

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



Activación y funcionalización del enlace C(6)-H en
5,6-dihidrobenzo[c]fenantridinas naturales y sintéticas y determinación de sus
propiedades citotóxicas

Por

M. en C. ADRIANA ROMO PÉREZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN FARMACIA

OCTUBRE 2016

Activación y funcionalización del enlace C(6)-H de
5,6-dihidrobenzo[c]fenantridinas naturales y sintéticas y determinación de sus
propiedades citotóxicas

Aprobación de la tesis:

Dr. Edgar Abraham García Zepeda
Presidente

Dra. María del Rayo Camacho Corona
Secretario

Dr. Eugenio Hernández Fernández
Vocal

Dr. Luis D. Miranda Gutiérrez
Vocal

Dra. Marcela González Álvarez
Vocal

Dra. María Araceli Hernández Ramírez
Subdirectora de Estudios de Posgrado

Activación y funcionalización del enlace C(6)-H de
5,6-dihidrobenzo[c]fenantridinas naturales y sintéticas y determinación de sus
propiedades citotóxicas

Aprobación de la tesis

Comité tutorial

Dra. María del Rayo Camacho Corona

Dr. Eugenio Hernández Fernández

Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño

Dra. María Araceli Hernández Ramírez
Subdirectora de Estudios de Posgrado

RESUMEN

M.C. Adriana Romo Pérez
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Químicas

Fecha de Graduación: 24 de Octubre de 2016

Activación y funcionalización del enlace C(6)-H de 5,6-dihidrobenzo[c]fenantridinas naturales y sintéticas y determinación de sus propiedades citotóxicas

Número de páginas: 222

Candidato para el grado de Doctor en
Ciencias con orientación en Farmacia

Área de Estudio: Química y Farmacología de Productos Naturales y Sintéticos

Propósito y Método del Estudio: El cáncer es una enfermedad caracterizada por el crecimiento incontrolado e invasivo de células anormales que han sido dañadas en el ADN por diversos agentes xenobióticos alterando sus procesos de reparación. Actualmente es la segunda causa de muerte a nivel mundial con más de 8.2 millones defunciones y 14 millones de nuevos casos (2013) y se estima que alcance los 20 millones de nuevos casos en las próximas dos décadas. El objetivo de la terapia es curar o prolongar considerablemente la vida del paciente, para lo cual se prescriben una gran variedad de fármacos naturales, semisintéticos y sintéticos. Sin embargo, la quimioterapia actual ha resultado ineficaz para diversos tipos de cáncer debido a la resistencia que han desarrollado las células cancerosas hacia los fármacos anticancerígenos. Por tal motivo, en este proyecto de investigación se propuso la búsqueda de nuevos agentes anticancerígenos a partir de diversas dihidrobenzo[c]fenantridinas sintéticas y semisintéticas preparadas a partir de la plataforma *N*-metil-5,6-dihidrobenzo[c]fenantridina y de los alcaloides naturales dihidrosanguinarina y dihidroqueleritrina. La plataforma sintética se preparó en una secuencia de tres reacciones químicas (aminación reductiva, metilación y ciclación tipo Heck); mientras que, los alcaloides fueron aislados y purificados a partir de las semillas de *Bocconia latisejala*. Posteriormente, la plataforma y los alcaloides fueron funcionalizados mediante reacciones, asistidas por bromuro cuproso, de acoplamiento cruzado deshidrogenativo con diversos nucleófilos. Las dihidrobenzo[c]fenantridinas sintéticas y semisintéticas C(6)-funcionalizadas fueron evaluadas frente a tres líneas celulares de cáncer humano (PC-3, MCF-7 y HCT-15) y una línea celular normal (fibroblastos gingivales humanos). Finalmente, los compuestos más activos fueron seleccionados para determinar sus mecanismos de acción en los ensayos de inhibición de topoisomerasa I e inducción de apoptosis.

Contribuciones y Conclusiones: La plataforma *N*-metil-5,6-dihidrobenzo[c]fenantridina fue sintetizada en únicamente tres etapas de reacción con un rendimiento global de 65% y representa una ruta sintética más corta y eficiente que las rutas reportadas en la literatura. A partir de esta plataforma sintética se obtuvieron 16 dihidrobenzo[c]fenantridinas C(6)-funcionalizadas con diferentes nucleófilos en rendimientos que oscilan entre 18 y 70%. Por otra

