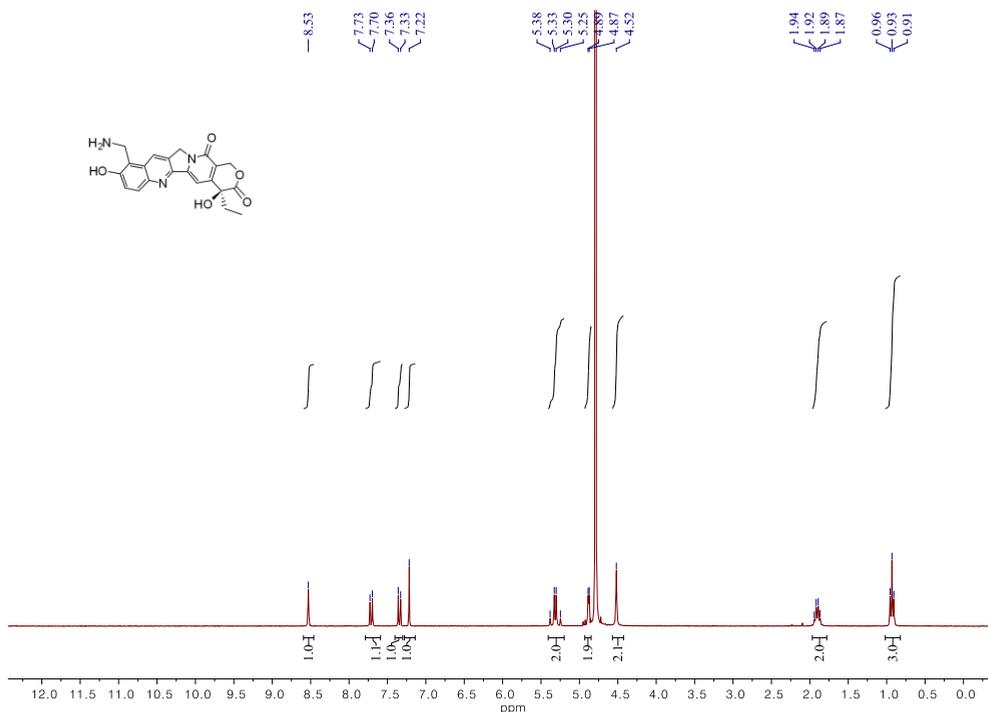
-Síntesis de 10-Metoxi-9-(3, 4, 5, 6-tetrahidroftalamide)metilcamptotecina (3)

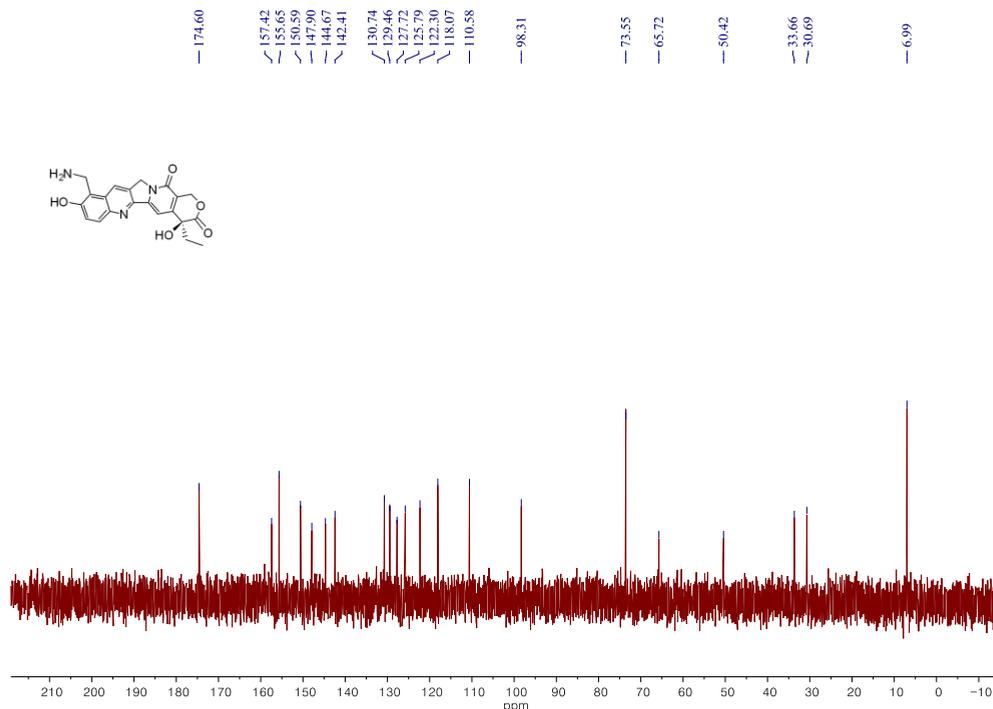
El compuesto **2b** (120mgrs, 0.23mmol) y 150mgrs de K_2CO_3 se disolvieron en 5mL de DMF anhidro a 50°C hasta completa disolución. Dimetilsulfato (110 μ L, 5eq) se añadieron gota a gota manteniendo la reacción a 80°C durante 4h. La disolución rojiza se enfría y se obtiene un precipitado tras la adición de agua/hielo. El crudo se filtra y se purifica por columna cromatográfica (eluyente $CH_2Cl_2/MeOH$ 99:1). Rendimiento 25%. Sólido amarillo intenso. 1H -RMN (300 MHz; $DMSO-d_6$) δ : 0.88 (t, 3H, $-CH_3$, $J=7.4$ Hz); 1.64 (bs, 4H, Ftal-4); 1.82-1.90 (m, 2H, $-CH_2$); 2.19 (bs, 4H, Ftal-4); 5.05 (s, 2H, CH_2-N); 5.28 (s, 2H, CH_2-17); 5.42 (s, 2H, $-CH_2-5$); 6.52 (s, 1H, OH); 7.29 (s, 1H, H-14); 7.78 (d, 1H, 1Ar, $J=9.2$ Hz, H-11); 8.17 (d, 1H, 1Ar, $J=9.1$ Hz, H-12); 8.87s, 1H, OH). ^{13}C -RMN (300 MHz, $DMSO-d_6$) δ - 7.73, 19.39, 20.76, 30.20, 32.12, 50.28, 56.63, 65.21, 72.35, 96.18, 116.89, 117.77, 118.57, 126.77, 127.86, 129.86, 130.94, 143.37, 145.47, 149.96, 150.03, 156.55, 156.77, 170.28, 172.46. HRMS (m/z): calcd. para $C_{30}H_{27}N_3O_7(M+H^+)$: 542.1932, encontrado: 542.1927. Anal. Calcd. para $C_{23}H_{21}N_3O_6$ (541.18): C, 66.53; H, 5.03; N, 7.76. Encontrado: C, 66.50; H, 4.99; N, 7.68



-Síntesis de 9-Aminometil-10-hidroxicamptotecin hidrocloreto (4)

El compuesto **2a** (100mgr, 0.2mmol) se mantuvo a reflujo con HCl conc. durante 12h y posteriormente concentrado. Tras la adición de agua y filtración para retirar el ácido ftálico, la disolución se concentra a sequedad. El sólido obtenido se disuelve en MeOH caliente, obteniendo **4** mediante precipitación con éter dietílico. El producto es suficientemente puro para el siguiente paso. Rendimiento: 78%. Sólido amarillo. ¹H-RMN (300 MHz; D₂O) δ: 0.93 (t, 3H, -CH₃, J = 7.3 Hz); 1.87-1.94 (q, 2H, -CH₂, J₁ = 7.4 Hz, J₂ = 15 Hz); 4.52 (s, 2H, -CH₂N); 4.88 (d, 2H, -CH₂-5, J = 6 Hz); 5.25-5.38 (q, 2H, -CH₂, J₁ = 15 Hz, J₂ = 24 Hz, 2H-22); 7.22(s, 1H, H-14), 7.34 (d, 1H, 1Ar, J = 9.3 Hz, H-11); 7.71 (d, 1H, 1Ar, J = 9.3, H-12); 8.53 (s, 1H, 1Ar, H-7). ¹³C-RMN (300 MHz; D₂O) δ: 6.99, 30.69, 33.66, 50.42, 65.72, 73.55, 98.31, 110.57, 118.07, 122.30, 125.79, 127.72, 129.46, 130.74, 142.41, 144.67, 147.90, 150.59, 155.65, 157.42, 174.60. HRMS (m/z): calcd. para C₂₁H₁₉N₃O₅ (M+H⁺): 394.1384, encontrado: 394.1379

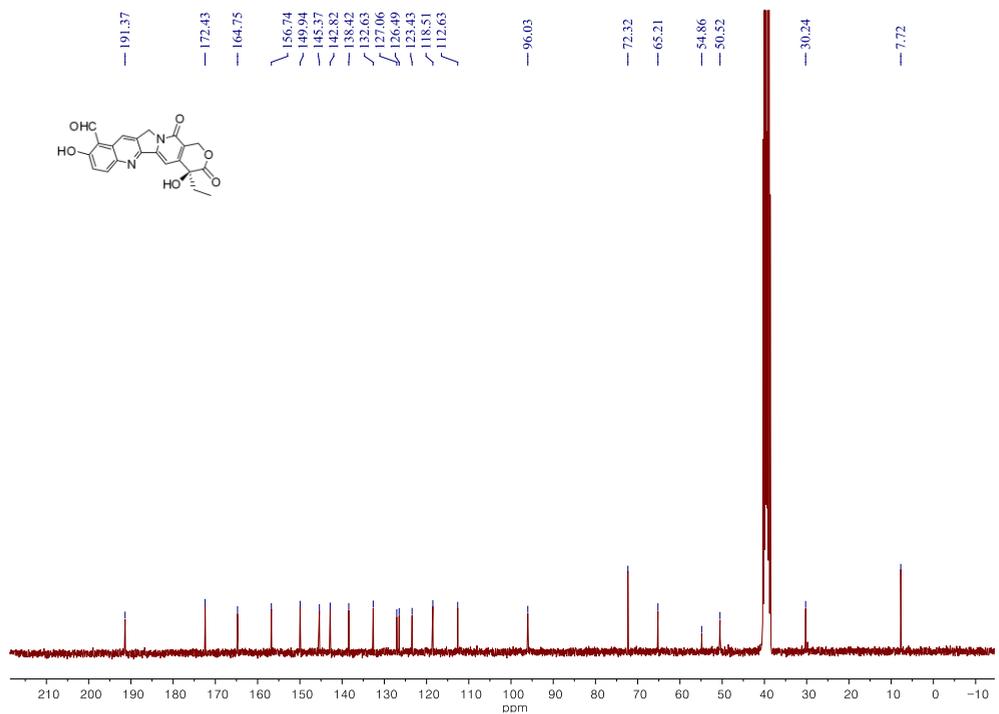
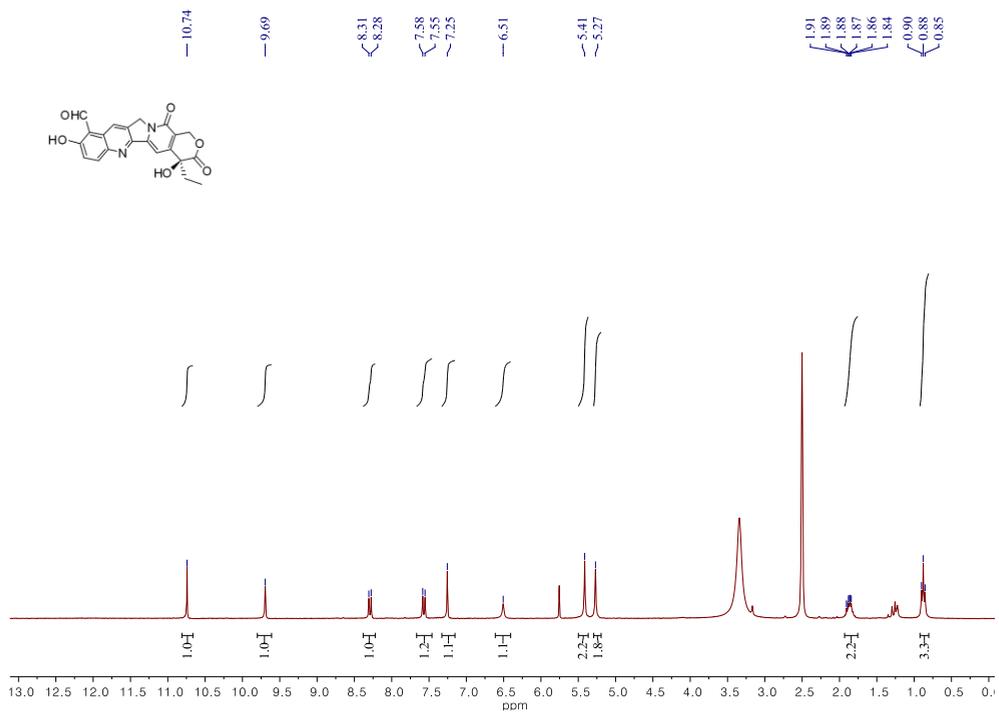




-Síntesis de 9-formil-10-hidroxicamptotecina (5)

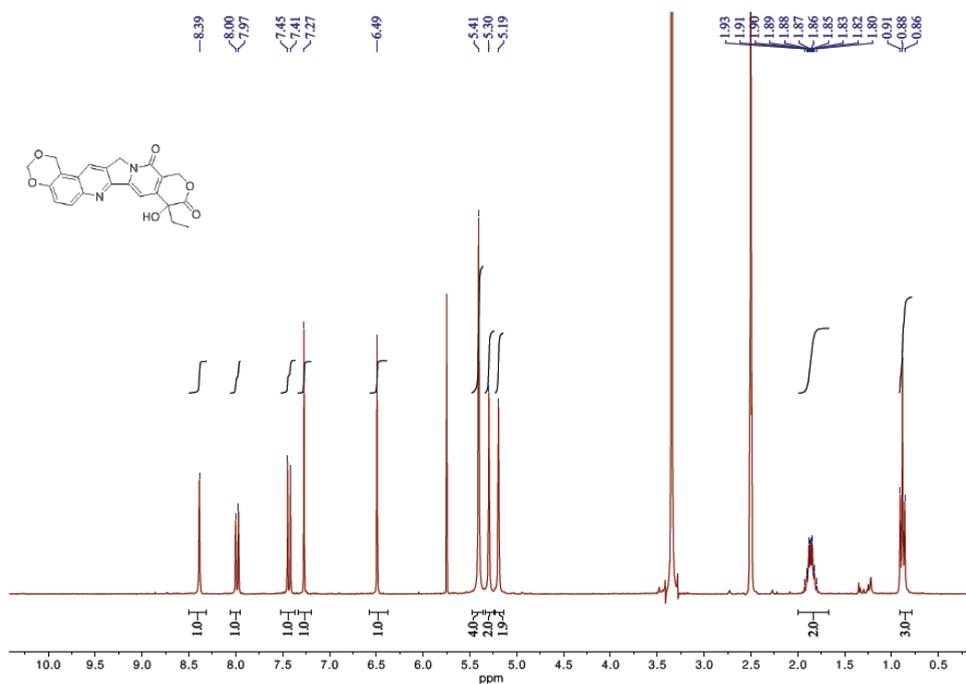
Sobre una disolución de **4** (62mgrs, 0.13mmol) en AcOH:H₂O / 5:1, se añadió hexametilentetramine (19mgrs, 1eq.). La reacción se mantuvo a 100°C durante 6h con agitación constante y posteriormente se adicionó 5N HCl (10mL) con reflujo reflujo durante 1h mas. Tras enfriar, la reacción se extrajo con acetato de etilo (100mL x 3) y la fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró. El residuo obtenido se purificó por columna cromatográfica de gel de sílice (eluyente CH₂Cl₂:MeOH / 95:5) para dar el producto deseado. Rendimiento 60%. Sólido amarillo. ¹H-RMN (300 MHz; DMSO-d₆) δ: 0.88 (t, 3H, -CH₃, J = 7.4 Hz); 1.84-1.91 (m, 2H, -CH₂); 5.27 (s, 2H, CH₂-17); 5.41 (s, 2H, -CH₂-5); 6.51 (s, 1H, OH); 7.25 (s, 1H, H-14); 7.56 (d, 1H, 1Ar, J = 9.2Hz, H-11); 8.3 (d, 1H, 1Ar, J = 9.1Hz, H-12); 9.69 (s, 1H, OH); 10.74 (s, 1H, CHO). ¹³C-RMN (300 MHz; D₂O) δ: 7.72, 30.24, 50.52, 54.86, 65.21, 72.32, 96.03, 112.63, 118.51, 123.43, 126.49, 127.07, 132.63, 138.42, 142.82, 145.37, 149.94, 156.74, 164.75, 172.43, 191.37. HRMS (m/z): calcd. para C₂₁H₁₆N₂O₆ (M+H⁺): 393.1076, encontrado: 393.1087

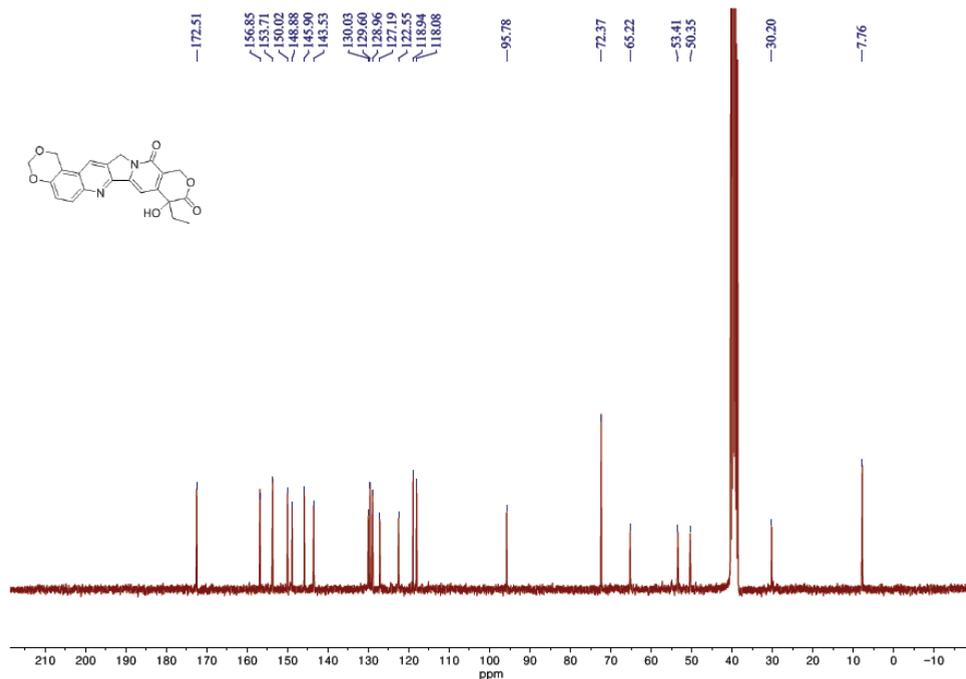
Parte I



-Síntesis de 9, 10-[1,3]-Dioxinocamptotecina (CDiox)

Rendimiento: 95%. Sólido amarillo. $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz; DMSO-d_6) δ : 0.88 (t, 3H, $-\text{CH}_3$, $J=7.4$ Hz); 1.80-1.93 (m, 2H); 5.19 (s, 2H); 5.30 (s, 2H); 5.41 (s, 4H); 6.49 (s, 1H, $-\text{OH}$); 7.27 (s, 1H); 7.43 (d, 1H, $J=9.2\text{Hz}$); 7.80 (d, 2H, $J=9.1\text{Hz}$); 8.39 (s, 1H). $^{13}\text{C-RMN}$ (300 MHz, DMSO-d_6) δ - 7.76, 30.2, 50.35, 53.41, 65.22, 72.37, 95.78, 118.08, 118.94, 122.55, 127.19, 128.96, 129.60, 130.03, 143.53, 145.90, 148.88, 150.02, 153.71, 156.85, 172.51. HRMS (m/z): calcd. para $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_6$ (M + Na): 429.1063, encontrado: 429.1063. Anal. Calcd. para $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_6$ (429.10): C, 61.54; H, 4.23; N, 6.52. Encontrado: C, 61.54; H, 4.23; N, 6.52.