parte, dihidrosanguinarina y dihidroqueleritrina se obtuvieron en 0.03% y 0.05% de rendimiento partiendo de 2.9 Kg de semillas de *B. latisejala*. A partir de estos alcaloides naturales se sintetizaron 20 dihidrobenzo[c]fenantridinas C(6)-funcionalizadas con diversos nucleófilos en rendimientos comprendidos entre 30 y 77% . La funcionalización de estas plataformas naturales ofrece la ventaja de que no se requieren condiciones drásticas de reacción como el uso de quinonas o hidroperóxidos, sino de condiciones suaves como la presencia de aire ambiental a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó un cribado de actividad citotóxica de las 36 dihidrobenzo[c]fenantridinas C(6)-funcionalizadas a 50 μM en tres líneas celulares cancerosas (carcinoma prostático, PC-3; carcinoma mamario, MCF-7; adenocarcinoma de colon, HCT-15) y una línea de células normales (fibroblastos gingivales humanos, FGH), encontrándose 13 derivados con 100% de inhibición del crecimiento de las tres líneas celulares cancerosas. Por ello, los 13 derivados fueron evaluados a diferentes concentraciones para determinar sus valores de concentración inhibitoria media (CI_{50}), aunado a otros siete derivados que presentaron 100% de inhibición de una línea cancerosa. Se observó que el derivado malónico **1b** y el nitroderivado **1g**, sintetizados a partir de dihidrosanguinarina, presentaron valores de CI_{50} que oscilan entre 0.62 y 1.59 μM frente a las tres líneas cancerosas. Por otro lado, el derivado malónico de dihidroqueleritrina **2i** presentó valores de CI_{50} menores a 5 μM frente a las tres líneas de células cancerosas; mientras que, los derivados de la plataforma *N*-metil-5,6-dihidro[c]benzofenantridina con mayor actividad citotóxica fueron el derivado malónico **3d** con valores de CI_{50} que oscilan entre 2.73 y 3.76 μM , y el nitroderivado **3k** con valores de CI_{50} comprendidos entre 1.84 y 8.2 μM . Los valores de CI_{50} observados para los derivados de dihidrosanguinarina indican que la citotoxicidad es debida al nucleófilo incorporado y que ésta es exacerbada por las propiedades electrodonadoras del grupo 7,8-dioximetileno. Lo anterior se puede confirmar con los valores de CI_{50} observados para sus análogos obtenidos de *N*-metil-5,6-dihidrobenzo[c]fenantridina, una plataforma carente del grupo 7,8-dioximetileno cuya citotoxicidad fue mejorada con la presencia del nucleófilo incorporado. Posteriormente, se determinó la actividad inhibitoria de topoisomerasa I de 15 dihidrobenzo[c]fenantridinas C(6)-funcionalizadas, encontrándose que sólo los derivados malónicos **1a**, **1b**, **2i**, **3d** y **3e** mostraron débil actividad inhibitoria del complejo Topo I-ADN al observarse bandas tenues para los fragmentos de 70, 92 y 119 pb, también mostrados por el control positivo camptotecina. Finalmente, se determinó la actividad apoptótica y/o necrótica de los derivados **1a**, **1b**, **3e** y **3k** mediante el método de Anexina V y los resultados mostraron que los derivados **1a**, **3e** y **3k** causan preferentemente la muerte celular programada, mientras que el derivado **1b** ocasiona de manera equitativa una muerte necrótica y apoptótica. En resumen, la metodología de funcionalización del enlace C(6)-H permitió explorar el espacio químico con la síntesis de nuevas moléculas y mejoró significativamente las propiedades citotóxicas de las tres plataformas heterocíclicas (dihidrosanguinarina, dihidroqueleritrina y *N*-metil-5,6-dihidrobenzo[c]fenantridina). El estudio de relación estructura-actividad permitió descubrir nuevas dihidrobenzofenantridinas C(6)-funcionalizadas con actividad citotóxica relevante, siendo el derivado **1b** el más promisorio con valores de CI_{50} similares a los del control positivo doxorubicina.

Dr. Edgar Abraham García Zepeda
DIRECTOR DE TESIS

Dr. Luis Demetrio Miranda Gutiérrez
CO-DIRECTOR DE TESIS

PUBLICACIONES RESULTANTES DE ESTA TESIS

➤ **Publicación de artículo en revista indizada:**

Romo-Pérez, A.; Miranda, L. D.; García, A. Synthesis of *N*-methyl-5,6-dihydrobenzo[*c*]phenanthridine and its sp^3 C(6)-H bond functionalization via oxidative cross-dehydrogenative coupling reactions. *Tetrahedron Letters* 2015. 56, 6669-6673.

A. Romo-Pérez, A. Blanco, A. Dueñas, L. D. Miranda, M.R. Camacho-Corona, A. Acosta-Huerta, Y. Pommier, K. Agama, A. García. Dihydrosanguinarine and dihydrochelerythrine as natural scaffolds for mild C(sp^3)-H functionalization towards highly cytotoxic analogues. 2016. *En proceso*.

➤ **Participación en simposios y congresos:**

- *I Simposio Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina*. 21-22 de Agosto de 2014. Monterrey, Nuevo León, México. Póster: Síntesis de *N*-metil-5,6-dihidrofenantridina y *N*-metil-5,6-dihidrobzofenantridina como posibles farmacóforos anticancerígenos. Romo-Pérez, A.; Miranda-Gutiérrez, L. D.; García, A.
- *Simposio Interno del Instituto de Química*. 8-10 de Junio de 2015. Ciudad de México, México. Póster: Síntesis de *N*-metil-5,6-dihidrobzocfenantridina y su funcionalización del enlace C(6)-H vía acoplamiento cruzado deshidrogenativo asistido por DDQ. Adriana Romo-Pérez, Luis Demetrio Miranda Gutiérrez, Abraham García. **Mención Honorífica** por el trabajo presentado.
- *II Simposio Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina*. 20-21 de Agosto de 2015. Monterrey, Nuevo León, México. Presentación Oral: Síntesis de *N*-metil-5,6-dihidrobzocfenantridina y su funcionalización mediante acoplamiento cruzado deshidrogenativo con diversos nucleófilos. Romo-Pérez, A.; Miranda-Gutiérrez, L. D.; García, A.
- Participación como co-autor del trabajo: Nuevos alcaloides benzo[*c*]fenantridínicos de *Bocconia latisejala* con potencial actividad

antituberculosa en el congreso de la Sociedad Química de México realizado del 7-10 de Octubre de 2015 en la Cd. de Querétaro.