2. Ensayos biológicos

Los estudios biológicos se realizaron en la U. Miguel Hernández (Elche), bajo la normativa y evaluación del Dept. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) bajo la normativa y evaluación del Dept de Investigación Clínica de Tumores Digestivos.

2.1 Estudios de citotoxicidad

Se emplearon 18 líneas de diferente origen tumoral humano de crecimiento adherente en monocapa: HeLa (cáncer cervical), MOLT4 (leucemia linfoblástica), A2780 (cáncer de ovario), MCF7 (cáncer de mama hormono-dependiente), K562 (leucemia mieloide crónica), PC3 (cáncer de próstata), A543 (cáncer de pulmón),

A543 (cáncer de pulmón), HT29 (cáncer colorectal), MDA-MB231 (cáncer de mama hormono-independiente), Caco-2 (adenocarcinoma de colon), A375 (melanoma), Jurkat (leucemia aguda), HCT116 (adenocarcinoma de colon), Miapaca, BXPC3 y Panc-1 (cáncer de páncreas).

Las líneas celulares se mantuvieron en Duplecco's Modified Eagle's médium / Ham's Nutrient Mixture F-12 (DMEM) (Sigma), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), gentamicina 50µg/mL en frascos de cultivo celular de 75 y 150cm² de área a 37°C, en atmósfera con 5% de CO₂ y 100% de humedad relativa. Las células fueron lavadas con solución de fostatos (PBS), tripsina (0.025%) y EDTA (0.03%) para obtener una suspensión celular que se contó en cámara de Neubauer. Las células fueron inoculadas en placas de 96 pozos con densidades aproximadas de 25000 células/pozo. Las placas se preincubaron por 24h para permitir la adherencia de las células en los pozos, luego se adicionaron los tratamientos en condiciones establecidas, con sus respectivas réplicas.

La actividad antiproliferativa se determinó mediante el ensayo estandar de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazole-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium (MTT)¹⁶⁰. Se prepararon disoluciones stock de los productos usando DMSO (0.1% v/v) y agua en el caso del Topotecan. Las placas se incubaron durante 24, 48 y 72h y posteriormente, 20µL de la disolución de MTT se adicionó a cada pozo. La absorbancia se midió a 570nm con un lector de placas Labsystems Multiskan EX. Los valores de IC₅₀ se determinaron a partir de las curvas de concentración-efecto (%proliferación celular) mediante el análisis de regresión lineal.

160 Para revisión extensa y detalles del ensayo MTT: Stockert, J. C.; Blanquez-Castro, A.; Cañete, M.; Villanueva, A. *Acta Histochemica* **2012**, *114*, 785.

2.2 Estudios *in vivo*

Se utilizaron ratones atímicos (nu/nu) de 6-8 semanas y con un peso medio aproximado de 30gr. Los animales fueron manipulados en condiciones libres de patógenos y se les inyectó 5×10^6 células tumorales colorectales humanas HT29, estableciéndose 6 grupos distintos con 10 ratones cada uno seleccionándose aleatoriamente un grupo control (sin tratamiento), grupos referencia (tratados con SN38 e Irinotecan) y grupos de estudio (tratados con 3 y 2b). Cuando el tumor alcanza un tamaño aproximado de 100-150 mm³ comienza la administración (día 1). Todos los compuestos fueron inyectados via intraperitoneal con una dosis de 3mg/kg y formulados en una disolución al 5% en DMSO. La inhibición del crecimiento tumoral y el peso del animal fueron medidos dos veces por semana a lo largo de todo el estudio. El volumen tumoral fue calculado como $(\text{longitud} \times \text{anchura})^2 / 2$. La eficacia antitumoral se consideró como el porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral respecto al grupo control y se define como $1 - (\Delta T - \Delta C) \times 100$, donde $\Delta T - \Delta C$ representa el ratio de diferencia entre el volumen tumoral del grupo tratado y el grupo control. Los animales fueron sacrificados cuando el volumen tumoral supera los 2000mm³ o la media del volumen tumoral en el grupo supera los 1000mm³. Los datos resultantes fueron procesados, analizados y aceptados tras ser considerados estadísticamente representativos.

Los ensayos de los estudios *in vivo* fueron realizados en el Dept. de Investigación Clínica de Tumores Digestivos del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) dentro de la regulación y controles pertinentes.

2.3 Estudios de permeabilidad *in vitro*

Las células Caco-2 son una línea celular de adenocarcinoma de colon humano que ha sido utilizada ampliamente para predecir la absorción intestinal de potenciales candidatos a fármacos¹⁶¹. Este modelo presenta características semejantes a las de intestino humano (uniones estrechas y microvillus), expresa enzimas intestinales (aminopeptidasas, esterasas, sulfatasas, y citocromo P450), y transportadores (de ácidos biliares, de aminoácidos, de biotina, de ácidos monocarboxílicos, PEPT1 y Pgp), simulando de manera muy completa los dos tipos de barreras para la absorción de fármacos: la bioquímica y la fisicoquímica (Figura A).

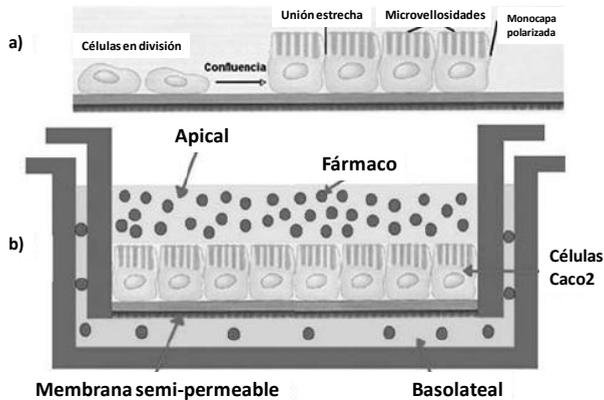


Figura A. a) diagrama del desarrollo de una monocapa de células que alcanza confluencia y forma uniones estrechas y microvellosidades; b) diagrama del sistema para permeación a través de células montadas sobre una membrana semipermeable, para simular las condiciones normales de absorción de compuestos.

Esta línea celular tiene la ventaja de que puede cultivarse sobre un soporte poroso o un filtro en el que se forma la monocapa celular polarizada en sólo unos días y se diferencia en células intestinales de morfología típica, que incluye la expresión de enzimas y la formación de uniones estrechas. Esta línea ha reportado

161 Hilgers, A.; Corandi, A.; Burton, P. *Pharm Res.* **1990**, *7*, 902.

una alta correlación con la absorción de fármacos en humanos (biodisponibilidad, absorción, efecto farmacológico)¹⁶², por lo que su empleo se ha generalizado.

Cabe mencionar que la heterogeneidad de las células Caco-2 y las diferentes condiciones de cultivo utilizadas en cada laboratorio ha dado lugar a la selección de diferentes poblaciones celulares que se conocen como tendencia fenotípica, lo cual puede ser la causa de la gran variabilidad de resultados obtenidos por diferentes laboratorios. Normalmente, las células se cultivan sobre un soporte de policarbonato. Crecen hasta una fase estacionaria después de 10 días de cultivo y generalmente, los estudios de transporte se llevan a cabo después de 21 días, cuando la expresión de transportadores y enzimas alcanza su máximo.

Los ensayos de transporte se realizaron en un incubador de temperatura controlada, a 37°C y con una agitación continua de 50 rpm. Las muestras de 200µL cada una fueron recogidas cada 15, 30, 60 y 90 min de la cámara receptora y posteriormente repuestas con disolución salina. Cada muestra se cuantificó por HPLC con un detector UV ($\lambda=365$ nm) utilizando como fase móvil acetonitrilo:agua ácida 40:60 (v/v), siendo los tiempos de retención medios de los compuestos de entre 2 y 3 min.

Los valores de permabilidad se calculan por regresión lineal de las cantidades acumuladas de fármaco en el compartimento receptor frente al tiempo, d acuerdo con la siguiente expresión, $P_{eff} = b/(S \cdot C)$, donde P_{eff} es el coeficiente de permeabilidad efectiva, b es la pendiente de la regresión, S el área de difusión y C la concentración inicial de estudio.

162 Anderle, P.; Niederer, E.; Rubas, W.; Hilgenforf, C.; Spahn-Langguth, H.; Merkle, H. *Pharm. Res.* **1995**, *12*, 693.

2.4 Estudios de permeabilidad *in situ*

Los estudios de perfusión *in situ* fueron llevados a cabo utilizando metodologías previamente descritas¹⁶³. Pevio al procedimiento quirúrgico, las ratas con pesos aproximados de 200gr fueron seleccionadas aleatoriamente y sometidas a ayuno durante 16-20h con agua *ad libium*. Posteriormente fueron anestesiadas y el intestino fue expuesto mediante una incisión abdominal con la precisión adecuada para no interrumpir la circulación sanguínea del tracto intestinal. El conducto biliar fue anudado para evitar el efecto de excreción biliar. El extremo más próximo y el más alejado del intestino delgado fueron canulados con tubos de silicona como entrada y salida del sistema de perfusión respectivamente y se bombea solución salina hasta obtener un flujo limpio de salida, a continuación se bombea la disolución muestra (disolución 5%DMSO y concentración de fármaco 50µM) con un flujo de 0.3ml/min durante 180min. Las muestras se recogieron a intervalos de 10min comenzando a los 60 min de la perfusión. La cantidad de fármaco remanente se analizó por cromatografía líquida de alta resolución. Los ratios de los coeficientes de absorción (Ka) fueron determinados mediante regresión no linear de las concentraciones remanente en el lumen C_t versus tiempo,

$$C_t = C_0 e^{-ka \cdot t}$$

donde C es la concentración del fármaco q tiempo t y C_0 corresponde a la concentración inicial de fármaco disponible a $t=0$.

Los valores Ka fueron transformados en datos de permeabilidad mediante la siguiente relación, $P_{app} = Ka R/2$, donde R es el radio efectivo del segmento intestinal.

163 Li, M.; Pan, H.; Rabba, A. k.; Qiu, Y.; Li, G. *Int. J. Pharm.* **2011**, *403*, 37.

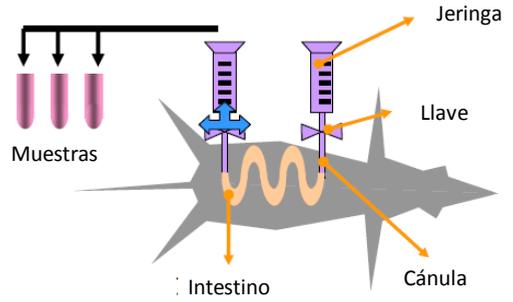


Figura X. Esquema de la técnica de perfusión *in situ* basada en el método de Doluisio¹⁶⁴

Los ensayos de los estudios *in situ* fueron realizados en el Dept. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la U. Miguel Hernández (Elche) dentro de la regulación y controles pertinentes.

164 Oltra Noguera, D. Tesis doctoral. U. de Valencia 2010.

Parte II. Obtención de Materiales Porosos en Condiciones Biomiméticas

INTRODUCCION II

1. El silicio en los seres vivos

La ciencia de los materiales esta en continuo desarrollo aproximadamente desde principios del siglo XX, sin embargo, muchos organismos biológicos han desarrollado durante millones de años la extraordinaria habilidad de fabricar complejas morfologías y estructuras, a partir de diferentes materiales inorgánicos como carbonato cálcico, fosfato cálcico, dióxido de silicio, etc.¹

El silicio, es el constituyente de más del 60% de los componentes del suelo con una concentración en forma de ácido silícico de entre 35 y 40mg /L.²

La asimilación de silicio por seres vivos ocurre en una amplia variedad de organismos, como diatomeas, esponjas, radiolarinas, moluscos y plantas

-
- 1 (a) Mann, S.; Ozin, G. A. *Nature* **1996**, 382, 313; (b) Ozin, G. A. *Acc. Chem. Res.* **1997**, 30,17. (c) Douglas, T. *Science* **2003**, 229, 1192.
 - 2 (a) Epsein, E. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.*, **1999**, 50, 641. (b) Ma, J. F.; Mitani, N.; Nigao S.; Konishi, S.; Tamai, K.; Iwashita, T.; Yano, M. *Plant. Physiol.*, **2004**, 136, 3284. (c) Fauteaux, F.; Remus-Borel, W.; Menzies, J. G.; Bélanger, R. R. *Pros. Nat. Acad. Sci. USA.* **2006**, 103, 17554.

superiores,³ que cuentan con un excepcional control y precisión sobre las estructuras que autogeneran en condiciones fisiológicas. Sin embargo, las condiciones de síntesis de compuestos sililados antropogénicas requieren combinaciones de elevadas temperaturas y reactivos químicos cáusticos.⁴

Los avances en biología molecular han hecho posible comprender ciertos aspectos de los mecanismos biosintéticos que controlan estas formaciones estructurales en sistemas vivos,⁵ pero desafortunadamente el proceso de biosilicificación es mayoritariamente desconocido.⁶ La elucidación de estos mecanismos de reacción podría llevar al desarrollo de nuevas metodologías sintéticas basadas en este elemento.

Uno de los sistemas modelo de referencia para los estudios de biopolimerización inorgánica han sido las esponjas de tipo silíceas,⁷ que incorporan el silicio como componente principal en su esqueleto en forma de espículas entrecruzadas dando lugar a una cubierta llamada silicalema. Específicamente, las espículas silíceas de la esponja marina, *Tethya aurantia*, constituyen el 75% de su

-
- 3 (a) Lowenstam, H. A. *Science*, **1981**, *211*, 1126. (b) Simpson, T. L.; Volcani, B. E. *Silicon and Siliceous Structures in Biological Systems*; Springer-Verlag: New York, **1981**. (c) Mann, D. G. *Phycologia* **1999**, *38*, 437.
- 4 (a) Brinker, C.; Scherrer, G. W.; *Sol-Gel Science: the chemistry of sol-gel processing*. Academic Press: New York, **1990**. (b) Stober, W.; Fink, A.; Bohn, E. *J. Colloid Interface Sci.* **1968**, *26*, 62.
- 5 Wang, X.; Schoder, H. C.; Wiens, M.; Schlobmacher, U.; Muller, W. E. *Adv. Mar. Biol.* **2012**, *62*, 231.
- 6 (a) D.M. Swift, A.P. Wheeler, *J. Phycol.*, **1992**, *28*, 202.; (b) C.C. Harrison, *Phytochemistry*, **1996**, *41*, 37.
- 7 (a) Simpson, T. L. *The cell biology of sponges*; Springer publishing: New York, USA, **1984**; (b) Barnes, R. S. K.; Calow, P. P.; Olive, P. J. W.; Golgding, D. W.; Spicer, J. I. *The invertebrates: a synthesis*, Blackwell Science: Oxford, **2001**. (c) Medina, M.; Collins, G. C.; Silberman, J. D.; Sogin, M. L. *Proc. Nat. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 17.

peso seco, por lo que este organismo ha sido uno de los más referenciados para el análisis de las proteínas íntimamente asociadas con la biosilificación⁸ (Figura 1).

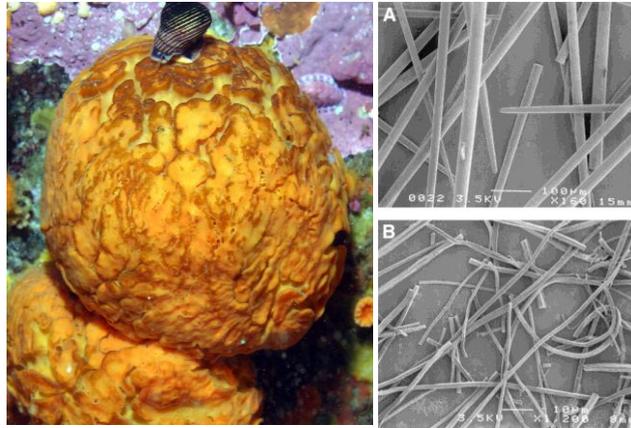


Figura 1: Fotografía de la especie *Tethya aurantium* (naranja de mar) y micrografía mediante microscopio electrónico de espículas de silicio aisladas (x130) (A) y espículas después de desmineralización con HF (x1000) de la misma especie (B).

Estudios biológicos de clonación han determinado que el ácido silícico es incorporado a la esponja a través de un transportador de membrana sensible a la temperatura que se encuentra adyacente a las espículas o en la misma área de formación de estas.⁹ Para entender los mecanismos moleculares que controlan la biosilificación ha sido necesario caracterizar las proteínas ocluidas en las estructuras silicificadas biológicamente.

8 (a) Shimizu, K.; Cha, J.; Stucky, G. D.; Morse, D. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1998**, *96*, 6234. (b) Weaver, J.; Pietrasanta, L. I.; Hedin, N.; Chmelka, B.; Lewis, H.; Hansma, P.; Morse, D. E. *J. Struct. Biol.* **2003**, *144*, 271.

9 (a) Muller, W. E. G.; Belikov, S.I.; Tremel, W.; Perry, C. C.; Gieskes, W. C.; Boreiko, A.; Schoder, H. *Micron.* **2006**, *37*, 107. (b) Muller, W. E. G.; Schlobmacher, U.; Eckert, C.; Krasko, A.; Boreiko, Ushijima, H.; Wolf, S. E.; Tremel, W.; Muller, I. M.; Schroder, H. C. *Eur. J. Cell Biol.* **2007**, *86*, 473.