- *9th Asian-European Symposium on Metal-Mediated Efficient Organic Synthesis.* 4-7 de Septiembre de 2016. Estocolmo, Suecia. Póster: Mild C–H functionalization of dihydrochelerythrine. Adriana Romo-Pérez, Luis Demetrio Miranda Gutiérrez, Abraham García.
- 51° Congreso Mexicano de Química y el 35° Congreso Nacional de Educación Química. 28 de Septiembre al 1 de Octubre de 2016. Pachuca, Hgo. México. Presentación Oral: Síntesis y actividad citotóxica de los derivados de dihidrosanguinarina obtenidos mediante reacciones de acoplamiento cruzado deshidrogenativo catalizadas con CuBr. Adriana Romo-Pérez, María del Rayo Camacho Corona, Luis Demetrio Miranda Gutiérrez, Abraham García.

AGRADECIMIENTOS



**División de Estudios de Posgrado en Ciencias
Facultad de Ciencias Químicas (UANL)**

Por las facilidades otorgadas durante el presente proyecto de investigación.



CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Por la beca económica (362316) provista durante este proyecto de investigación



Dr. Edgar Abraham García Zepeda

Por la dirección, asesoramiento y el apoyo en la realización del presente proyecto de investigación.



Dr. Luis D. Miranda Gutiérrez

Por la co-dirección y el apoyo en la síntesis de DHB y sus derivados en el Laboratorio de Síntesis Orgánica 2-3 del Instituto de Química-UNAM.



Dra. Ma. Del Rayo Camacho Corona

Por su apoyo durante mis estudios de posgrado.

AGRADECIMIENTOS



Dr. Alfonso Dueñas

Por las facilidades otorgadas para la determinación del mecanismo de acción de los compuestos promisorios durante mi estancia en el INCan.



Dra. Alma Delia Chávez Blanco

Por el asesoramiento para trabajar con líneas celulares utilizadas para la determinación del mecanismo de acción de los compuestos promisorios.



Dr. Yves Pommier

Dr. Keli Agama

Por su apoyo para la determinación del mecanismo de acción de los compuestos promisorios.



Comité tutorial

Dra. María del Rayo Camacho Corona

Dr. Eugenio Hernández Fernández

Dr. Alberto Gómez Treviño

Por sus observaciones y sugerencias realizadas durante el desarrollo del presente proyecto de investigación.



Dra. Lucía Gpe. Cantú Cárdenas

Por el apoyo recibido durante mi estancia en el Posgrado en Ciencias con Orientación en Farmacia.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCION	1
1.1 Activación y funcionalización de enlaces C-H	1
1.2 Alcaloides benzo[c]fenantridínicos	2
1.2.1 Género <i>Bocconia</i>	3
1.2.2 <i>Bocconia latisejala</i>	4
1.3 Compuestos semisintéticos con actividad farmacológica	5
1.4 Cáncer	6
1.4.1 Epidemiología	7
1.4.2 Sintomatología	7
1.4.3 Tratamiento	8
1.4.4 Mecanismos de acción de los fármacos anticancerígenos	9
1.4.4.1 Fármacos que atacan directamente el ADN de células tumorales	10
1.4.4.1.1 <i>Fármacos que afectan las hélices del ADN: agentes alquilantes</i>	10
1.4.4.2 Inhibidores de proteínas relacionadas con el ADN	11
1.4.4.2.1 <i>Inhibidores de topoisomerasa</i>	11
1.4.4.2.2 <i>Antimetabolitos</i>	12
1.4.4.2.3 <i>Enzimas relacionadas con las histonas</i>	13
1.4.4.2.4 <i>Inhibidores de factores de transcripción</i>	14
1.4.4.2.5 <i>Genes específicos</i>	15
1.4.4.3 Fármacos dirigidos a los receptores de membrana	16
1.4.4.4 Fármacos dirigidos a las vías de señalización intracelular	17
1.4.4.5 Fármacos que se unen a la tubulina	18
1.4.4.6 Fármacos que actúan sobre el endotelio	19
2. ANTECEDENTES	21
2.1 Funcionalización de enlaces C(sp ³)-H contiguos a nitrógeno	21
2.1.1 Generalidades	21
2.1.2 Funcionalización de enlaces C(sp ³)-H en isoquinolinas	22
2.2 Síntesis de análogos de alcaloides benzo[c]fenantridínicos	23