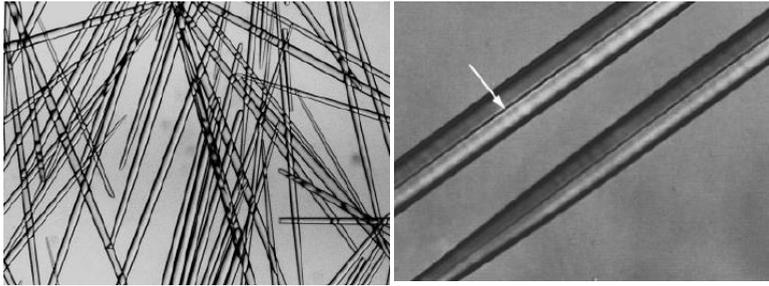


Figura 2. Micrografía de espículas de la especie *Tethya aurantium* de 30µm de diámetro y 2mm de longitud aproximada (izquierda). La imagen derecha revela el filamento axial en el interior de la espícula.

Cada espícula contiene en su interior un filamento axial central de una proteína formada por tres unidades llamadas silicateinas α , β y γ (Figura 2).¹⁰ Los pesos moleculares (29, 28 y 27kDa. respectivamente), composición de los aminoácidos y punto isoeléctrico en las tres silicateinas son similares, lo que sugiere que pertenecen a la misma familia. Además, la clonación y el análisis de las secuencias de los cDNA que codifican para las silicateinas, revelaron una extraordinaria similitud con las proteínas tipo catepsina L, una familia de enzimas hidrolíticas ampliamente conocida (Figura 3).¹¹

Más concretamente, la cisteína presente en el sitio activo de la catepsina, es sustituida por una unidad de serina en la silicateina α , sin embargo, el resto de residuos del centro activo es idéntico. Dos características estructurales distinguen a la silicateina, (i) la ausencia de una vuelta de cuatro aminoácidos presente en la catepsina y (ii) la presencia de una secuencia de seis unidades de serina, que podría ayudar a explicar los mecanismos de biosilicificación y la actividad de las

10 (a) Krasko, A.; Lorenz, B.; Batel, R.; Schorder, H.C.; Muller, I. M.; Muller, W. E. *Eur. J. Biochem.*, **2000**, 267, 4878. (b) Shimizu, K.; Cha, J. N.; Stucky, G. D.; Morse, D. E. *Prod. Natl. Acad. Sci. USA.* **1998**, 95, 6234.

11 (a) Cha, J. N.; Shimizu, K.; Zhou, Y.; Christiansen, S. C.; Stucky, G.D.; Morse, D. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1999**, 96, 361. (b) Barrett, A. J.; Kirschke, H. *Methods Enzymol.* **1981**, 80, 535. (c) Joseph, L. J.; Chang, L. C.; Stamenkovich, D.; Sukhatme, V. P. *J. Clin. Invest.* **1988**, 81, 1621. (d) Kirschke, H.; Wikstrom, P.; Shaw, E. *FEBS Lett.* **1988**, 228, 128.

mismas en la condensación de sílice y polímeros de siloxano modificados orgánicamente.¹²

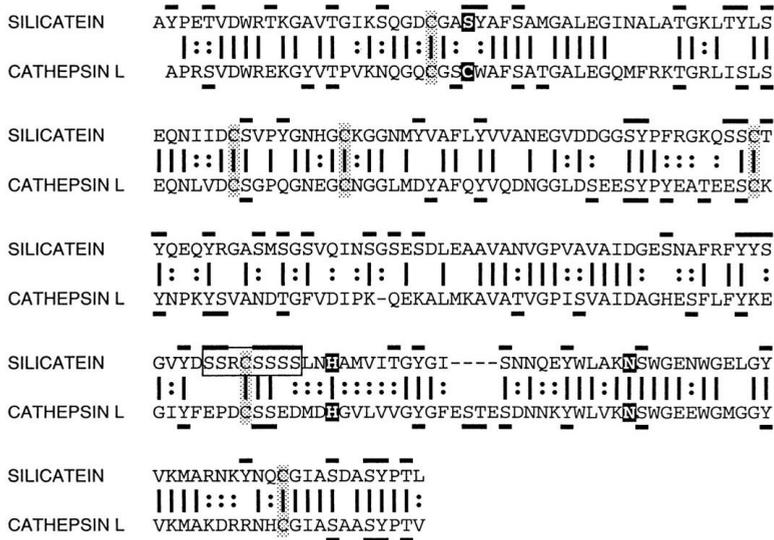


Figura 3. Alineación y comparación de la Silicateína α y Catepsina L. Aminoácidos idénticos están indicados con barras verticales, residuos similares indicados por puntos, aminoácidos catalíticos de la catepsina y sus homólogos en la silicateína, remarcados. Los residuos hidroxilados de ambas proteínas se encuentran subrayados.

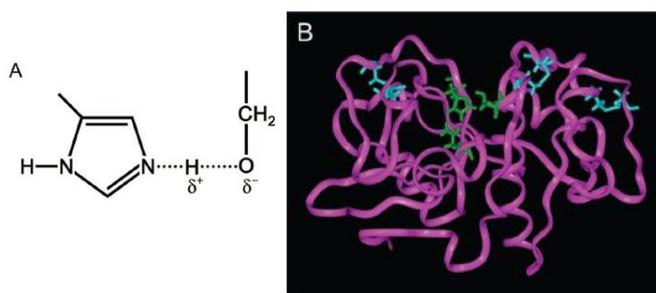


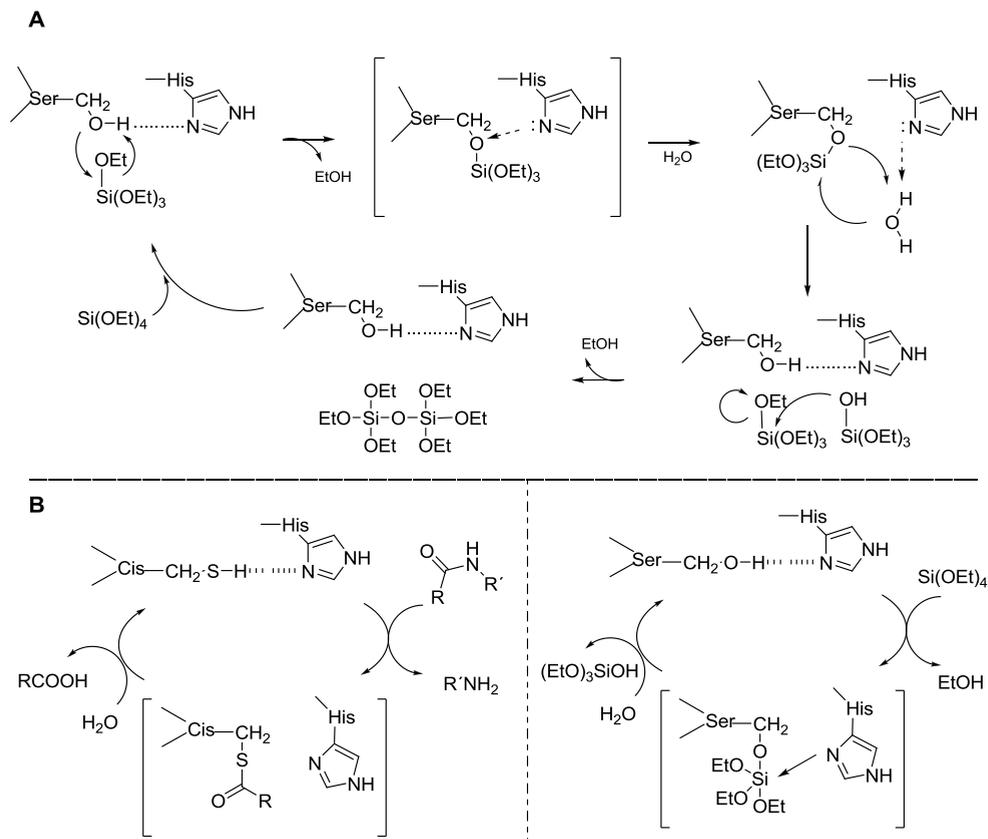
Figura 4. (A) Dibujo esquemático del puente de hidrógeno entre los residuos de serina e histidina del sitio activo de la silicateína α . (B) Modelo de mínima energía de la silicateína, representación del centro activo (verde) y enlaces disulfuro (azul).

12 Shimizu, K.; Milne, D. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1998**, *96*, 6234.

Partiendo de que el mecanismo enzimático de la mayoría de las serinas y cisteínas en las hidrolasas implica el ataque de un grupo alcohol o tiol, sobre el carbonilo de una amida peptídica. Morse y col. propusieron un mecanismo para la actividad de la silicateína α por el cual, el grupo hidroxilo de la serina-26 y el grupo imidazólico de la histidina-165 catalizaban el paso limitante en la policondensación del alcoxisilano, de forma análoga al mecanismo que realiza la catepsina en la hidrólisis peptídica.¹³

El puente de hidrógeno que se produce entre el hidroxilo de la serina y el imidazol de la histidina, aumenta la nucleofilia del átomo de oxígeno que ataca el átomo de silicio del monómero tetraetoxisilano (TEOS) a través de un intermedio proteína-sustrato, que debería estar potencialmente estabilizado como especie de silicio pentavalente mediante el carácter dador del átomo de nitrógeno del imidazol. La posterior hidrólisis de este intermedio regenera el par “serina-histidina” y libera el silanol, formando el producto disiloxano por condensación y eliminación de etanol (Esquema 1).

13 Zhou, Y.; Shimizu, K.; Cha, J. N.; Stucky, G. D.; Morse, D. E. *Angew. Chem: Int. Ed.* **1999**, 38, 780.



Esquema 1. (A) Mecanismo de reacción propuesto para la condensación de trietoxisilano catalizada por la silicateína α , basado en la reactividad del centro activo de las proteasas. Paso catalítico clave del grupo hidroxilo de la Ser26 y el grupo imidazol de la cadena de His165 en el mecanismo propuesto. (B) Comparativa de los mecanismos de acción de catepsina y silicateína. Mecanismo de reacción del residuo de cisteína en la captésina L durante el proceso de ruptura del enlace peptídico (izquierda). Mecanismo de reacción de la silicateína durante el proceso de hidrólisis de tetraetoxietilsilano (derecha).¹⁴

Posteriores ensayos realizados con mutaciones en las silicateínas confirmaron que tanto la serina como la histidina situadas en el centro activo eran necesarias para la actividad hidrolítica. Los resultados demostraron que las sustituciones de estos residuos por aminoácidos incapaces de formar puentes de hidrógeno disminuían dramáticamente la hidrólisis del TEOS. La conclusión que se pudo obtener es que la síntesis de sílica observada *in vitro* era catalizada enzimáticamente *in vivo*. Estas evidencias sugieren que las silicateínas intervienen

dinámicamente en la silicificación de las espículas de las esponjas y representan una nueva ruta de síntesis para la condensación de sílice.

Los resultados obtenidos en la elucidación del mecanismo de hidrólisis y condensación del silicio por la silicateína α resultaron cruciales a la hora de plantear nuevos objetivos basados en unas condiciones favorables energética y medioambientalmente.

Stucky y Deming estudiaron la posibilidad de sintetizar estructuras polipeptídicas de distinta naturaleza, que contuviesen unidades peptídicas capaces de biomimetizar el proceso de biosilicificación de las silicateínas. Sus resultados iniciales mostraron que, homopolímeros de L-lisina, L-cisteína, L-histidina, D/L-serinas, etc, en disolución acuosa de TEOS a pH 7, no producían sílica ni de forma individual ni mezclados entre ellos. Sin embargo, cuando ensayaron polipéptidos con componentes catiónicos, aniónicos y poli-L- lisinas o poli-L-serinas, entre otras combinaciones, se obtenían agregados no porosos de silicio, de distintas estructuras, siendo los ratios de hidrólisis proporcionales tanto a la naturaleza nucleofílica como a los puentes de hidrógeno que presentaban los aminoácidos del polímero¹⁴ (Figura 5).

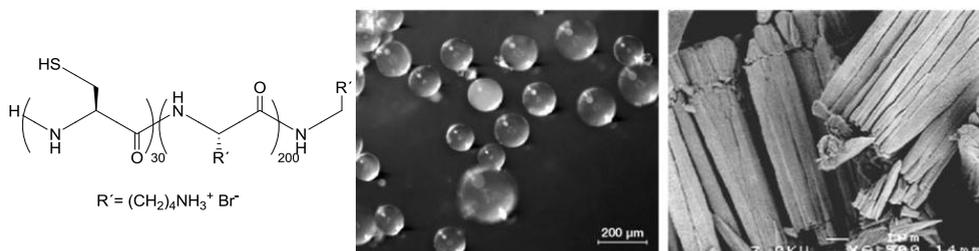


Figura 5. Polipéptido mimético de la silicateína α . Diferentes ordenamientos de silicio tras la hidrólisis de TEOS mediante polipéptidos. Micrografía óptica de esferas de silicio obtenidas bajo condiciones de nitrógeno (centro) y columnas de silicio obtenidas bajo condiciones de aire (derecha).

14 Cha, J. N.; Stucky, G. D.; Morse, D. E.; Deming, T. J. *Nature* **2000**, *403*, 289.

Un razonamiento semejante fue planteado utilizando poliaminas lineales o ramificadas observando una aceleración en el proceso de hidrólisis de TEOS. Sin embargo, la metodología presentada se llevaba a cabo en condiciones ácidas (pH=4.3-6) y en ningún caso se obtenían materiales estructurados.¹⁵

Inspirado en los resultados obtenidos con las mencionadas unidades macromoleculares, Morse y col. estudiaron la actividad catalítica que podrían presentar moléculas de pequeño tamaño que incorporasen en su estructura un grupo nucleófilo y un grupo aceptor de protones. En este caso compuestos como etanolamina, cisteamina o propilamina, demostraron ser activos frente a diferentes fuentes de silicio, obteniendo nuevamente sólidos no porosos.¹⁶

2. Materiales porosos. Zeolitas y compuestos mesoestructurados

La porosidad de un material se podría definir como la medida de sus espacios vacíos, esto es, de los poros o cavidades que lo constituyen. Esta definición permite imaginar el papel de un poro como un pasadizo o camino entre la superficie externa e interna de un sólido, permitiendo el paso de vapores, líquidos y sólidos al interior o exterior del material.

Los materiales porosos se clasifican según la IUPAC en función de su tamaño de poro de la siguiente manera,¹⁷ *a*) materiales microporosos (aquellos que presentan un tamaño de poro inferior a 20Å), *b*) materiales mesoporosos (aquellos que presentan un diámetro de poro entre 20Å y 500Å) y *c*) materiales macroporosos (aquellos que presentan un diámetro de poro superior a 500Å).

15 Menzel, H.; Horstmann, S.; Behrens, P.; Barnreuther, P.; Kruegger, I.; Jahns, M. *Chem Commun.* **2003**, 21, 2994.

16 Roth, K. M.; Zhou, Y.; Yang, W.; Morse, D. E. *J Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 325.

17 Sing, K. S. W.; Everett, D. H.; Haul, R. A. W.; Moscou, L.; Pierotti, R. A.; Rouquerol J.; Siemieniewska, T. *Pure Appl. Chem.* **1985**, 57, 603.

En el campo de los materiales porosos, los científicos aspiran como objetivo principal al control del tamaño, forma, uniformidad y periodicidad de las cavidades, así como de los átomos o moléculas que las constituyen. El control y el ajuste preciso de estas propiedades permiten que puedan conseguirse diferentes materiales para el desempeño de una función deseada en una aplicación particular.

Un ejemplo ilustrativo, es la necesidad de sintetizar zeolitas con determinadas características para ser usadas como catalizadores selectivos en varias reacciones. Dicha selectividad se basa en su estrecha distribución de tamaño de poro, la cual permite que solo determinadas moléculas, entren o abandonen las cavidades, en función de su tamaño, forma y afinidad estructural.

Las zeolitas son sin duda una de las familias de materiales porosos más importantes académica e industrialmente hablando.¹⁸ Este término es usado para denotar aluminosilicatos cristalinos microporosos (menos de 2nm de diámetro) de origen natural o sintético. Estructuralmente las zeolitas son complejas y pueden considerarse polímeros inorgánicos cristalinos basados en una red tridimensional de tetraedros de SiO₄ y AlO₄ enlazados entre sí a través de los oxígenos de los vértices. Como consecuencia de la sustitución isomórfica de una proporción de iones Si⁺⁴ por iones Al⁺³, se introduce una cierta carga negativa en la estructura que es compensada por protones (ácidos de Brönsted) u otro tipo de cationes (ácidos de Lewis) que se sitúan en el interior de los poros.¹⁹

Las distintas maneras en las que los tetraedros Si(Al)O₄ se enlazan en el espacio dan lugar a una amplia serie de sistemas de canales y cajas en una, dos o tres dimensiones que van a definir las características de los materiales zeolíticos.²⁰ La configuración concreta que adopta la red es específica de cada material, aunque

18 Para revisiones de zeolitas: a) Ma, Ying, Tong, W.; Zhou, H.; Suib, S. L. *Microporous Mesoporous Mat.* **2000**, *37*, 243. b) Cejka, J.; Corma, A.; Zones, S. “*Zeolites and Catalysis*” **2010**, Ed. Wiley-VCH. c) Davis, M. E.; Lobo, R. F. *Chem. Mater.* **1992**, *4*, 756.

19 (a) Corma, A. *J. Catal.* **2003**, *216*, 298. (b) Yang, S.; Lach, M.; Vaisman, I.; Blaisten-Barojas, E.; Li, X.; Karen, V. L. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **2010**, *39*.

20 (a) Roman, D. L.; Valyocsik, E. W. *Inorganic Synthesis* **1995**, *30*, 227. (b) Meier, W. M. *Pure Appl. Chem.* **1986**, *58*, 1323.

pueden reconocerse muchos elementos comunes que permiten agrupar las estructuras en unas pocas familias. La unidad básica es un tetraedro TO_4 ($T=Si^{+4}$, Al^{+3}). La unión de un número determinado de tetraedros genera las denominadas unidades secundarias, tales como anillos simples, anillos dobles o incluso poliedros. Por otro lado, la unión de varios anillos puede dar lugar a estructuras terciarias importantes como la caja tipo sodalita. Las distintas maneras de enlazar este tipo de estructuras en una red originan las distintas topologías de la estructura.²¹

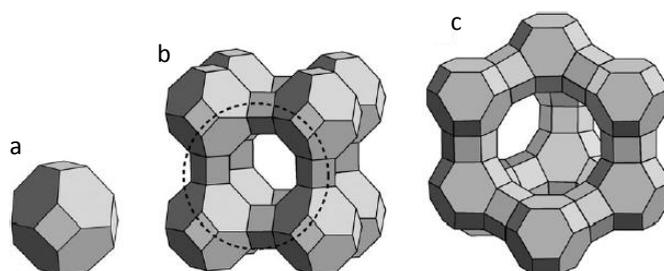


Figura 6. Representación de algunas estructuras de zeolitas. Átomos de silicio situados en los vértices y unidos por líneas. a) Sodalita o caja β . b) zeolita A, las cajas β se unen unas a otras por anillos de cuatro miembros dobles y forman una caja α marcada con un círculo. c) zeolita Y, las cajas de sodalita se conectan a través de anillos de seis miembros dobles.²¹

Indiscutiblemente, el principal inconveniente de los materiales zeolíticos es su limitado tamaño de poro.

21 (a) Bougeard, D.; Smirnov, K, S. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9*, 226. (b) Vjunov, A.; Fulton, J. L.; Huthwelker, T.; Pin, S.; Mei, D.; Schenter, G. K.; Govind, N.; Camaioni, D.; Hu, J.; Lercher, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 8296. (c) Newsam, J. M. *Science* **1986**, *231*, 1093. (d) Bu, X.; Feng, P.; Stucky, G. D. *Science* **1997**, *278*, 2080. (e) Ribeiro, F.; Álvarez, F.; Henriques, C.; Lemos, F.; Lopes, J. M.; Ribeiro, M. F. *J. Mol. Catal. A* **1995**, *96*, 245.

Los anillos más grandes encontrados en las estructuras de las zeolitas, constaban de 12 miembros lo que implicaba la existencia de problemas de difusión para moléculas mayores de 8,5Å.²²

Durante 1980 y varias décadas después, el principal objetivo en la síntesis de estos materiales ha sido el desarrollo de mayores tamaños de poro. Investigadores de Union Carbide obtuvieron aluminofosfatos (AIPO)²³ y silico-aluminofosfatos (SAPO),²⁴ posteriormente, en 1996, la U. de Texas en Dallas y el Instituto de Tecnología en California, confirmaron la obtención de materiales de canales de 14 miembros unidireccionales y diámetros de poro 8,1Å y 10Å respectivamente (UTD-1 y CTI-5) con propiedades comparables a zeolitas con anillos de menor tamaño.²⁵

Más recientemente Corma y col. han sintetizado la zeolita ITQ15 formada por canales de 14 miembros y 12 miembros interconectados.²⁶ Algo más tarde, los mismos autores, han publicado la síntesis de la zeolita ITQ33 constituida por canales de 18 y 10 miembros interconectados con tamaño de poro de 12Å y un comportamiento catalítico exclusivo en el proceso FCC.²⁷

22 (a) Pauling, L. *PNAS* **1930**, *16*, 453. (b) Daniels, R. H.; Kerr, G. T.; Rollmann, L. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 3097. (c) Bennett, J. M.; Gard, J. A. *Nature*, **1967**, *214*, 1005. (d) Lapierre, R. B.; Rohrman, A. C.; Schlenker, J. D.; Wood, M. K.; Rohrbaugh, W. J. *Zeolites* **1985**, *5*, 346.

23 Wilson, S. T.; Lok, B.; Flanigen, E. *U.S. Patent* **1982**, 4310440.

24 Lok, B. M.; Messina, C. A.; Cannan, T. R.; Flanigen, E. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 6092.

25 (a) Freyhardt, C. C.; Tsapatsis, M.; Lobo, K. P.; Balkus, K. J.; Davis, M. E. *Nature* **1996**, *381*, 295. (b) Lobo, R. F.; Tsapatsis, M.; Freyhardt, C. C.; Khodabandeh, P.; Wagner, C. Y.; Chen, K. J.; Balkus, C.; Zones, S. I.; Davis, M. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8474. (c) Wessels, T.; Baerlocher, L. B.; McCusker, C.; Creighton, E. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6242. (d) Wagner, P.; Yoshikawa, M.; Tsuji, K.; Davis, M. E.; Lovallo, M.; Tsapatsis, M. *Chem. Commun.* **1997**, 2179. (e) Yoshikawa, M.; Wagner, P.; Lovallo, M.; Tsuji, K.; Takewaki, C.; Chen, L.; Beck, W.; Jones, C.; Tsapatsis, M.; Zones, S. I.; Davis, M. E. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 7139.

26 Corma, A.; Diaz-Cabañas, M. J.; Rey, F.; Nicolopoulos, S.; Boulahya, K. *Chem. Comm.* **2004**, 1356.

27 Corma, A.; Díaz-Cabañas, M. J.; Jordá, J. L.; Martínez, C.; Moliner, M. *Nature* **2006**, *443*, 842

Los materiales mesoestructurados permiten solventar las limitaciones en cuanto al tamaño de poro que presentan las zeolitas.

En 1992 la Mobil Research and Development Corporation sintetizaron los primeros materiales mesoporosos ordenados, con una estrecha distribución de diámetros, acompañados de elevada área superficial y volumen de poro denominados M41S.²⁸

Probablemente, la MCM-41,²⁹ sea el compuesto más importante y más estudiado dentro de esta familia de materiales, sin embargo, alteraciones en las metodologías sintéticas permitieron obtener estructuras cúbicas (MCM-48)³⁰ o laminares (MCM-50)³¹ entre otras, dentro de esta misma familia de materiales. Como resultado de estos estudios las estructuras mesoporosas crecieron exponencialmente durante los siguientes años.³²

-
- 28 (a) Beck, J. S.; Vartuli, J. C.; Roth, W. J.; Leonowicz, M. E.; Kresge, C. T.; Schmitt, K. D.; Chu, C. T. W.; Olson, D. H.; Sheppard, W.; McCullen, S. B.; Higgins, J. B.; Schelker, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10834. (b) Kresge, C. T.; Leonowicz, M. E.; Roth, W. J.; Vartuli, J. C.; Beck, J. S. *Nature* **1992**, *359*, 710.
- 29 (a) Zhao, X.; Lu, G. Q.; Millar, G. J. *Ind. Eng. Chem. Res.* **1996**, *35*, 2075. (b) Bhattacharyya, S.; Lelong, G.; Saboungi, M.-L. *J. Exp. Nano.* **2006**, *1*, 375.
- 30 Kim, S.; Ida, J.; Gulians, W.; Lin, J. Y. *J. Phys. Chem. Chem. B* **2005**, *109*, 6287.
- 31 Zhang, J.; Luz, Z.; Goldfard, D. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 7087.
- 32 (a) Pal, N.; Bhaumik, A. *RSC. Adv.* **2015**, *5*, 24363. (b) Jacobsen, C.; Madsen, C.; Houzvicka, J.; Schmidt, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 7116. (c) Schmidt-Winkel, P.; Glinka, C. J.; Stucky, G. D. *Lagmuir* **2000**, *16*, 356. (d) Naik, S. J.; Elangovan, P.; Okubo, T.; Sokolov, I. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *30*, 111.

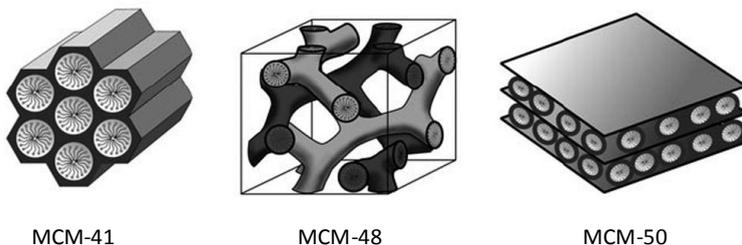


Figura 7. Estructuras de materiales M41S. MCM-41 (hexagonal), MCM-48 (cúbica) y MCM-50 (laminar).³³

No obstante, cabe señalar que las paredes silíceas de estos materiales no presentan ninguna ordenación y se encuentran repletas de efectos estructurales procedentes de la hidrólisis de la fuente de sílice y su posterior condensación. Esta condensación no es completa por lo que quedan átomos de silicio unidos a grupos hidroxilo, denominados silanoles, en las paredes. Por lo tanto los materiales mesoestructurados se diferencian de las zeolitas fundamentalmente en que las paredes de sus poros no son cristalinas, sino que están constituidas por sílices que no tienen orden a nivel atómico, de modo que el orden en estos materiales se encuentra relacionado con la disposición de los poros (ordenamiento mesoscópico).

3. Síntesis de materiales porosos

La síntesis de esta nueva familia de silicatos mesoporosos implica un proceso sol-gel en condiciones hidrotermales. La novedad presentada por investigadores de la Mobil consistía en el uso de moléculas de surfactante con cadenas hidrocarbonadas largas, como agentes directores de estructura (ADS o “templates”) en lugar de usar las tradicionales especies catiónicas orgánicas simples, ampliamente usadas como ADS en la formación de estructuras zeolíticas microporosas.

33 Gibson, L. T. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 5163.

Los surfactantes en disolución acuosa alcanzan su configuración de mínima energía reduciendo el contacto de las cadenas hidrocarbonadas, formando micelas y situando los grupos polares en contacto con el medio acuoso.³⁴ La concentración micelar crítica 1, se define como la concentración más baja a la cual se observa la formación de micelas. La concentración micelar crítica 2, es la concentración a la cual las micelas esféricas empiezan a transformarse en micelas cilíndricas, siendo ambas variables dependientes de la temperatura y tipo de surfactante.³⁵

3.1 El proceso sol-gel

El denominado proceso sol-gel se basa en la hidrólisis y policondensación de precursores monoméricos tipo $\text{Si}(\text{OR})_4$. Los alcoxisilanos más ampliamente empleados son el $\text{Si}(\text{OMe})_4$ (tetrametoxisilano, TMOS) y el $\text{Si}(\text{OEt})_4$ (tetraetoxisilano, TEOS). Debido a su inmiscibilidad en agua, es frecuente la adición de un co-disolvente (alcohol) como agente homogeneizador. Sin embargo, el propio alcohol es generado como subproducto durante la reacción de hidrólisis de los silanos. La eficacia del proceso necesita de condiciones ácidas o básicas y en ambos casos, la reacción ocurre por ataque nucleofílico de un átomo de oxígeno de una molécula de agua al átomo de silicio.³⁶

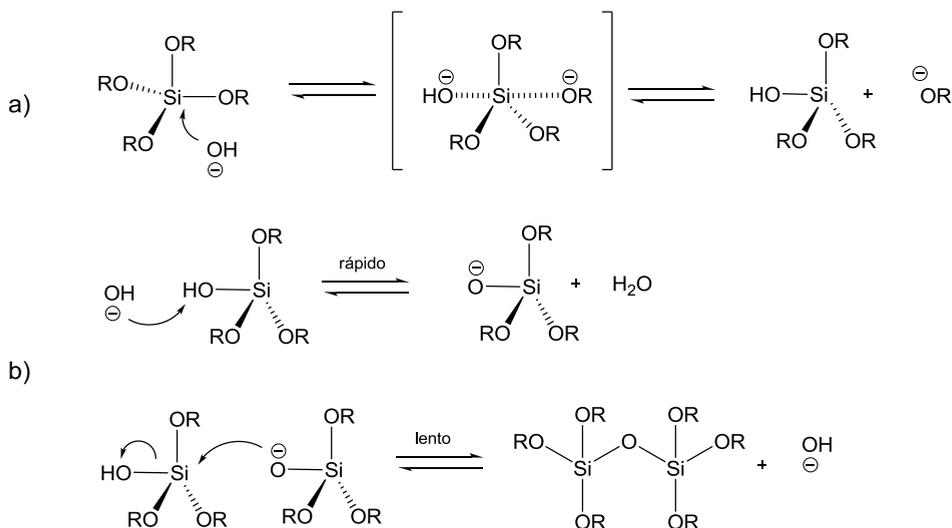
Tanto la hidrólisis básica como ácida son procesos en los que se forma un intermedio pentacoordinado mediante un mecanismo $\text{S}_\text{N}2$. En condiciones básicas, un grupo alcoxi es reemplazado por un grupo hidroxilo con inversión del tetraedro de silicio durante el proceso de hidrólisis. La abstracción del protón del silanol por el hidróxido es el primer paso de la condensación, dando lugar al ion silóxido que a

34 Cuii, X.; Mao, S.; Liu, M.; Yuan, H.; Du. *Langmuir* **2008**, *24*, 10771.

35 Domínguez, A.; Fernández, A.; González, N.; Iglesias, E.; Montenegro, L. *J. Chem. Educ.* **1997**, *74*, 1227.

36 (a) Osterholtz, F. D.; Pohl, E. R. *J. Adhesion Sci. Technol.* 1992, *6*, 127. (b) Julve, A.; Balzer, C.; Barthez, J. M.; Guizard, C.; Larbot, A.; Cot, L. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **1995**, *4*, 89.

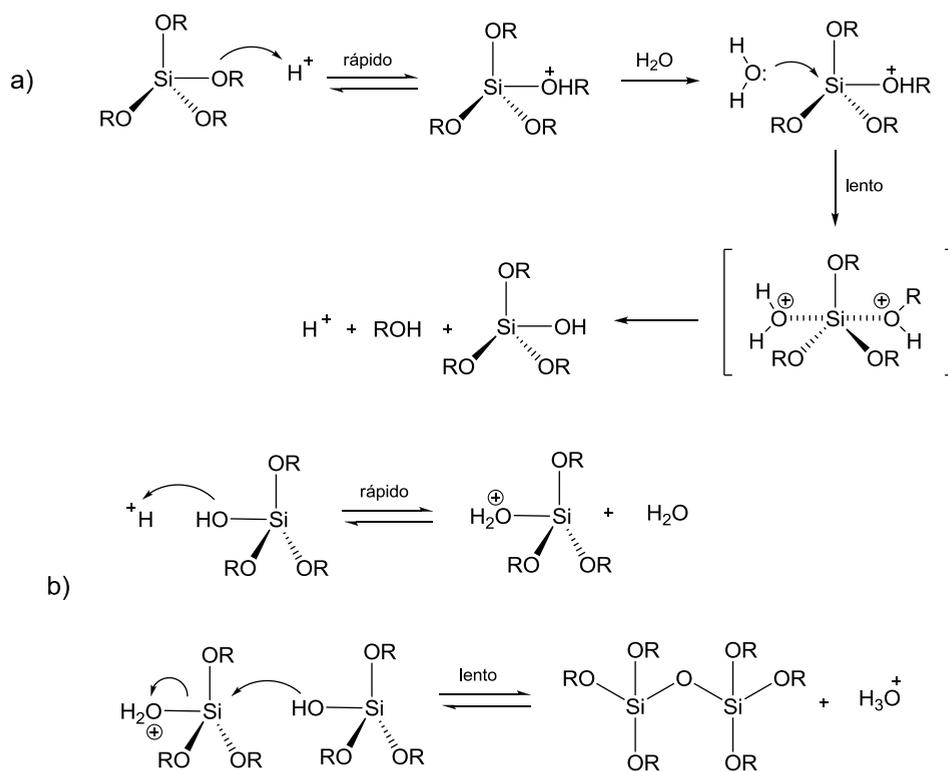
su vez ataca a un silanol formando un enlace siloxano y regenerando el anión hidróxido (Esquema 2).³⁷



Esquema 2. Mecanismo de hidrólisis (a) y condensación (b) de un alcoxisilano en condiciones básicas.

Por el contrario, en condiciones ácidas, el grupo alcoxi es previamente protonado, retirando densidad electrónica del átomo de silicio, haciéndolo más electrófilo y susceptible del ataque nucleofílico del agua para la formación del silanol. Dicho silanol es protonado para que el átomo de silicio actúe como electrófilo frente a otro silanol mediante un mecanismo SN2 durante la etapa de condensación. De nuevo el resultado es la formación de un enlace siloxano, en este caso con la regeneración de iones hidronio (Esquema 3).³⁸

37 (a) Brinker, C.; Scherer, G. *Sol-Gel Science: The physics and Chemistry of Sol- Gel Processing*. Academic Press, Inc: N. Y., USA **1990**. (b) Schubert, U.; Husing, N. *Synthesis of inorganic materials*; Wiley-VCH, **2005**. (c) Yoldas, B. E.; *J. Non-Crystal. Solids* **1984**, 63, 145. (d) Brinker, C. J. *Sol-gel processing of silica. In the Colloid Chemistry of Silica*, Am. Chem. Soc., **1994**, 18, 361. (d) Iler, R. K. *The chemistry of silica: solubility, polymerization, colloid and surface properties, and biochemistry*, Wiley-VCH, **1989**.



Esquema 3. Mecanismo de hidrólisis (a) y condensación (b) de un alcoxilano en condiciones ácidas.

En condiciones ácidas, la hidrólisis se ve favorecida, siendo la condensación la etapa determinante, esto conduce a una mayor concentración de silanoles frente a enlaces siloxanos, dando lugar a especies mínimamente ramificadas. Por el contrario la hidrólisis del alcóxido es más rápida en condiciones básicas, dando lugar a materiales con pocos grupos silanoles en la red.

En condiciones neutras, la hidrólisis molecular no se observa y por lo tanto no permite la condensación (Figura 8). Cuando se desea trabajar en estas condiciones, la presencia de iones fluoruro es necesaria,³⁸ sin embargo, se ha demostrado que después del proceso de síntesis, parte de los átomos de flúor permanecen ocluidos

38 Cundy, C. S.; Cox, P. A. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 663.

en la estructura,³⁹ modificando la densidad electrónica de los átomos de silicio adyacentes por la formación de entidades tipo $[\text{SiO}_{4/2}\text{F}]$.⁴⁰

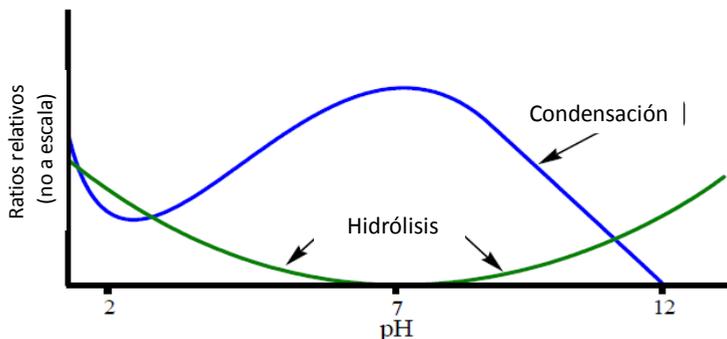


Figura 8. Efecto del pH en la hidrólisis y condensación utilizando TEOS como monómero inorgánico.^{43b}

3.2 Síntesis propuesta para la obtención de MCM-41

La síntesis de la MCM-41 descrita por Kresge y col. y Beck y col. para Mobil Composition of Matter, puede considerarse uno de los ejemplos más representativos de la efectividad del proceso sol-gel para la obtención de materiales mesoporosos. Implica el uso de cloruro de hexadeciltrimetilamonio ($\text{C}_{16}\text{H}_{33}(\text{CH}_3)\text{N}^+\text{Cl}^-$) (CTAC) como surfactante director de la estructura, que en primera estancia forma micelas en disolución acuosa y posteriormente se agregan en una formación hexagonal cilíndrica formando el template. Tras la adición del monómero inorgánico, éste interacciona con la micela creando paredes sililadas en el sentido del apilamiento micelar. Posterior calcinación del surfactante proporciona cilindros huecos en ordenamiento hexagonal.⁴¹

39 (a) Cambor, M. A.; Villaescusa, L. A.; Diaz-Cabañas, M. J. *Top. Catal.* **1999**, *9*, 59-62; (b) Fyfe, C. A.; Brouwer, D. H.; Ronserberg, H.; Lewis, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6882- 6885.