2.3 Actividad anticancerígena de alcaloides benzo[c]fenantridínicos	25
2.4 Apoptosis	29
2.4.1 Mecanismos de apoptosis	30
2.5 Topoisomerasas	31
2.5.1 Topoisomerasa tipo I (Topo I)	32
2.5.2 Inhibición de la Topo I	33
2.6 Mecanismo de resistencia de las células cancerosas hacia los fármacos	30
2.6.1 Factores que involucran al huésped	35
2.6.2 Factores relacionados con las células cancerosas	36
2.6.2.1 Factores tumor-huésped	36
2.6.2.2 Mecanismos de resistencia a fármacos	36
2.6.2.2.1 Glicoproteína-P (gp-P)	37
2.6.2.2.2 Proteína 1 asociada a la resistencia a múltiples fármacos (MRP-1)	38
2.6.2.2.3 Proteína de resistencia al carcinoma mamario (BCRP)	38
3. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS y OBJETIVOS	41
3.1 Justificación del proyecto	41
3.2 Hipótesis	42
3.3 Objetivo General	42
3.4 Objetivos Específicos	42
4. PARTE EXPERIMENTAL	44
4.1 Ubicación de los departamentos involucrados en este proyecto.	44
4.2 Materiales y Métodos	45
4.2.1 Aislamiento y purificación de compuestos por cromatografía	45
4.2.2 Síntesis de N-metil-5,6-dihidrobenzo[c]fenantridinas C(6) funcionalizadas	46
4.2.3. Síntesis de N-metil-5,6-dihidrobenzo[c]fenantridina.	47
4.2.4 Elucidación estructural de los compuestos obtenidos	47
4.2.5 Determinación de la actividad citotóxica	48
4.2.5.1 Rastreo de actividad citotóxica de los compuestos	48
4.2.5.1.1 Preparación de la línea celular	48
4.2.5.1.2. Rastreo de actividad citotóxica a 50 µM	49
4.3 Determinación del mecanismo de acción	50
4.3.1 Apoptosis	50
4.3.2 Inhibición de la Topoisomerasa I	52
4.4 Disposición de residuos	52
4.5 Obtención de los alcaloides dihidrobenzo[c]fenantridínicos	53

4.5.1 Material vegetal	53
4.5.2 Colecta de semillas de <i>B. latisejala</i>	53
4.5.3 Preparación del extracto metanólico a partir de las semillas de <i>B. latisejala</i>	54
4.5.4 Aislamiento y purificación de los alcaloides naturales a partir de <i>Bocconia latisejala</i>	55
4.5.4.1 Datos espectroscópicos de los alcaloides naturales	56
4.6 Procedimiento para la obtención de los derivados de dihidrosanguinarina (DHS)	58
4.6.1 Datos espectroscópicos de los derivados de DHS	59
4.7 Procedimiento para la obtención de los derivados de dihidroqueleritrina (DHQ)	65
4.7.1 Datos espectroscópicos de los derivados de DHQ	66
4.8 Síntesis de la plataforma <i>N</i> -metil-5,6-dihidrobenzo[<i>c</i>]fenantridina	74
4.8.1 Procedimiento para la síntesis de 2-bromo- <i>N</i> -(α -naftil)encilamina	74
4.8.2 Procedimiento para la preparación de <i>N</i> -metil-(2-bromobencil)naftilamina	75
4.8.3 Procedimiento para la síntesis de <i>N</i> -metil-5,6-dihidrobenzo[<i>c</i>]fenantridina (DHB)	77
4.8.4 Procedimiento general para la síntesis de los derivados de <i>N</i> -metil-5,6-dihidrobenzo[<i>c</i>]fenantridina	78
4.8.5 Datos espectroscópicos de las <i>N</i> -metil-5,6-dihidrobencofenantridinas C(6)-funcionalizadas	80
5. RESULTADOS y DISCUSIONES	93
5.1 Obtención de los alcaloides naturales	93
5.1.1 Elucidación estructural del alcaloide dihidrosanguinarina (DHS)	93
5.1.2 Elucidación estructural del alcaloide dihidroqueleritrina (DHQ)	95
5.2 Síntesis de los derivados de DHS	94
5.2.1 Elucidación estructural de los derivados de DHS	98
5.2.1.1 Elucidación estructural de 1a	98
5.2.1.2 Elucidación estructural de 1c	100
5.2.1.3 Elucidación estructural de 1d	101
5.2.1.4 Elucidación estructural de 1f	103
5.3 Síntesis de los derivados de DHQ	104
5.3.1 Elucidación estructural de los derivados de DHQ	108
5.3.1.1 Elucidación estructural de 2a	108
5.3.1.2 Elucidación estructural de 2e	110
5.3.1.3 Elucidación estructural de 2f	111
5.3.1.4 Elucidación estructural de 2i	113