40 Koller, H.; Wolker, A.; Eckert, H.; Panz, C.; Behrens, P. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2823-2825.

41 Gibson, L. T. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 5163.

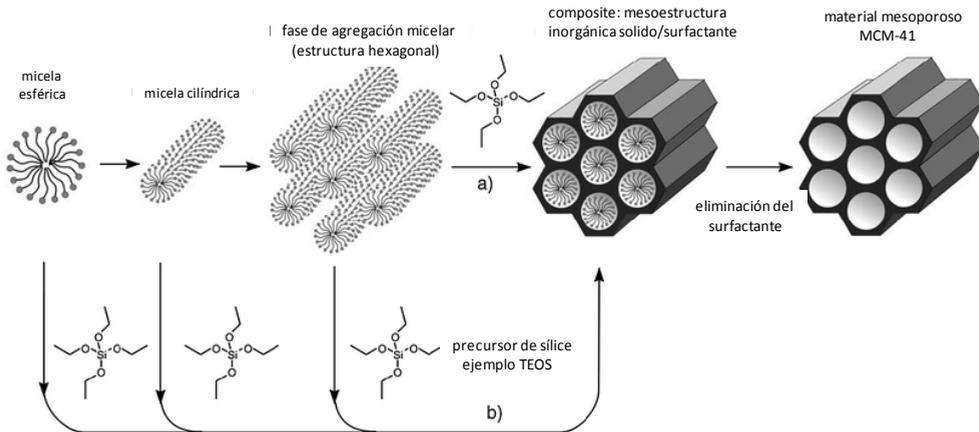


Figura 9. Formación de material mesoporoso MCM-41. Formación de la pared inorgánica posterior a la alineación y agregación de las micelas (ruta a)). Incorporación de los monómeros inorgánicos durante el proceso continuo de agregación micelar (ruta b)).⁴²

La manera por la cual las micelas se agregan durante el proceso de síntesis sigue sin estar definido y se han propuesto dos tipos de mecanismos, no excluyentes entre ellos y muy posiblemente dependientes de la concentración del surfactante en el medio acuoso (Figura 9). En el primer mecanismo, con exceso de surfactante, las micelas alcanzan la concentración micelar crítica 2 formando “varillas” que dirigen la polimerización del silano a su alrededor. En el segundo mecanismo, posiblemente a bajas concentraciones de surfactante, las unidades inorgánicas en el medio inician y facilitan la formación de la mesoestructura.⁴²

Cabe señalar que la metodología es una generalización para la síntesis de compuestos mesoestructurados M41S, de esta manera cambios en el ADS, temperatura, relación molar surfactante/aluminosilicato, proporcionan materiales como MCM-50, MCM-48, etc.⁴³

42 (a) Chen, C. Y.; He, H. Y.; Zhou, W. Z.; Klinowski, J. *Microp. Mat.* **1993**, 2, 17. (b) Alothman, Z. A. *Materials* **2012**, 5, 2874.

43 Wenyih, F. L.; Mccarthy, R.; Kay, R. E. *Patent* **2011**, EP2696978 A1.

4. Actividad catalítica de materiales porosos

Los materiales porosos se han postulado como elementos de alto interés en aplicaciones muy diversas, desde la adsorción, detección y separación de compuestos hasta la biotecnología, pasando por el campo de la catálisis, donde son ampliamente utilizados en la industria.⁴⁴ A este tipo de materiales se les atribuyen propiedades singulares que los hacen especialmente interesantes, como por ejemplo, a) elevada superficie y capacidad de absorción, b) posibilidad de controlar su hidrofobia o hidrofilia, c) tamaños de canales y cavidades dentro del intervalo de dimensiones de muchas moléculas de interés (5-12Å), d) posibilidad de incorporar en la estructura diferentes especies metálicas u orgánicas y e) especificidad de la estructura porosa para el reconocimiento de moléculas o selectividad de forma.⁴⁵

Posiblemente el considerable éxito de estos materiales como catalizadores se debe a las dos últimas propiedades señaladas.

La selectividad de forma puede considerarse de tres tipos, selectividad hacia el reactivo, selectividad hacia el producto, o selectividad hacia el estado de transición (Figura 10). La primera de ellas se considera una selección puramente estructural donde el tamaño de poro permite el paso a los centros catalíticos de aquellas moléculas menos impedidas. Un importante proceso industrial que aprovecha este tipo de separación es el desparafinado catalítico (dewaxing).⁴⁶

44 Makowski, P.; Deschanel, X.; Grandjean, A.; Meyer, D.; Toquer, G.; Goerrmann, F. *New. J. Chem.* **2012**, *36*, 531.

45 Davis, M. E. *Ind. Eng. Chem. Res.* **1991**, *30*, 1675.

46 Rakoczy, R. A.; Morse, P. M. *Hydrocarbon Processing* **2013**, 67.

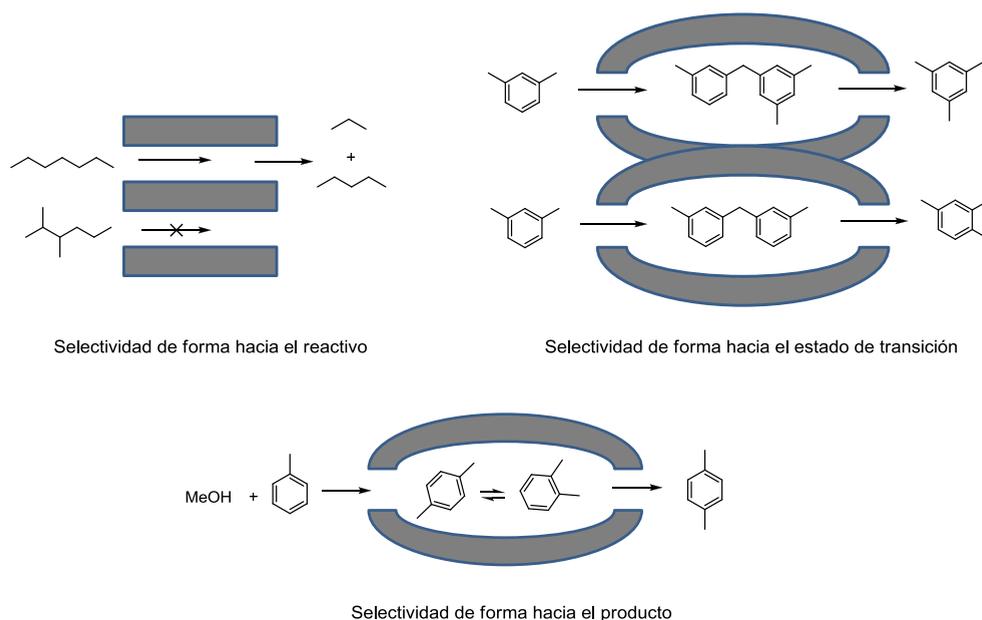


Figura 10. Selectividad de forma en materiales porosos.

La selectividad hacia el producto se produce cuando solo determinadas moléculas, de ciertas dimensiones, pueden difundir fuera de los poros de entre todas las especies formadas en el interior de los mismos, por ejemplo, la metilación y desproporción del tolueno en la zeolita ZSM5.⁴⁷

La selectividad hacia el estado de transición tiene lugar cuando ciertas reacciones son impedidas porque el correspondiente estado de transición requiere más espacio que el disponible en las propias cavidades, produciéndose un mecanismo molecular restrictivo o limitante. Un ejemplo en este sentido es la desproporción de m-xileno a tolueno y trimetilbencenos en la zeolita Y.⁴⁸

47 He, Z.; Jinghong, M.; Qiangqiang, Z.; Zhang, L.; Ruifeng, L. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2014**, *53*, 13819.

48 Zhang, Y.; Qingyun, S.; Wang, Z.; Xin, D.; Han, H.; Xiyan, G.; Xi, Y. *Chem. Eng. Technol.* **2008**, *31*, 1856.

La modificación de la composición de la red inorgánica, es posible por síntesis directa (mezclas que contienen tanto los precursores de silicio como los heteroelementos a incorporar) o por tratamiento “post-síntesis” (o *grafting*), donde la alteración se produce sobre un material ya preparado y definido. Los resultados de ambas metodologías no son necesariamente idénticos. Mientras el método directo da como resultado incorporaciones homogéneas en el material, el tratamiento post-sintético, modifica primordialmente la superficie externa manteniendo el ordenamiento inicial de la estructura.⁴⁹

La posibilidad de incorporar diferentes especies metálicas a los materiales ha permitido dotarlos de propiedades redox y ácido-base con interesantes aplicaciones en el campo de la catálisis⁵⁰. Numerosos estudios se han publicado para introducir heteroátomos trivalentes (Al, B, Ga, Fe) o tetravalentes (Ti, V, Sn, Nb) en la red porosa. En este sentido, catalizadores mesoporosos activos se pueden preparar, por ejemplo, mediante:

a) adición de átomos como el aluminio o titanio para reacciones catalizadas por ácido, o estaño y niobio para reacciones de oxidación.⁵¹

b) modificaciones con óxidos metálicos para reacciones de metátesis o de hidrodesulfuración.⁵²

c) inmovilización de complejos orgánicos, organometálicos o metálicos (catalizadores homogéneos) en materiales mesoporosos.⁵³

49 (a) Anwander, R. *Chem. Mat.* **2001**, *13*, 4419. (b) Stein, A.; Melde, B. J.; Schroden, R. C. *Adv. Mat.* **2000**, *12*, 1403. (c) Inagaki, S.; Guan, S.; Fukushima, Y.; Ohsuna, T.; Teresaki, O. *Stud. Surf. Sci. Catal.* **2000**, *129*, 155.

50 (a) Taguchi, A.; Schuth, F. *Micropor. Mesopor. Mater.* **2005**, *77*, 1. (b) Stoecker, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9200. (c) Navarro, O. C.; Corma, A.; Iborra, C. S. *Top Catal.* **2009**, *52*, 304.

51 (a) Nowak, I.; Feliczyk, A.; Nekoksová, I.; Cejka, J. *Appl. Catal. A* **2007**, *321*, 40. (b) Boronat, M.; Concepcion, P.; Corma, A.; Navarro, M. T.; Renz, M.; Valencia, S. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 2876

52 Oikawa, T.; Ookoshi, T.; Tanaka, T.; Yamamoto, T.; Onaka, M. *Micropor. Mesopor. Mat.* **2004**, *74*, 93.

La inclusión de átomos individuales suele ser una metodología directa y ampliamente extendida, sin embargo, al igual que los ratios de incorporación, el comportamiento o actividad del catión metálico vendrá condicionada por el pH del medio de reacción. Un claro ejemplo en este sentido es la incorporación de aluminio en diferentes materiales mesoporosos.⁵⁴ Diferentes estudios detallados de materiales tipo (Al)-MCM41 con diferentes concentraciones de Al, han proporcionado una clara evidencia de que una parte mayoritaria del Al está incorporado en la superficie interna de la matriz, manteniéndolo oculto en procesos catalíticos, en claro contraste con las zeolitas donde todos los átomos son accesibles a moléculas o reactivos de pequeño tamaño.⁵⁵

No solo titanio o aluminio han sido incorporados con fines catalíticos, otros elementos como Sn, Zn, o Zr han sido muy efectivos en materiales porosos no cristalinos en reacciones como la oxidación de Baeyer–Villiger,⁵⁶ transesterificaciones⁵⁷ o la reacción de Prins.⁵⁸

La modificación mediante óxidos metálicos es generalmente llevada a cabo mediante impregnación o por expansión térmica, en este aspecto, reacciones como la metátesis de olefinas lineales y algunos éteres insaturados se producen a temperaturas inferiores a 50 °C sobre óxido de Renio (VII) soportado sobre alúminas mesoporosas.⁵⁹ Catalizadores heterogéneos altamente activos también pueden conseguirse mediante el anclaje de complejos organometálicos sobre sílices

53 Melero, J. A.; van Grieken, R.; Morales, G. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3790.

54 (a) Balasubramanian, V. V.; Anand, C.; Pal, R. R.; Mori, T.; Bolhmann, W. Ariga, K.; Tyagi, A. K. Vinu, A. *Microp. Mesop. Mater.* **2009**, *121*, 18. (b) Vinu, A.; Srinivasu, P.; Sawant, D. P.; Alam, S.; Mori, T.; Ariga, K.; Balasubramaniann, V. V. Anand. C. *Microp. Mesop. Mater.* **2008**, *110*, 422.

55 Dedecek, J.; Zilkova, N.; Cejka, J. *Microp. Mesop. Mater.* **2001**, *44*, 299.

56 Jin, J.; Ye, X.; Li, Y.; Liang, L.; Wenru, Z.; Shi, J. *Dalton Trans.* 2014, 43, 8196

57 Youming, N.; Xiaoling, W.; Aiming, S.; Guoliand, H.; Tao, Li. *J. Nat. Gas. Chem.* **2011**, *20*, 237.

58 Minh Do, D.; Jaenicke, S.; Chuah, G.-K. *Catal. Sci. Technol.* **2012**, *2*, 1417.

59 Hamtil, R.; Zilkova, N.; Balcar, H.; Cejka, J. *Appl. Catal. A.* **2006**, *302*, 193.

mesoporosas, en este caso, la estabilidad del complejo es crucial para la actividad del material. Por ejemplo, el acoplamiento de aldehídos con acilaminas para obtener amidocetonas puede conseguirse mediante el anclaje de la sal de N-feniltiazolina sobre MCM41,⁶⁰ al igual que la hidrogenación asimétrica de cetonas aromáticas al inmovilizar complejos de rodio o rutenio quirales sobre SBA-15,⁶¹ entre otras.

Desde un punto de vista catalítico, el número de reacciones y modificaciones que se pueden realizar con tamices moleculares ha ido constantemente en aumento. Tanto los catalizadores “clásicos” basados en modificaciones de sílices o alúminas porosas con metales u óxidos metálicos, como modelos más desarrollados basados en el soporte de complejos organometálicos o líquidos iónicos,⁶² son capaces de optimizar procesos sintéticos ácido-base, redox, multicomponente,⁶³ secuenciales,⁶⁴ o enzimáticos.⁶⁵

60 Zhou, Z.; Meng, Q.; Seifert, A.; Waneger, A.; Sun, Y.; Ernst, S.; Thiel, W. *Microp. Mesop. Mat.* **2009**, *121*, 145.

61 Liu, G.; Liu, M.; Sun, Y.; Wang, J.; Sun, C.; Li, H. *Tetrahedron Asym.* **2009**, *20*, 240.

62 (a) Li, D.; Shi, F.; Deng, Y. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 6791. (b) Gruttadauria, M.; Riela, S.; Lo, M.; Danna, F.; Noto, R. *Chem. Lett.* **2005**, *34*, 624.

63 Pramanik, M.; Bhaumik, A. *Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 933.

64 Sharma, K.; Biradar, A.; Syantini, D.; Asefa, T. *Eur. J Inorg. Chem.* **2011**, *3*, 3174.

65 Kataoka, S.; Oyama, M.; Ohmori, T. *App. Catal. A* **2009**, *359*, 108.

OBJETIVOS II

El término biomimético es frecuentemente utilizado para hacer referencia al proceso de entender y aplicar a problemas humanos, soluciones procedentes de la naturaleza en forma de principios biológicos, biomateriales, o de cualquier otra índole. Un primer paso en la biomimética consiste en imitar formas, estructuras o geometrías naturales, un segundo nivel consiste en imitar un proceso natural.

Con el objeto de buscar alternativas a las condiciones de síntesis tradicionales de materiales porosos basadas en condiciones extremas, el trabajo desarrollado en esta parte de la tesis doctoral abordará:

1-La capacidad de ciertas moléculas sencillas para actuar como biomiméticos de la silicateína α , tanto en la movilización de monómeros de silicio como en la capacidad de formar estructuras porosas, estables y de tamaño controlado.

2-Se estudiará el comportamiento de dichas moléculas en condiciones tamponadas a pH neutro y temperatura ambiente y se utilizarán agentes directores de estructura propios de las síntesis estándar de estos materiales.

3-Del mismo modo, se estudiará la efectividad de la metodología para la incorporación de centros metálicos en la estructura y la efectividad de los mismos en procesos catalíticos.

4-Más concretamente, se considerará la incorporación de zirconio en la síntesis de materiales microporosos y su actividad en la reducción de ciclohexanona, así como la síntesis de estructuras mesoporosas tipo (Ti)-MCM41 y su capacidad catalítica en la reacción de epoxidación de ciclohexeno.

RESULTADOS Y DISCUSION II

1. Hidrólisis y condensación de la fuente de silicio

Estudios publicados anteriormente han demostrado la semejanza química que presentan pequeñas moléculas bifuncionales con el centro activo de la silicateína. Entre numerosos ejemplos, donde estos compuestos presentaban en común, un grupo nucleofílico y un grupo capaz de establecer puentes de hidrogeno, los resultados demostraron que la etanolamina y la cisteamina, eran capaces de hidrolizar un 40% más de TEOS, diez veces más rápido, que otras moléculas semejantes. El análisis morfológico del precipitado recogido en estos casos, mostró partículas esféricas amorfas sin ordenamiento alguno.⁶⁶

Nuestro interés se centró en el estudio de la capacidad que podrían presentar dichas moléculas trabajando a pH neutro y temperatura ambiente, al combinarlas con agentes directores de estructura (ADS) propios de la síntesis de materiales porosos, el ordenamiento que presentarían dichas estructuras tras su calcinación y las posibilidades catalíticas de los materiales sintetizados bajo estas condiciones.

66 Roth, K. M.; Zhou, Y.; Yang, W.; Morse, D. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 325.

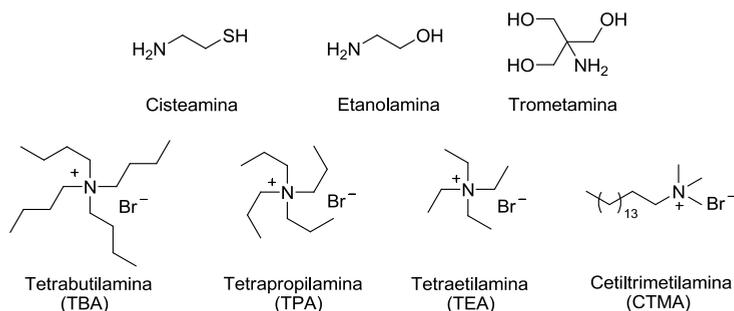


Figura 1. Moléculas orgánicas catalíticas y moléculas utilizadas como agentes directores de estructuras (ADS) para la síntesis de materiales porosos en condiciones biomiméticas.

En el presente trabajo, la obtención de los materiales mencionados se llevó a cabo en viales de polipropileno a partir de geles de composición variable que se mantuvieron en agitación durante diferentes espacios de tiempo a temperatura ambiente (Tabla 1). Finalmente, las muestras se calcinaron a 540° C durante 3h. para eliminar el ADS.

Tabla 1: Condiciones de síntesis de materiales microporosos y mesoporosos.

Muestra	Catalizador / Si ^a	Fuente de Si	ADS	pH	Tiempo (días)
B_micro ^b	0.2 T	TEOS	-----	7.4	7
1 TPA	0.05 T	TEOS	0.5 TPA	7	7
2 TPA	0.2 T	TEOS	0.5 TPA	7.3	7
3 TPA	0.2 T + 0.05 C	TEOS	0.5 TPA	7.2	7
4 TPA	0.2 T + 0.05 E	TEOS	0.5 TPA	7.7	7
1 TEA	0.2 T + 0.05 E	TEOS	0.5 TEA	7.7	7
1 TBA	0.2 T + 0.05 E	TEOS	0.5 TBA	7.5	7
B_meso ^b	-----	TMOS	0.5 CTMA	7.0	2
1 CTMA	0.2 T + 0.05 E	TMOS	0.5 CTMA	7.2	2
2 CTMA	0.2 T + 0.05 E	TMOS	0.16 CTMA	7.1	2

TPA, tetrapropilamina; TEA, tetraetilamina; TBA, tetrabutilamina; CTMA, cetiltrimetilamina; T, trometamina; C, cisteamina; E, etanolamina; TEOS, tetraetilortosilicato; TMOS, tetrametilortosilicato; ^aRatio molar; ^b Blanco

Seleccionamos la etanolamina y la cisteamina como catalizadores bifuncionales biomiméticos, sin embargo, observamos que el tampón comercial, Trizma (TRIS.HCl), utilizado para obtener el pH neutro de las disoluciones,

contenía tris(hidroximetil)aminometano (trometamina), molécula que cumple, teóricamente, con los requisitos para movilizar la fuente de silicio previamente descritos (Figura 1).

De esta manera, los experimentos iniciales se realizaron sobre blancos donde, en ausencia de ADS, el TEOS se hidrolizó utilizando exclusivamente trometamina como catalizador (muestra B_micro, Tabla 1), observando precipitado a los 7 días y demostrando la capacidad de la molécula para actuar como agente biomimético de la silicateína. Una segunda reacción de referencia, en ausencia de catalizador, a pH neutro, utilizando bromuro de tetrapropilamina (TPA) como ADS (ensayo no mostrado) confirmó la nula hidrólisis de TEOS que se produce en rangos de pH neutros.⁶⁷ Como esperamos, en las mismas condiciones, utilizando TMOS como fuente de silicio y CTMA se obtuvo material precipitado pero con mínimo contenido orgánico (muestra B_meso), (Tabla 1 y 2). Las diferencias de las energías de enlace Si-O entre TMOS y TEOS, 477 y 484 kJ mol⁻¹ respectivamente, junto con el impedimento estérico de los grupos etoxilos respecto a los metoxilos determinan la mayor velocidad de hidrólisis del TMOS frente al TEOS a pH neutro y en ausencia de cualquier tipo de catalizador. Sin embargo, en ausencia de catalizador, no se produce la incorporación de ADS en el sólido.

67 Aelion, R.; Loebel, A.; Eirich, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, 72, 5705.

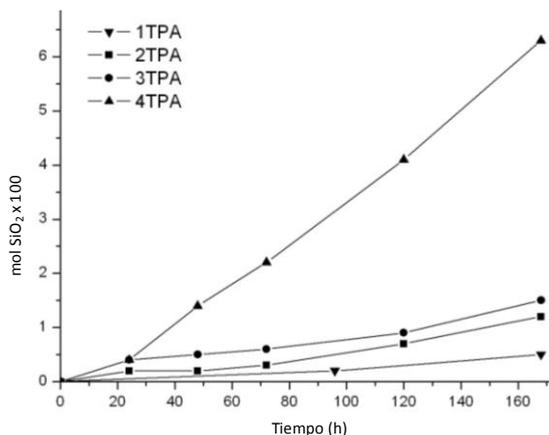


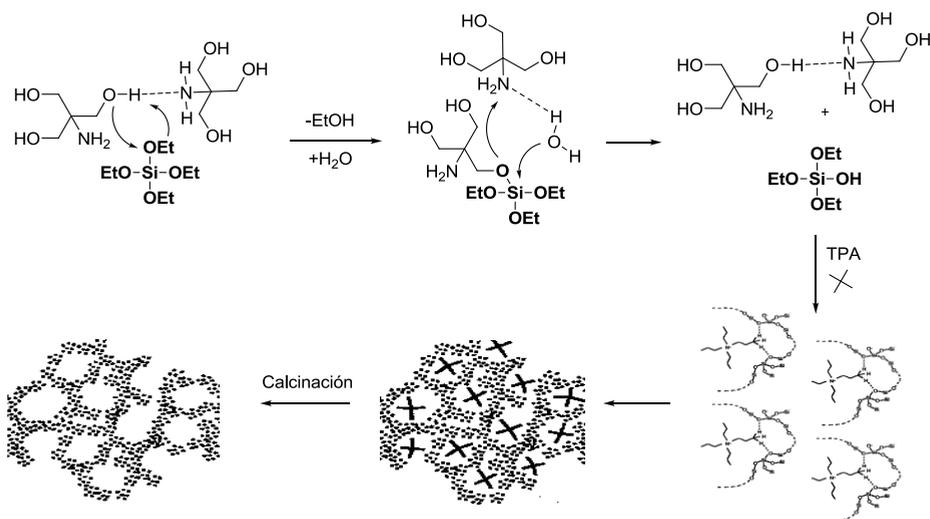
Figura 2. Ratios de hidrólisis de TEOS con diferentes moléculas catalíticas en función del tiempo. Nomenclatura según Tabla 1.

Cuando diferentes disoluciones acuosas de cisteamina y etanolamina se prepararon con la cantidad de trometamina necesaria para tamponar la reacción y se añadieron diferentes tipos de ADS (Tabla 1), los correspondientes análisis elementales y termogravimétricos (TGA), determinaron que el proceso de hidrólisis y condensación se producía incorporando mayor cantidad de material orgánico que en los ensayos control, y que ambos catalizadores capturan cantidades de ADS semejantes (Tabla 2).

Tabla 2. Composición química y propiedades texturales de muestras sintetizadas

Muestra	Pérdida de peso (%)		Composición (%)			Area (m ² g ⁻¹)		Diámetro poro(Å)	Vol.microp. (cm ³ g ⁻¹)
	30-150°C	150-800°C	N	C	H	BET	Microporo		
B_micro	6.4	5.0	0.29	1.30	1.26	165	0	---	---
1 TPA	5.0	17.6	0.77	11.84	2.96	550	450	6.6	---
2 TPA	5.8	14.0	0.73	9.57	2.69	496	432	6.7	---
3 TPA	5.5	13.4	0.74	8.04	2.36	461	405	6.7	---
4 TPA	5.4	14.7	0.90	8.71	2.67	471	440	6.7	0.19
1 TEA	6.5	16.1	1.14	7.69	2.56	387	328	6.3	0.18
1 TBA	3.2	15.4	0.62	8.90	2.47	525	481	6.9	0.23
B_meso	3.3	16.8	0.55	9.05	2.30	704	---	---	---
1 CTMA	6.1	37.0	1.60	25.51	5.37	995	---	~30	---
2 CTMA	8.1	33.1	1.49	23.60	5.01	956	---	~30	---

Sin embargo se observó que la velocidad de hidrólisis en presencia de los agentes catalíticos era muy diferente. Como se muestra en la Figura 2, el residuo sólido recuperado mediante la actividad de la trometamina es mínimo y aumenta levemente en presencia de cisteamina, mientras que la presencia de etanolamina triplica la velocidad de hidrólisis.



Esquema 1. Mecanismo propuesto para la hidrólisis, condensación y obtención de materiales micro y mesoporosos utilizando trometamina como catalizador biomimético y TEOS como fuente de silicio

2. Síntesis y caracterización de materiales

Una vez estudiada la hidrólisis y el autoensamblado en condiciones neutras, el siguiente paso consistió en estudiar la posibilidad de regular el volumen y tamaño de poro. Los materiales obtenidos permanecieron estables tras la eliminación del ADS por calcinación en aire a 540°C. El área superficial BET obtenida con compuestos orgánicos de pequeño tamaño fue de rangos 380-550 m²g⁻¹ siendo mayoritariamente área microporosa. Los resultados mostraron que el tamaño del ADS era el principal factor limitante en el tamaño y volumen de microporo, observándose un aumento de ambas variables proporcional al tamaño del material

orgánico. Las medidas de adsorción de argón indicaron que los máximos de microporo se encontraban a 6.3, 6.7 y 6.9 Å (Tabla 2) utilizando TEA, TPA y TBA respectivamente.

Los materiales sintetizados con TPA mostraron un área próxima a $500\text{m}^2\text{g}^{-1}$, siendo mayoritariamente microporosa, con una distribución de tamaño de poro muy estrecha con el máximo localizado a 6.7Å (Figura 3 izquierda). El tamaño de poro obtenido es levemente mayor que el observado para zeolitas ZSM5 sintetizadas con TPA en condiciones de pH 11 y $150\text{ }^\circ\text{C}$.

La difracción de rayos X (no mostrado) del material sintetizado en condiciones biomiméticas mostró estructura amorfa que fue confirmada por espectroscopia infrarroja (FT-IR). Las bandas de cristalización entre 550cm^{-1} y 650cm^{-1} propias del material cristalino son mínimas en el material sintetizado, mientras que una banda ancha a 460cm^{-1} es propia de materiales amorfos (Figura 4 izquierda).

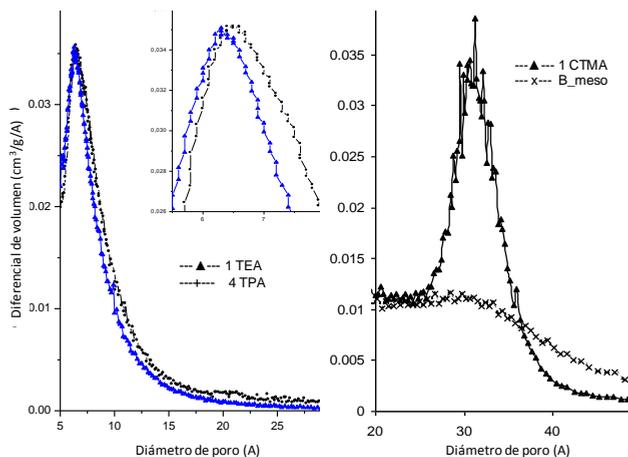


Figura 3. Distribuciones de poro de muestras microporosas (izquierda) y mesoporosa (derecha).

El carácter microporoso no ordenado se confirmó por RMN de ^{29}Si (Figura 4, derecha), la presencia de especies Q4, Q3 y Q2 en ratios 73:23:4 implica que la proporción de especies Q3 y Q2 (silanoles) es mucho mayor que en materiales tipo

ZSM5, pero menor que en formas sililadas mesoestructuradas de MCM41 sintetizadas en condiciones básicas (ratios Q3/Q4~0.61). Estos datos indican que la muestra sintetizada bajo estas condiciones presenta una red formada incompleta con un alto grado de conectividad.

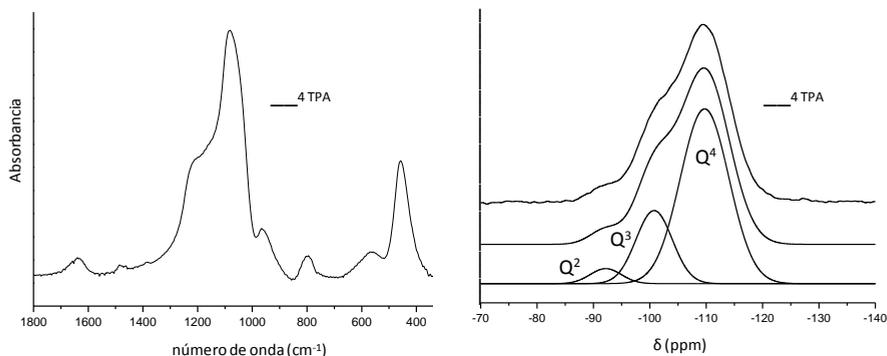


Figura 4. Espectro de IR de la muestra TPA (izquierda) y RMN de Si de la muestra 4 TPA(derecha), de arriba abajo: espectro de material calcinado, simulación deconvolucionada y componentes deconvolucionados individuales Q², Q³, Q⁴.

Cuando se utiliza bromuro de cetiltrimetilamonio (CTMA) como ADS, una disolución tamponada de etanolamina como agente movilizante del silicio y TMOS como fuente de silicio, se obtuvieron materiales mesoporosos tipo MCM41, que se caracterizaron por rayos X y TEM (Figura 5). Los resultados muestran una superficie de área BET de $1000\text{m}^2\text{g}^{-1}$ y una estrecha distribución de tamaño de poro próxima a los 30\AA (Figura 3, derecha), que confirmaba la estructura mencionada. Del mismo modo, experimentos realizados a concentraciones más bajas de CTMA dieron materiales mesoporosos ordenados (Tabla 1 y 2, entrada 2CTMA).

Cuando no se añade catalizador, se obtiene materiales con una ancha distribución de poro y ninguna evidencia de la formación de MCM 41. Además, en presencia de catalizador pero sin CTMA obtuvimos un material amorfo con una superficie específica de $704\text{m}^2\text{g}^{-1}$.

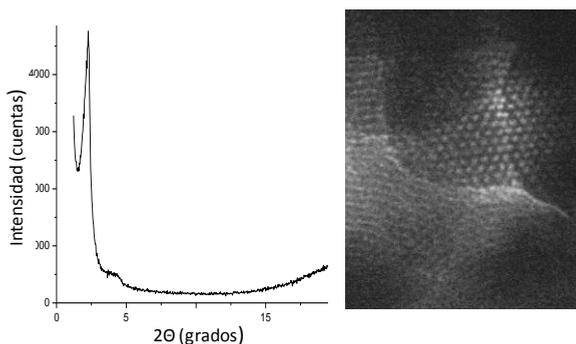


Figura 5. Difracción de rayos X (izquierda) e imagen de TEM (derecha) de la muestra mesoporosa 1_CTMA.

3. Actividad catalítica de los materiales

La introducción de metales de transición con radio atómico mayor que el silicio, en coordinaciones tetraédricas no es tarea fácil principalmente por la rigidez a la que se ve sometida la estructura ordenada. Por ejemplo, la introducción de Zr en la zeolita beta permite catalizar la reducción de grupos carbonilos utilizando alcoholes secundarios como dadores de hidrógeno mediante la reacción de Meerwein-Ponndorf-Verley (MPV),⁶⁸ sin embargo, la cantidad de metal incorporado es muy reducida, limitación que se ve aumentada en procesos donde se desea obtener materiales con más de un centro catalítico metálico.

Dado que la flexibilidad estructural que presentan los materiales micro- y mesoporosos amorfos podría facilitar la incorporación de átomos en red con una menor relación carga/radio que el silicio, consideramos la posibilidad de sintetizar materiales en condiciones biomiméticas capaces de incorporar centros activos metálicos.

Diferentes cantidades de circonio se incorporaron para la obtención de estructuras microporosas utilizando TPA como ADS (Tabla 3).

68 (a) Zhu, Y.; Chuah, G.; Jaenicke, S. *Chem Comm.* **2003**, *15*, 294. (b) Zhu, Y.; Chuah, S.; Xing, H.; Jaenicke, S. *J. Catal.* **2004**, *2*, 1. (c) Ramanathan, A.; Klomp, D.; Peters, J. A.; Hanefeld, U. *J. Mol. Catal.* **2006**, *260*, 62.

Tabla 3: Condiciones de síntesis de muestras microporosas con centros de Zr

Muestra	Catalizador / Si ^a	Fuente de Si	ADS	Si/Zr (1/x)
Zr1	0.2 T + 0.05 E	TEOS	0.5 TPA	30
Zr2	0.2 T + 0.05 E	TEOS	0.5 TPA	60
Zr3	0.2 T + 0.05 E	TEOS	0.5 TPA	120

^aRatios molares. Fuente de Zr: ZrOCl₂ · 8H₂O

Los resultados mostraron la posibilidad de incorporar el metal en el materiales catalíticamente activos para la reducción de ciclohexanona en presencia de 2-propanol en reacciones tipo MPV (Figura 6a)

De forma semejante, materiales mesoporosos conteniendo Ti, tipo MCM41, fueron sintetizados y ensayados en la reacción de epoxidación de ciclohexeno en presencia de hidroperóxido de *t*-butilo (Tabla 4)

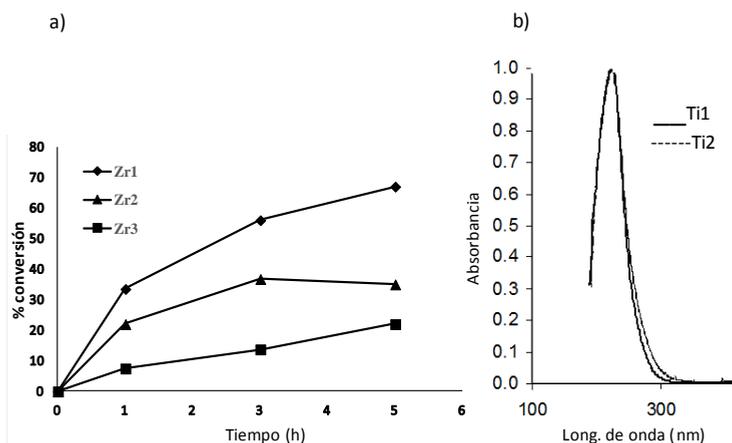


Figura 6. Reacción de reducción de ciclohexanona con materiales catalíticos microporosos (T=80°C; Isopropanol:Ciclohexanona, 98,5:1,5; 20mg catalizador) (izquierda) y espectro de UV-Vis de muestras mesoporosas titanosililadas (derecha).

Tabla 4: Condiciones de síntesis de muestras mesoporosas con centros metálicos de Ti y actividad catalítica sobre la reacción de epoxidación de ciclohexano.