5.3.1.5 Elucidación estructural de 2j	114
5.4 Síntesis de la plataforma <i>N</i> -metil-5,6-dihidrobenzofenantridina (DHB)	116
5.5 Síntesis de los derivados de DHB	119
5.5.1 Elucidación estructural de los derivados de DHB	123
5.5.1.1 Elucidación estructural de 3a	123
5.5.1.2 Elucidación estructural de 3c	124
5.5.1.3 Elucidación estructural de 3d	126
5.5.1.4 Elucidación estructural de 3i	127
5.5.1.5 Elucidación estructural de 3k	128
5.5.1.6 Elucidación estructural de 3p	130
5.6 Determinación de la actividad biológica de las dihidrobenzo[<i>c</i>]fenantridinas sintéticas y semisintéticas.	131
5.6.1 Rastreo de la actividad citotóxica de los derivados de DHB	131
5.6.2 Determinación de la concentración inhibitoria media (CI ₅₀) de los derivados de DHB	134
5.6.3 Rastreo de la actividad citotóxica de los derivados de DHS	136
5.6.4 Determinación de la concentración inhibitoria media (CI ₅₀) de los derivados de DHS	137
5.6.5 Rastreo de la actividad citotóxica de los derivados de DHQ	139
5.6.6 Determinación de la concentración inhibitoria media (CI ₅₀) de los derivados de DHQ	142
5.7 Actividad inhibitoria de la Topoisomerasas I de las dihidrobenzo[<i>c</i>]fenantridinas funcionalizadas	146
5.8 Determinación de apoptosis	150
6. Conclusiones	153
7. Referencias	156
8. Anexo	165

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Funcionalización de enlaces C-H en diversos sustratos	2
2.	Alcaloides benzofenantridínicos y dihidrobenzofenantridínicos del género <i>Bocconia</i>	4
3.	<i>B. latisepala</i> : a) Distribución geográfica. b) Hojas de <i>B. latisepala</i> ; c) semillas de <i>B. latisepala</i> .	5
4.	Agentes anticancerígenos de origen vegetal	9
5.	Agentes alquilantes	11
6.	Inhibidores de Topoisomerasas	12
7.	Algunos antimetabolitos usados en la quimioterapia	13
8.	Inhibidores de las histonas desacetilasas	14
9.	Fármacos que modifican la expresión génica	15
10.	Fármacos inhibidores de receptores de membrana	16
11.	Proceso de apoptosis	30
12.	Mecanismo catalítico de la topoisomerasa I	33
13.	Mecanismo de acción de inhibidores de Topo-I	34
14.	Alcaloides dihidrobenzo[<i>c</i>]fenantridínicos obtenidos a partir de <i>B. latisepala</i>	56
15.	Esquema de reacción de ACD entre DHS y diversos nucleófilos	58
16.	Esquema de reacción de ACD entre DHQ y diversos nucleófilos	65
17.	Esquema de síntesis de <i>N</i> -(2-bromobencil)naftilamina	74
18.	Esquema de síntesis de <i>N</i> -metil-(2-bromobencil)naftilamina.	75
19.	Esquema de síntesis para la obtención de <i>N</i> -metil-5,6-dihidrobenzo[<i>c</i>]fenantridina	77
20.	Esquema de ACD entre DHB y diversos nucleófilos	79
21.	Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de dihidrosanguinarina	

(DHS, 1)	92
22. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de dihidroqueleritrina (DHQ, 2)	94
23. Esquema de optimización de la reacción de ACD entre DHS y el malonato de dimetilo	94
24. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del compuesto 1a	101
25. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del compuesto 1c	103
26. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del compuesto 1d	104
27. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del compuesto 1f	106
28. Esquema de reacción de ACD entre DHQ y nitrometano	106
29. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del compuesto 2a	111
30. Ampliación del espectro de RMN ¹ H del compuesto 2a	111
31. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del compuesto 2e	113
32. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del compuesto 2f	114
33. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del compuesto 2i	116
34. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del compuesto 2k	117
35. Ruta sintética para la obtención de <i>N</i> -metil-5,6-dihidrobenzo[<i>c</i>]fenantridina	118
36. Esquema de reacción de ACD entre DHB e indol	122
37. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del compuesto 3a	126
38. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del compuesto 3c	127
39. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del compuesto 3d	129
40. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del compuesto 3i	130
41. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del compuesto 3k	121
42. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del compuesto 3o	132
43. Determinación anti-Topo I de dihidrobenzo[<i>c</i>]fenantridinas	149
44. Alcaloides benzofenantridínicos con actividad inhibitoria de topoisomerasas	151
45. Inducción de apoptosis en células de cáncer prostático (PC-3) por los compuestos 1a , 3k , 1b y 3e	153

LISTA DE TABLAS

Tabla		Pág.
1.	Optimización de la reacción de ACD entre DHS y malonato de dimetilo...	98
2.	Derivados de DHS obtenidos mediante reacciones de ACD.....	99
3.	Optimización de la reacción de ACD entre DHQ y nitrometano.....	107
4.	Derivados de dihidroqueleritrina obtenidos por reacción de ACD.....	109
5.	Optimización de la reacción de Heck para la preparación de DHB.....	120
6.	Optimización de condiciones de reacción para la síntesis de 3a	122
7.	Reacción de ACD entre la DHB y diversos nucleófilos.....	124
8.	Rastreo primario de actividad citotóxica y anticancerígena de los derivados de DHB.....	134
9.	Determinación de la CI_{50} (μM) de los derivados de DHB	137
10.	Rastreo primario de actividad anticancerígena de los derivados de DHS..	138
11.	Determinación de las CI_{50} (μM) de los derivados de DHS.....	141
12.	Porcentaje de inhibición de crecimiento de los derivados de DHQ a 50 μM .	142
13.	Determinación de la CI_{50} (μM) de los derivados de DHQ.....	143