Muestra	Catalizador / Si ^a	Fuente de Si	ADS	TiO ₂ (%)	Conversión (%)
Ti 1	0.2 T + 0.05 E	TMOS	0.5 CTMA	0.9	49.8
Ti 2	0.2 T + 0.05 E	TMOS	0.5 CTMA	1.4	65.6
Ti 3	0.2 T + 0.05 E	TMOS	0.5 CTMA	2.4 ^b	67.1
Ti MCM41	---	---	---	2.0	72.0

^aRatios molares. ^b material obtenido por impregnación. Selectividad >98% en todos los casos

La actividad y selectividad de las muestras preparadas en estas condiciones son muy semejantes a las obtenidas con Ti-MCM41 sintetizada en medio básico o preparada mediante el anclaje de precursores de titanio sobre la MCM-41 pura sílice mostraron ser del rango de los resultados obtenidos tanto para MCM41 posteriormente impregnada⁶⁹ como Ti-MCM41 sintetizada en condiciones convencionales.⁷⁰ Los resultados obtenidos indican que el titanio se encuentra, en nuestro caso, tetraédricamente coordinado en las paredes del material como muestra el espectro UV-Vis de los materiales Ti1 y Ti2 donde se observó una banda a 220 cm⁻¹, propia de Ti⁺⁴,⁷¹ y ausencia de banda a 260 cm⁻¹, asociada a la presencia de Ti⁺⁶ (Figura 6b).

69 Maschmayer, T.; Rey, F.; Sankar, G.; Thomas, J. M. *Nature* **1995**, *378*, 159-161

70 Corma, A.; Navarro, T.; Pariente, P. J. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 147-150

71 (a) Petri, G.; Cesana, G.; De Alberti, F.; Genoni, F.; Leofanti, M.; Paclovan, G.; Paparatto, G.; Rogia, P. *Stud. Surf. Sci. Catal.* **1991**, *68*, 761-764. (b) Blasco, T. Camblor, M. A.; Corma, A.; Pérez-Pariente, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 11806-11809

CONCLUSIONES II

1-Los resultados mostrados en esta parte de la tesis doctoral demuestran que, al igual que los filamentos proteicos de las espículas de organismos marinos (silicateinas) son utilizados tanto para catalizar como para actuar de *template* en la síntesis de sus estructuras, moléculas pequeñas bifuncionales son capaces de hidrolizar y condensar monómeros de silicio en combinación con agentes directores de estructura (templates) dando lugar materiales mesoestructurados extensamente utilizados en la industria y el campo de la catálisis.

2-En concordancia con el proceso biomimético, moléculas como la etanolamina y trometamina actuaron sinérgicamente en condiciones de pH neutro, presión atmosférica, temperatura ambiente y sin fuente de energía externa, en los procesos de hidrólisis, condensación e incorporación de *templates* para la obtención de materiales de tamaño de poro controlado tipo ZSM5 y MCM41.

3-Bajo estas mismas condiciones se incorporaron a las estructuras metales como circonio o titanio que mostraron elevada actividad catalítica en procesos de reducción y epoxidación respectivamente

4-La metodología descrita es comparable a los procesos convencionales para la síntesis de este tipo de materiales en términos de rendimiento, estabilidad, incorporación de centros metálicos activos y control de la arquitectura.

PARTE EXPERIMENTAL II

1. Métodos generales

Todos los reactivos empleados, bromuro de tetrapropilamina (TPA), bromuro de tetraetilamina (TEA), bromuro de tetrabutilamina (TEA), bromuro de cetiltrimetilamina (CTMA), trometamina, cisteamina, tetrametilortosilicato (TMOS), tetraetilortosilicato (TEOS), se obtuvieron de fuentes comerciales (Sigma-Aldrich) y se utilizaron sin ninguna purificación adicional.

La preparación de los materiales micro y mesoporosos se llevo a cabo en viales de polipropileno de 50ml a temperatura ambiente y pH neutro en mezclas con la siguiente composición:

-Material microporoso:

TEOS: 0-0.02 trometamina: 0-0.05 etanolamina/cisteamina: 0.5 ADS: 12 H₂O

-Material mesoporoso:

TMOS: 0-0.02 trometamina: 0-0.05 etanolamina: 0.16 CTMA: 20 H₂O

Un procedimiento de síntesis general consiste en la disolución de 7g (0.03mol) de TPA en 11.5mL de Tris.HCl 1M tampón pH=7.0, adición de 12mL de tetraetilortosilicato (TEOS) (0.05mol) y agitación magnética constante. Tras

homogeneizar, se añadieron 171 μ L de etanolamina y se mantuvo la reacción durante siete días.

2. Ensayos catalíticos

Los materiales microporosos con circonio se sintetizaron a temperatura ambiente según condiciones descritas previamente, utilizando $ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$ como fuente del metal con la siguiente composición molar:

TEOS: 0.2 trometamina: 0.05 etanolamina: X ZrO_2 : 0.5 TPA: 12 H_2O

El ensayo de la reacción de Meerwein-Ponndorf-Verley (MVP) se llevó a cabo en viales de 2ml con agitación magnética continua a 85 °C. Los ratios molares de ciclohexanona y 2-propanol fueron 1.5: 98.5, utilizando 20mgrs de material por 1mL de mezcla de reacción. Diferentes alícuotas se tomaron a diferentes tiempos y la evolución de la composición de analizó por cromatografía de gases

Los materiales mesoporosos con titanio se sintetizaron a temperatura ambiente según condiciones descritas previamente, utilizando etóxido de titanio (IV) como fuente del metal con la siguiente composición molar:

TMOS: 0.2 trometamina: 0.05 etanolamina: X TiO_2 : 0.5 CTMA: 20 H_2O

La reacción de epoxidación de ciclohexeno con hidroperóxido de tert-butilo (TBHP) se llevó a cabo a 25 °C en ratios molares 4:1 (olefina: oxidante) utilizando 2mgr de material por mmol de olefina. Diferentes alícuotas se tomaron a diferentes tiempos y la evolución de la composición de analizó por cromatografía de gases.

3. Técnicas de caracterización

En este apartado se detallan las técnicas de caracterización y las condiciones de análisis empleadas para el estudio de las propiedades de los materiales obtenidos.

3.1 Difracción de rayos X.

La técnica de difracción de rayos X se fundamenta en la incidencia, con un determinado ángulo θ , de un haz de rayos X sobre una muestra plana. Al incidir en el material, parte de este haz, se dispersa en todas direcciones a causa de los electrones asociados a los átomos o iones que encuentra en su trayectoria. Sin embargo el resto del haz puede dar lugar al fenómeno de difracción, que tiene lugar si existe una disposición ordenada de átomos y si se cumplen las condiciones dadas por la ley de Bragg:

$$n\lambda = 2d_{(hkl)}\text{sen}\theta$$

Ésta indica la relación entre el espaciado entre dos planos (d_{hkl}), la longitud de onda (λ), y el ángulo del haz de rayos X difractados (θ), siendo n un número entero.

Generalmente, esta técnica se emplea en la determinación de fases cristalinas. En el caso de materiales amorfos, como es el caso de los materiales mesoestructurados, la disposición regular de los poros produce reflexiones que se manifiestan como reflexiones a ángulos bajos de difracción.

Las muestras pulverizadas fueron colocadas y presionadas en un portamuestras hasta que la superficie expuesta a la radiación quedase lo mas plana y uniforme posible. Los diagramas de difracción de rayos X fueron registrados utilizando un difractómetro Philips X'Pert Plus con radiación CuK_α ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$, 40 kV), velocidad de barrido en el rango de 0.6° a 10.0° (2θ) con un paso de 0.02° (2θ) y un tiempo de análisis de 5 segundos.

3.2 Análisis termogravimétrico.

La termogravimetría se define como una técnica en la que el peso de una sustancia, en un ambiente calentado o enfriado a velocidad controlada, se registra en función del tiempo o de la temperatura. Esta técnica suministra información de una amplia variedad de investigaciones químicas: calcinación, actividad catalítica, quimisorción, descomposición, desolvatación, hidrosopicidad, cinéticas, reacciones en estado sólido, adsorción-desorción, estabilidad térmica, etc.

El análisis térmico diferencial (ATD) es la técnica de análisis térmico más empleada. La diferencia de temperatura entre la muestra y un material de referencia se registra mientras ambos son sometidos al mismo programa de calentamiento. Algunos de los procesos antes referidos son exotérmicos - ocurren con desprendimiento de calor- y otros son endotérmicos - ocurren con absorción de calor-. En la gráfica de ATD se considera exotérmico un pico orientado en el sentido positivo del eje de flujo de calor y endotérmico al contrario, lo que permite identificar su naturaleza de forma muy sencilla, aunque no así la asignación a un determinado proceso.

Estas técnicas consisten en colocar la muestra pulverizada en el interior de un electrobalanza de alta sensibilidad, que está cerrada al ambiente. Una vez cerrada, se hace pasar un flujo de gas (argón o aire) a través de la muestra y se empieza a calentar mediante una rampa diseñada de temperatura. El instrumento puede constar de un ordenador que registra en continuo la temperatura, la pérdida de peso y el flujo de calor.

Conforme ocurre algún proceso de tipo térmico que modifique el peso del sólido se observará una variación en la curva y un máximo o un mínimo en el flujo de calor (según lo absorba o lo desprenda en dicho proceso).

Los cambios de energía que ocurren en la muestra durante el calentamiento (en forma de curva ATD) son claramente observables, siempre que la sensibilidad sea adecuada, y el área del pico en la curva de flujo de calor refleja la energía implicada. La curva ATD es propia de cada material, ya que ligeras variaciones en

la composición química o estructura se reflejan en balances termodinámicos de temperatura o calor de reacción diferentes. Sin embargo, el ATD no es un buen método de identificación y debe ser utilizado junto con otras técnicas (DRX, espectroscopía IR, etc).

Los análisis termogravimétricos se han realizado en una electrobalanza Perkin-Elmer Diamond, previamente calibrada, con platino como material de referencia, y que consta de un termopar de Pt / Pt-Rh (10%).

Las muestras en polvo, con pesos entre 15 y 30 mg, introducidas en portamuestras de platino se han calentado en flujo de aire o argón (100 ml/min) desde temperatura ambiente hasta 900 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. Antes de realizar las medidas se realizó un ensayo en blanco con el portamuestras vacío, para considerarlo línea base y poder sustraer ésta a todos los demás ensayos.

3.3 Análisis textural.

La adsorción es un fenómeno superficial por el que un líquido o un gas (adsorbato) se acumula en la superficie de un sólido (adsorbente). Dependiendo de la naturaleza de la interacción adsorbato-adsorbente, ésta puede ser clasificada como fisisorción o quimisorción. La fisisorción se produce siempre; el calor de adsorción es pequeño (del orden del calor de vaporización del adsorbato), las especies adsorbidas mantienen su estructura electrónica y es un proceso que no necesita de energía de activación.

Las fuerzas de cohesión de los átomos del interior de un sólido se encuentran compensadas; sin embargo, en la superficie existe una resultante de las fuerzas no nula y dirigida hacia el interior que se denomina fuerza de cohesión superficial. Estas fuerzas de cohesión son la característica más importante de las interfases. Éstas generan un potencial de atracción que es en definitiva el responsable de la fisisorción en los sólidos.

Se han desarrollado numerosos métodos con el objetivo de estimar algunas de las propiedades relacionadas con la porosidad de los sólidos, tales como la superficie específica, el volumen de poros, la distribución de tamaño de poros, etc.

Las isothermas de adsorción-desorción de nitrógeno se han determinado a temperatura constante, 77 K, en un analizador de superficies Micromeritics ASAP 2010.

Para ello, se introduce una cantidad conocida de Ar en un recipiente que contiene el adsorbente. El volumen de gas adsorbido a la presión de equilibrio es la diferencia entre el volumen de gas introducido y el que se requiere para llenar el espacio muerto a la presión de equilibrio. La isoterma de adsorción se construye punto a punto, introduciendo sucesivas cargas de gas y dejando tiempo suficiente para alcanzar el equilibrio en cada punto. Previo al ensayo de adsorción, se debe limpiar la superficie del sólido eliminando los gases que pueda tener adsorbidos. Esto se hace mediante la ayuda de bombas de vacío y un aumento de temperatura (150 °C durante 24 horas). Los pesos de las muestras utilizados han oscilado en torno a 0.15 g.

La superficie específica ha sido obtenida mediante el método BET (Brunauer-Emmett-Teller),⁷² en el intervalo de presiones entre $0 < P/P_0 < 0.3$, y el volumen y distribución de tamaño de poro han sido calculados de acuerdo al método BJH,⁷³ en el intervalo de presiones entre $0.42 < P/P_0 < 0.98$. Los valores han sido obtenidos directamente con el software del instrumento.⁷⁴

3.4 Resonancia Magnética Nuclear de ²⁹Si.

La extensa aplicación de las técnicas de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) para proporcionar detalles de estructuras y dinámicas moleculares se basa sobre todo en la posibilidad de obtener espectros de alta resolución. Este tipo de

72 Brunauer, S.; Emmett, P. H.; Teller, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1938**, *60*, 309.

73 Barrett, E. P.; Joyner, L. J.; Halenda, P. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 373.

74 Lippens, B. C.; Linsen, B. G.; de Boer, J. H. *J. Catalysis* **1964**, *4*, 319-323

espectros se definen como aquéllos en los que se reflejan distintos detalles de la estructura molecular o cristalina para regiones específicas y/o patrones específicos en el espectro, es decir, detalles que son distinguibles con las características disponibles de dispersión y anchuras de bandas espectrales.

Los experimentos de un único pulso en la frecuencia de los núcleos del átomo que se pretende estudiar son los más sencillos. Este tipo de estudios consiste en generar un pulso de magnetización en un ángulo de 90° ($\pi/2$) durante un periodo de tiempo de varios microsegundos para luego registrar la radiación electromagnética emitida por los núcleos al relajarse y recuperar el estado inicial. A partir de la señal registrada (Free Induction Decay, FID) se obtiene el espectro correspondiente mediante el tratamiento matemático adecuado (transformada de Fourier principalmente).

Cuando se estudian sílices y organosílices, los análisis de ^{29}Si MAS RMN proporcionan mucha información sobre el grado de condensación del material, así como la relación entre sílice y organosílice presente en la muestra en el caso de sistemas mixtos. Ésta también puede ser usada para determinar la extensión de las rupturas de los enlaces Si-C durante el ensamblaje. En un gel de sílice o una sílice mesoporosa, cada átomo de silicio da una señal característica que es dependiente de su grado de conexión (*cross-linking*). En la Figura A se representan las señales más frecuentes y la conectividad asociada a cada una de ellas. Dentro de estas señales, las del tipo T dependen de la naturaleza del grupo orgánico al que el silicio va conectado siendo si bien su posición relativa es similar. En un experimento de pulso simple con suficiente tiempo de relajación entre cada pulso, la intensidad de la señal observada será directamente proporcional al número de átomos de silicio con ese entorno.⁷⁵

Los experimentos de resonancia magnética nuclear de ^{29}Si se realizaron en un espectrómetro Bruker AV-400-WB a 79.49 MHz.

75 Kumar, R.; Chen, H.; Escoto, J. L.; Lin, V. S.; Pruski, M. *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 4319.

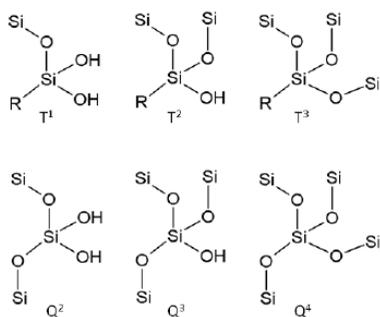
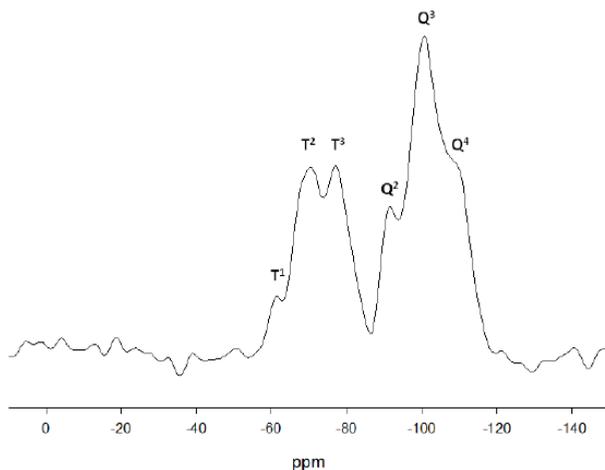


Figura A. Esquema de la naturaleza y posición aproximada de los sitios T y Q para el espectro de organosílices mesoestructuradas en espectro de Si MAS RMN. Las unidades estructurales *Q4* representan tetraedros SiO₄ interconectados que forman parte de las paredes de sílice. Las unidades *Q3* están asociadas con grupos Si-OH aislados tanto libres como unidos por enlace de hidrógeno. Las unidades *Q2* corresponden a grupos silanol geminales.

3.5 Espectroscopia infrarroja (IR).

La espectroscopia infrarroja se basa en la medida de la absorción de radiación infrarroja por la muestra. La radiación absorbida corresponde a la frecuencia de vibración de los grupos funcionales presentes en las moléculas. El uso de la técnica en la caracterización de zeolitas y materiales mesoestructurados está muy extendida ya que proporciona información sobre las características estructurales en función

de la región de frecuencias analizadas. La zona del espectro ($4000\text{-}250\text{ cm}^{-1}$) se divide en tres regiones:

a) región $250\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$.

Las vibraciones de esta zona, denominada generalmente zona de red, proporcionan información sobre las características estructurales de la red como son la cristalinidad y la composición. Vibraciones internas y externas pueden clasificarse según la correlación FKS (Flanigen- Khtami-Szymanski).⁷⁶

-Vibraciones internas debidas a los tetraedros TO_4 y por tanto insensibles a la variación de la estructura pero sensibles a las características del catión T y sus posibles sustituciones.

-Vibraciones externas relacionadas con las uniones entre tetraedros TO_4 y por lo tanto sensibles a la topología de red pero no sensibles a la composición química.

Cuando se sustituye un aparte del silicio de la red por otros elementos, se produce un desplazamiento de las bandas de tensión que puede dar lugar información sobre la composición química del material. Por lo tanto, esta técnica se puede emplear para confirmar que la sustitución del silicio por otros elementos es efectiva.

b) región $1300\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$.

Las vibraciones de esta zona suelen proporcionar información sobre la deformación de las moléculas orgánicas que se absorben en la red, y por lo tanto, la determinación de la naturaleza de los centros ácidos del sólido y su fortaleza a través de muestras que contienen moléculas básicas absorbidas

c) región $4000\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$.

El espectro en esta zona, permite obtener información acerca de los grupos ácidos y la presencia de grupos silanoles asociados a defectos estructurales. Las bandas principales que se pueden distinguir son:

$\text{-}3745\text{-}3700\text{ cm}^{-1}$. Vibraciones de grupos OH asociados a silanoles externos o superficiales o situados en defectos en el interior de cavidades grande, presentando

76 Flanigen, E. M.; Grose, R. W. *Adv. Chem. Series* **1971**, 101, 76.

un carácter ácido muy débil. Se trata de grupos OH no involucrados en puentes de hidrógeno fuertes.

-3670-3660 cm^{-1} . Vibraciones correspondientes a los OH en especies de aluminio extrarreticular o de sílice-alúmina amorfa

-3650-3500 cm^{-1} . Vibraciones asignadas a grupos OH asociados a aluminio en posiciones de red llamados hidroxilos puente. Poseen un carácter ácido fuerte y son los centros ácidos Brönsted de las zeolitas.