NOMENCLATURA

ATP	Trifosfato de Adenosina
CCD	Cromatografía de Capa Delgada
CI ₅₀	Concentración Inhibitoria media
Cm	Centímetro
Cols.	Colaboradores
CTGF	Factor de crecimiento de tejido conectivo
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMT1	Diabetes Mellitus Tipo 1
DMT2	Diabetes Mellitus Tipo 2
DL ₅₀ :	Dosis letal 50
DMSO	Dimetilsulfóxido
EMAR	Espectrometría de Masas de Alta Resolución
FGH	Fibroblastos gingivales humanos
G	Gramos
°C	Grados Celsius
HCT-15	Adenocarcinoma de colon humano
Hrs	Horas
Hz	Hertz
IL-1	Interleucina-1

IL-6	Interleucina-6
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
ISSSTE	Instituto de Seguridad y Servicios Sociales para los Trabajadores del Estado
IR	Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
Kg	Kilogramo
L	Litro
M	Metro
MHz	Megahertz
Min	Minutos
mL	Mililitro
μ L	Microlitro
Mm	Milímetro
mM	Milimolar
Msnm	Metro sobre el nivel del mar
NF	Factor nuclear
Nm	Nanómetros
MCF-7	denocarcinoma mamario humano
%	Porcentaje
PC-3	Adenocarcinoma prostático humano
P.f.	Punto de fusión

pH	Potencial de Hidrógeno
PM	Peso Molecular
Ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
TGF- β 1	Factor de crecimiento transformante beta
UV	Ultravioleta
λ	Longitud de onda

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Activación y funcionalización de enlaces C-H

El término funcionalización C-H (también incluye activación del enlace C-H) puede ser definida como la conversión del enlace carbono-hidrógeno en enlace carbono-carbono (C-C) o carbono-heteroátomo (C-X) (Figura 1). Un gran repertorio de reacciones de funcionalización de enlaces C-H han sido reportadas en años recientes, las cuales incluyen reacciones de arilación, alquilación, inserción, aminación, oxidación, borilación y halogenación [1-2]. Sin embargo, la funcionalización directa de plataformas vía activación de enlaces C-H inactivos constituye una oportunidad mucho más atractiva que las metodologías tradicionales debido a que se requiere menos energía (calentamiento de la reacción), lo que conlleva a que los grupos funcionales presentes en las plataformas químicas sean más tolerantes y no requieran reacciones de protección/desprotección conduciendo a una economía de paso y de proceso total [3].

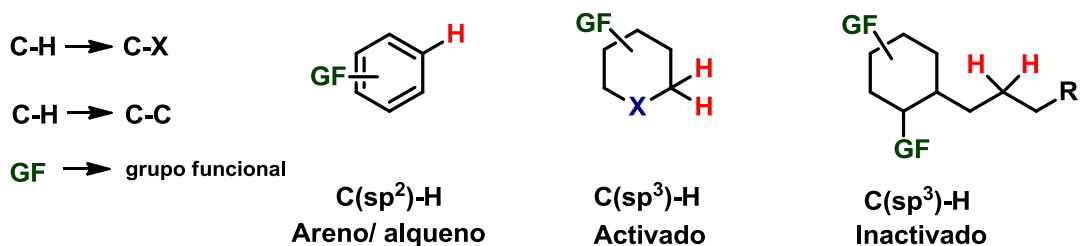


Figura 1. Funcionalización de enlaces C-H en diversos sustratos [2].

Por lo anterior, el desarrollo y la aplicación de una metodología sintética eficiente, selectiva y amigable con el medio ambiente es deseable para la obtención y diseño de nuevas y mejoradas plataformas químicas. Este objetivo se puede lograr por medio de numerosos procesos catalíticos, en especial los procesos catalizados por metales [4]. Diferentes catalizadores de Pd, Rh, Ru, Ag, Au, Pt, Fe y Cu han sido utilizados para diversificar las estructuras de plataformas sintéticas y naturales mediante reacciones de acoplamiento cruzado deshidrogenativo formando nuevos enlaces C-C o C-X, lo que por métodos tradicionales se lograría en mayor número de pasos y en rendimientos menores [5].

1.2 Alcaloides benzo[c]fenantridínicos

Los alcaloides benzo[c]fenantridínicos son un grupo específico de alcaloides isoquinolínicos que se producen solo en las plantas superiores y son constituyentes principalmente de las familias Fumariaceae, Meliaceae, Papaveraceae y Rutaceae [6–8]. Los compuestos benzo[c]fenantridínicos

poseen un amplio espectro de actividades farmacológicas entre las que se destacan la actividad antiparasitaria, antimicrobiana, antifúngica, citotóxica, antitumoral y antileucémica [9], razón por la cual se han realizado diversos estudios dirigidos a la preparación y evaluación biológica de análogos estructurales [7].

1.2.1 Género *Bocconia*

Bocconia es un género de plantas herbáceas que pertenece a la familia Papaveraceae y se caracteriza por la presencia de alcaloides. Este género comprende 10 especies nativas de Centro y Sudamérica y juegan un papel importante en la medicina tradicional mexicana. Por ejemplo, *B. frutescens* es usada para el tratamiento de úlceras en la piel, dermatitis y algunas infecciones del tracto respiratorio, mientras que *B. arborea* es usada por los nativos como un agente purgativo, vermífugo, carminativo, antiinflamatorio, queratolítico y antitumoral [10]. Dentro de este género se reportan la presencia de diversas benzo[c]fenantridinas como: sanguinarina, quelirubina, queleritrina, dihidrosanguinarina, 9,10-desmetilen-7,8-dihidrosanguinarina, oxisanguinarina, 9,10-desmetilensanguinarina, dihidroqueleritrina y 6-O-metildihidroqueleritrina (Figura 2) [11]. Una de las especies nativas de México es *B. latisejala*.

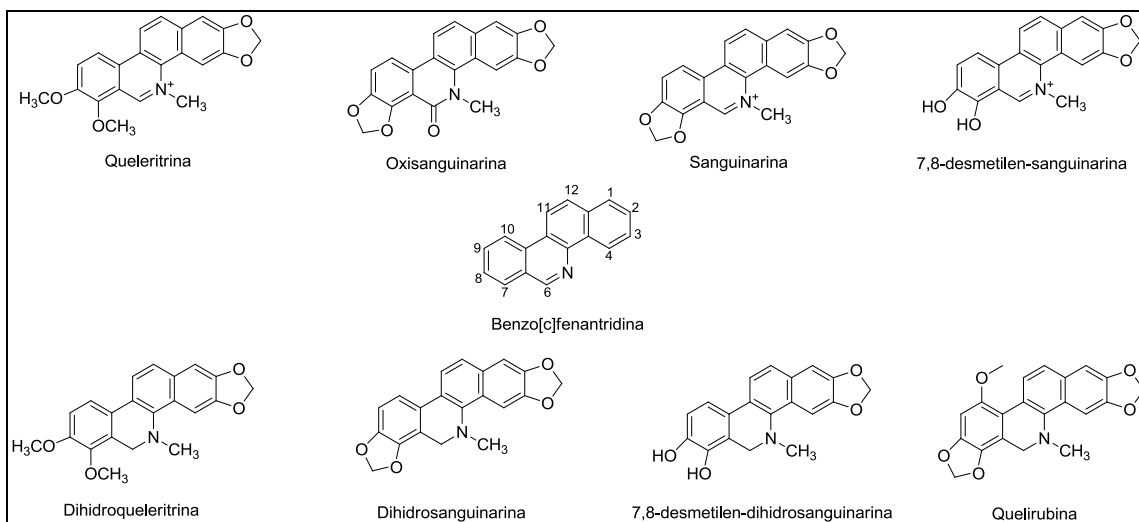


Figura 2. Alcaloides benzo[c]fenantridínicos del género *Bocconia*.

1.2.2 *Bocconia latisepala*

B. latisepala, comúnmente conocida como “llora sangre” es un arbusto que puede medir de 2 a 3 metros de altura. Esta es una especie nativa del estado de Nuevo León, México y normalmente se encuentra sobre las faldas de la Sierra Madre Oriental entre 400 y 800 msnm (Figura **3a**). Watson la describió como una hierba anual que posee tallos quebradizos que alcanzan los 2 metros de altura. Esta planta tiene las hojas grandes lobuladas de 15 a 35 cm de largo y de 10 a 30 cm de ancho (Figura **3b**). El fruto es una cápsula de forma elipsoidal lisa color roja y que mide 11-13 x 5-6 x 3-5 mm y contiene una semilla elipsoidal de color negra con un extremo de color rojo, la cual presenta un endospermo carnoso amarillento y mide 5.8-6.3 x 3-3.5 x 3.3-3.5 mm (Figura **3c**) [12,13].