-3500 cm^{-1} . Banda ancha asignada a los silanoles internos involucrados en enlaces de hidrógeno con otros silanoles u oxígenos de la red. Son también de carácter ácido muy débil.

La incidencia de un haz de luz infrarroja sobre un material no provoca transiciones electrónicas, al no tener suficiente energía, pero sí puede promover transiciones vibracionales moleculares, siempre y cuando la energía sea la necesaria. Esta energía depende del tipo de átomos y el tipo de enlaces que los mantienen unidos. Los espectros de infrarrojo con transformada de Fourier (IR-TF) se han registrado entre 400 y 1800 cm^{-1} en un espectrómetro Thermo Nicolet Nexus 470 en el modo de transmisión empleando el método de la pastilla de KBr.

3.6 Microscopía electrónica de transmisión (TEM).

El microscopio electrónico de transmisión (TEM) es un instrumento que aprovecha los fenómenos físico-atómicos que se producen cuando un haz de electrones suficientemente acelerado colisiona con una muestra delgada convenientemente preparada. Cuando los electrones colisionan con la muestra, en función de su grosor y del tipo de átomos que la forman, parte de ellos son dispersados selectivamente, es decir, hay una gradación entre los electrones que la atraviesan directamente y los que son totalmente desviados. Todos ellos son conducidos y modulados por unas lentes para formar una imagen final sobre una CCD que puede tener miles de aumentos con una definición inalcanzable para

cualquier otro instrumento. La información que se obtiene es una imagen con distintas intensidades de gris que se corresponden al grado de dispersión de los electrones incidentes.

La imagen del TEM tal como se ha descrito ofrece información sobre la estructura de la muestra, tanto si ésta es amorfa o cristalina.

Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) se han realizado en un microscopio JEOL 3000 FEG con una tensión de aceleración de 300 kV (Cs 0.6 mm, resolución 1.7 Å) el cual está lleva acoplado un analizador de energía dispersiva de rayos X (EDS) Oxford LINK y un portamuestras de doble inclinación hasta un máximo de $\pm 45^\circ$. Las imágenes se han registrado con una cámara CCD (Multiscan 794, Gatan, 1024 x 1024 píxeles, tamaño 24 μm x 24 μm) utilizando condiciones de baja dosis. El análisis y procesado de imágenes se han realizado empleando el programa *Digital Micrograph* (Gatan). Para la preparación de las muestras, se molió una pequeña cantidad en un mortero de ágata y se dispersaron mediante sonicación en etanol durante 5 minutos. Una gota de dicha suspensión se depositó sobre una rendija de cobre de 3mm de diámetro recubierta con una película de polivinil-formal sobre la que se ha depositado una película de carbono como soporte.

3.7 Análisis elemental

El análisis elemental es una técnica que proporciona el contenido total de carbono, hidrógeno, nitrógeno presente en un amplio abanico de muestras de naturaleza orgánica e inorgánica, tanto sólido como líquido.

El análisis elemental se basa en la combustión en ambiente de oxígeno puro de la muestra a analizar, a una temperatura aproximada de 1000°C. Con esta combustión se consigue convertir las moléculas orgánicas de la muestra en gases simples (CO_2 , H_2O , N_2).

Una vez producidos, los gases se presurizan y se separan mediante una columna cromatográfica. Finalmente, se mide la cantidad de cada uno de ellos gracias a sus diferentes conductividades térmicas.

La determinación del contenido de carbono, hidrógeno y nitrógeno de las muestras en estado sólido se ha llevado a cabo en un equipo LECO CHNS-932, utilizando sulfanamida como referencia.

CONCLUSIONES GENERALES

De acuerdo con los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral se pueden extraer las siguientes conclusiones generales:

- De los estudios semisintéticos y biológicos de derivados del alcaloide, 20-(S)-Camptotecina (CPT) podemos concluir que:
 - La reacción de Tscherniac-Einhorn se postula como una nueva metodología semisintética, eficaz y de alto rendimiento, para la obtención de derivados lipofílicos de CPT sustituidos en posición 9 por grupos metilamidas y metilimidias.
 - Los derivados obtenidos son inactivos si el grupo funcional introducido es de pequeño volumen, independientemente de su naturaleza amida o imida. Sin embargo, si la modificación es voluminosa tipo biciclo no aromático, y la posición 10 del alcaloide esta metoxilada, el compuesto obtenido (derivado **3**) es más activo que el Topotecan en un extenso panel celular tumoral multiorgánico. En un estudio de 33 días, con dosis de 3mg/Kg (1/semana), la inhibición del crecimiento tumoral *in vivo* sobre xenoinjerto colorectal (HT29) del compuesto **3** resultó del 60%, mientras el Irinotecan, tomado como fármaco de referencia de uso clínico en este tipo de tumores y su principio activo, SN38, mostraron inhibiciones del 44% y 38% respectivamente.
 - En los ensayos *in vitro* enfocados hacia la biodisponibilidad oral de los análogos, el derivado **3** mostró menor sensibilidad a los transportadores de membrana que la CPT, 10-hidroxiCPT y topotecan. Los valores de fracción oral absorbida en humanos obtenidos mediante los datos de permeabilidad efectiva, mostraron que el derivado **3** se absorbe el doble que el topotecan.
 - Más allá de las modificaciones hidrofóbicas, la reacción de Tscherniac-Einhorn se postula, de igual manera, como una metodología claramente válida, para la incorporación de grupos funcionales de difícil acceso mediante otras metodologías dando lugar a derivados potencialmente susceptibles de aportar, a su vez, nuevos compuestos. Por ejemplo, el derivado hidrosoluble **4** se obtuvo por primera vez con un rendimiento total del 70%, mientras el derivado formulado **5**,

considerado producto de partida para la obtención de 9-imino derivados de CPT, se aisló con un 42% frente a rendimientos publicados anteriormente menores al 25%.

- La obtención de derivados hexacíclicos mediante procesos semisintéticos estudiados durante esta Tesis Doctoral es extremadamente limitada e infructuosa a la hora de incorporar heterociclos de distinta naturaleza. Sin embargo en presencia de formalina y ácido trifluorometansulfónico se obtiene el análogo 9,10-DioxoCPT (CDiox) de forma cuantitativa.

- La incorporación del acetal cíclico sobre el anillo de la quinolina del alcaloide mantiene la actividad antitumoral en comparación con topotecan, CPT y rubitecan en diferentes líneas tumorales.

- Los estudios *in vitro* de permeabilidad mostraron que la velocidad de absorción del derivado sigue una tendencia semejante a la CPT en función de la concentración y es extremadamente más permeable y menos dependiente de membranas que el topotecan. En este sentido, el Cdiox demostró no ser sustrato de la glicoproteína Pgp, implicada en los procesos de resistencia tumoral al fármaco en tratamientos quimioterápicos. Los valores de fracción oral absorbida en humanos obtenidos mediante los datos de permeabilidad efectiva, mostraron que el hexacíclo se absorbe levemente mejor que la CPT y tres veces más que el topotecan. Estos mismos resultados y conclusiones fueron confirmados mediante estudios de permeabilidad *in situ*.

- De los estudios biomiméticos para la obtención de materiales mesoestructurados se pueden extraer las siguientes conclusiones generales:

- Al igual que ciertas moléculas pequeñas con un grupo nucleófilo y otro grupo aceptor de puentes de hidrógeno como cisteamina o etanolamina, son capaces de mimetizar el centro activo catalítico de las silicateinas en procesos de biosilicificación, la trometamina, compuesto ampliamente utilizado en bioquímica y biología molecular por su capacidad tamponadora presentó características semejantes a la hora de movilizar la fuente de silicio.

- La mezcla de trometamina y etanolamina resultó ser la más efectiva en términos de velocidad de hidrólisis y condensación de la fuente de silicio, estableciéndose un comportamiento sinérgico entre la actividad tamponadora y la movilidad de los precursores. Más concretamente se observó que la mezcla catalítica de ambas moléculas, es capaz de incorporar diferentes tipos de agentes directores de estructura (ADS) presentes durante el proceso sintético, dando lugar, tras la calcinación, a materiales mesoestructurados estables y definidos de tamaño de poro controlado tipo ZSM5 y MCM41.

- El procedimiento sol-gel descrito se realiza en condiciones de pH neutro, temperatura ambiente y presión atmosférica en oposición a las condiciones convencionales que requieren condiciones fuertemente ácidas o alcalinas durante la hidrólisis de la fuente de silicio.

- La actividad catalítica de los materiales fue ensayada tras la incorporación de centros metálicos de circonio y titanio en reacciones tipo Meerwein-Ponndorf-Verley y reacciones de epoxidación de ciclohexeno. Los resultados, con ratios de conversión del 60% y 67% respectivamente son semejantes a los obtenidos utilizando materiales sintetizados en condiciones estándar.

RESUMENES

1. Resumen

La presente Tesis Doctoral esta dividida en dos partes que abarcan los campos de la química médica y la ciencia de los materiales respectivamente.

En la primera parte se desarrolla la obtención de nuevos derivados del agente antitumoral 20-(S)-Camptotecina (CPT) y el estudio de sus propiedades biológicas en términos de actividad antitumoral, estabilidad y biodisponibilidad oral.

Más concretamente se ha descrito la aplicación de la reacción de Tscherniac-Einhorn (T-E) como una metodología efectiva y de alto rendimiento para la obtención de una extensa variedad de derivados 9-amidometílicos y 9-imidometílicos de alto carácter lipofílico. Los resultados obtenidos mostraron que la introducción de un grupo alifático voluminoso tipo imida, en posición 9, junto con la metoxilación de la posición 10, proporcionaba elevada actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo* y duplicaba los valores de absorción intestinal dentro de los ensayos de biodisponibilidad oral en comparación con derivados de CPT clínicamente aprobados.

Más allá de la síntesis de nuevos análogos, la reacción de T-E se postula como una metodología eficaz para proporcionar nuevas funcionalizaciones en la posición 9, por ejemplo, se obtienen formilaciones o aminometilaciones con altos rendimientos frente a otras rutas sintéticas menos eficientes o erráticas para este tipo de modificaciones. Dentro de los procesos semisintéticos planteados, el derivado hexacíclico 9,10-[1,3]-DioxoCPT es sintetizado de forma cuantitativa, mostrando que la presencia del acetal cíclico mejora sustancialmente la permeabilidad del agente, tanto *in vitro* como *in situ*, manteniendo los rangos de actividad antitumoral.

En la segunda parte de la presente Tesis Doctoral, dentro del campo interdisciplinar entre la biología y la síntesis de materiales, se ha desarrollado la síntesis de materiales micro- y mesoporosos en condiciones biomiméticas.

El trabajo desarrollado en esta sección demuestra que moléculas pequeñas bifuncionales son capaces de hidrolizar y condensar monómeros de silicio, incorporando al mismo tiempo moléculas orgánicas capaces de actuar como agentes directores de estructura (ADS) dando lugar a materiales mesoestructurados.

Al igual que el proceso biológico desarrolla la formación de estructuras inorgánicas mediante las proteínas conocidas como silicateinas, la mezcla de etanolamina y trometamina, simulan el mecanismo del centro activo de estas mismas proteínas, mediante una combinación sinérgica, donde la actividad tamponadora y catalítica es efectiva a la hora de incorporar y ordenar ADS en condiciones de pH neutro, presión atmosférica y en ausencia de fuente de energía externa.

De esta manera, materiales micro y mesoporosos tipo ZSM5 o MCM41, de alto interés en diferentes aplicaciones industriales, son obtenidos mediante un procedimiento sol-gel a pH neutro en oposición a las metodologías estándar que requieren condiciones fuertemente ácidas o alcalinas para la hidrólisis de los precursores de silicio.

Las posibilidades de dicha metodología para la incorporación de centro activos metálicos fueron ensayadas en términos de actividad catalítica en reacciones tipo Meerwein-Ponndorf-Verley y reacciones de epoxidación de ciclohexeno. Los resultados mostraron porcentajes de conversión similares a los obtenidos con materiales sintetizados en condiciones convencionales.

2. Resum

La present Tesi Doctoral està dividida en dues parts que comprenen els camps de la química mèdica i la ciència dels materials, respectivament.

En la primera part es desenvolupa l'obtenció de nous derivats de l'agent antitumoral 20-(S)-Camptotecina i l'estudi de les seues propietats biològiques en termes d'activitat antitumoral, estabilitat i biodisponibilitat oral.

Més concretament s'ha descrit l'aplicació de la reacció de Tscherniac-Einhorn (T-E) com una metodologia efectiva i d'alt rendiment per a l'obtenció d'una extensa varietat de derivats 9-amidometilats i 9-imidometilats d'alt caràcter lipofílic. Els resultats obtinguts van mostrar que la introducció d'un grup alifàtic voluminos, tipus imida, en posició 9, junt amb la metoxilació de la posició 10, proporcionava elevada activitat antitumoral *in vitro* i *in vivo* i duplicava els valors d'absorció intestinal dins dels assajos de biodisponibilitat oral en comparació amb els derivats de CPT clínicament aprovats.

Més enllà de la síntesi de nous anàlegs, la reacció de T-E es postula com una metodologia eficaç per a proporcionar noves funcionalitzacions en la posició 9, per exemple, s'obtenen formilacions o aminometilacions amb alts rendiments enfront d'altres rutes sintètiques menys efectives o erràtiques. Dins dels processos semisintètics plantejats, el derivat hexacíclic 9,10-[1,3]-DioxoCPT es sintetitzat de forma quantitativa, mostrant que la presència de l'acetal cíclic millora substancialment la permeabilitat del fàrmac, tant *in vitro* com *in situ*, mantenint els rangs de activitat antitumoral de la CPT.

En la segona part de la present Tesi Doctoral, dins del camp interdisciplinari entre la biologia y la ciencia dels materials, s'ha desenvolupat la síntesi de materials micro i mesoporosos en condicions biomimètiques. El treball desenvolupat en aquesta secció demostra que molècules bifuncionals son capaços d'hidrolitzar i condensar monòmers de silici, incorporant al mateix temps molècules orgàniques capaces d'actuar com agents directors d'estructura (ADS)

donant lloc a materials mesoestructurats. De la mateixa forma que el procés biològic desenvolupa la formació d'estructures inorgàniques per mitjà de les proteïnes conegudes com silicateïnes, la mescla d'etanolamine i trometamine, simulen el mecanisme del centre actiu d'aquestes mateixes proteïnes mitjançant una combinació sinèrgica, on l'activitat tamponadora i catalítica és efectiva a l'hora d'incorporar i ordenar ADS en condicions de pH neutre, pressió atmosfèrica i en absència de font d'energia externa.

D'aquesta manera, materials micro- i mesoporosos, tipus ZSM5 o MCM41, d'alt interès en diferents aplicacions industrials, són obtinguts per mitjà d'un procediment sol-gel a pH neutre en oposició a les metodologies estàndard que requereixen condicions fortament àcides o alcalines per a la hidròlisis dels precursors de silici. Les possibilitats d'aquesta metodologia per a la incorporació de centres actius metàl·lics van ser assajades en termes d'activitat catalítica en reaccions tipus Meerwein-Ponndorf-Verley i reaccions d'epoxidació de ciclohexen. Els resultats van mostrar percentatges de conversió semblants als obtinguts amb els materials sintetitzats en condicions convencionals.

3. Summary

This thesis is divided in two parts covering the fields of medicinal chemistry and science materials, respectively.

In the first part, the semisynthesis of new derivatives of the antitumor drug 20-(S)-Camptothecin (CPT) and its biological properties, in terms of antitumor activity, stability and oral bioavailability are developed.

More specifically, the application of the Tscherniac-Einhorn (T-E) reaction is described as an effective and high performance methodology to obtain a wide variety of novel lipophilic 9-amidomethylCPT and 9-imidomethylCPT derivatives. The results showed that the introduction of bulky aliphatic imide moiety in position 9, with the methoxylation of the C-10, provides an improvement of the *in vitro* and *in vivo* antitumor activity and two-times more oral permeability comparing with CPTs analogues clinically approved.

Beyond the synthesis of new analogues, the T-E reaction is postulated as a useful pathway to activate position 9 with novel functionalities such as formylation and aminomethylation which have been previously reported with low or erratic yields. Within the area of semisynthetic procedures, the hexacyclic derivative, 9, 10-[1,3]-DioxoCPT was isolated quantitatively showing that the presence of cyclic acetal moiety improves the *in vitro* and *in situ* oral bioavailability keeping the antitumor activity ratio.

In the second part of this thesis, within the interdisciplinary field of biology and science materials, the development of micro and mesoporous materials under biomimetic conditions is explained.

The work of this section shows that small bifunctional molecules are available for the hydrolysis and condensation of silicon monomers while incorporating defined organic molecules that work as structure directing agents (SDA) leading mesostructured materials.

Similarly to the biological process developed by silicateins, the mixture of ethanolamine and tromethamine simulates the active center of these proteins by a synergic combination of the buffering and the catalytic activity working at neutral pH, atmospheric pressure and in absence of external energy source. Thus, ZSM5 and MCM41 type materials, with high interest in various industrial applications, are obtained by a sol-gel process at neutral pH in opposition to the standar method based on strong acid or alkaline conditions.

The possibilities of this methodology to insert active metal centers were tested in terms of catalytic activity in Meerwein-Ponndorf-Verley reaction and epoxidation reaction of cyclohexene. The results showed similar conversion rates comparing to materials synthesized under standard conditions.

Publicaciones y Patentes

1. A. Corma*, M. J. Cabañas, M. Moliner, G. Rodríguez. “Synthesis of micro- and mesoporous molecular sieves at room temperatura and neutral pH catalyzed by functional analogues of silicatein”. *ChemComm*. 2006, 3137.
2. A. Corma, M. J. Cabañas, G. Rodríguez. “Derivados de Camptotecina como agentes antitumorales”, 2011, WO2011/154574A1.
3. G. Rodríguez-Berna, M. J. Cabañas, A. Corma. “Proceso de obtención de derivados solubles en agua de Camptotecina como agentes antitumorales”, 2012, WO 2012/007619A1.
4. G. Rodríguez-Berna*, M. J. C. Cabañas, V. Mangas-Sanjuán, M. González-Álvarez, I. González-Álvarez, I. Abasolo, S. Schwartz Jr., M. Bermejo, A. Corma. “Semisynthesis, cytotoxic activity, and oral availability of new lipophilic 9-substituted camptothecin derivatives”. *ACS Med. Chem. Lett.* 2013, 4, 651.
5. G. Rodríguez-Berna*, V. Mangas-Sanjuán, M. González-Álvarez, I. González-Álvarez, J. L. García-Giménez, M. J. Cabañas, M. Bermejo, A. Corma. “A promising camptothecin derivative: semisynthesis, antitumor activity and intestinal permeability”. *Eur. J. Med. Chem.* 2014, 83, 366.