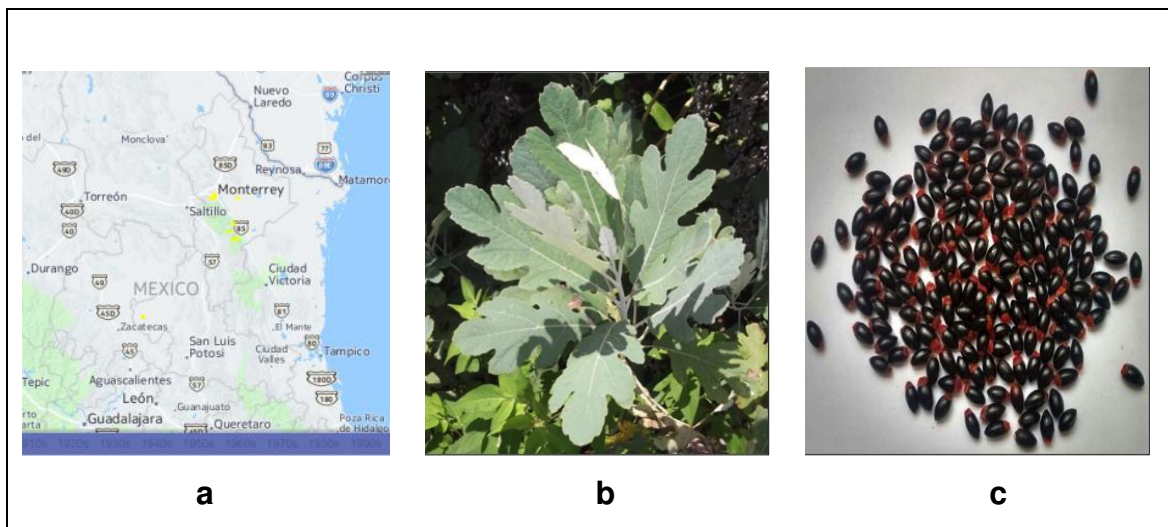


Figura 3. *B. latisejala*: a) Distribución geográfica [14]. b) Hojas de *B. latisejala*; c) semillas de *B. latisejala*.

1.3 Compuestos semisintéticos con actividad farmacológica.

Por aproximadamente 3.8 billones de años, la madre naturaleza ha sido el laboratorio productor de una inmensa biblioteca de agentes quimioterapéuticos que han servido al ser humano para el tratamiento de diversas enfermedades. Alrededor del 70% de las nuevas entidades químicas han sido obtenidas a partir de plantas, animales, derivados de productos naturales o miméticos de productos naturales [15,16]. Por tanto, los productos naturales han servido de inspiración para la semisíntesis o síntesis total de nuevos y mejores fármacos.

Distintas áreas terapéuticas han sido beneficiadas con estos descubrimientos, en especial las áreas de Oncología, Infectología y Neurología [17]. Sólo por mencionar algunos ejemplos, en 2005 se lanzaron al mercado los antibióticos

semisintéticos de amplio espectro tigeciclina (derivado de tetraciclina) y doripenem (derivado de tienamicina). La metilnaltrexona, un derivado semisintético de la naltrexona, salió al mercado en 2008 para el tratamiento de estreñimiento causado por el uso de opioides analgésicos sin reducir sus efectos. Los fármacos semisintéticos oncológicos temsirolimus y everolimus, los cuales son derivados del sirolimus, salieron al mercado en 2007 y 2009, respectivamente [18]. Por lo anterior, la búsqueda de nuevas entidades químicas sigue siendo una gran área de oportunidad para lograr la obtención de nuevos fármacos que puedan ayudar a erradicar o controlar enfermedades infecciosas, metabólicas, neurológicas, inmunológicas, cardiacas y/u oncológicas.

1.4 Cáncer

El cáncer es un término que se usa para enfermedades en las que células anormales se dividen sin control y pueden invadir otros tejidos. Las células cancerosas pueden diseminarse a otras partes del cuerpo por el sistema sanguíneo y por el sistema linfático, proceso conocido como metástasis. La metástasis es la primera causa de muerte por cáncer [19-20]. Los tumores se dividen en dos clases: benignos y malignos. La diferencia crítica es su modo de crecimiento. Los tumores benignos crecen por expansión, comprimen o desplazan el tejido normal circundante, en tanto que los tumores malignos crecen por infiltración local y destruyen el tejido que invaden [21].

El cáncer se origina debido a alteraciones moleculares en el ácido desoxirribonucleico (ADN), lo que provoca una proliferación celular desenfrenada. La mayoría de estas alteraciones implican cambios en la secuencia normal del ADN. Estos pueden originarse como consecuencia de errores aleatorios de repetición, exposición a carcinógenos o defectos en los procesos de reparación de ADN [22].

1.4.1 Epidemiología

De acuerdo con el proyecto GLOBOCAN 2012, la incidencia y la mortalidad del cáncer en 184 países, incluido México, comprendió 14.1 millones de nuevos casos y 8.2 millones de muertes [23]. Los datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) y de la Organización Mundial de la Salud (OMS) denotan una tendencia del cáncer al alza, no sólo en la tasa de incidencia nacional y mundial de nuevos casos sino también en la de mortalidad, por lo que se proyecta que para 2025 habrá más de 20 millones de casos de cáncer [19, 24]. En México el cáncer ocupó la tercera posición como principal causa de muerte en 2012 y 2013, con 73,240 y 75,229 defunciones, respectivamente [24].

1.4.2 Sintomatología

Los signos y síntomas dependerán del tamaño y la localización del cáncer. Si un cáncer se propaga, los signos o síntomas pudieran aparecer en diferentes partes del cuerpo. Entre los síntomas que se presentan podemos mencionar la pérdida de peso, cansancio extremo, dolor, sangrado o secreciones inusuales, cambios en la piel, endurecimiento o la presencia de una masa en alguna parte del cuerpo [25].

1.4.3 Tratamiento

Los objetivos del tratamiento del cáncer son curar o prolongar considerablemente la vida de los pacientes, y garantizar la mejor calidad de vida posible a quienes sobreviven a la enfermedad.

Existen varios tipos de tratamiento para el cáncer. Esto depende del tipo de cáncer y del grado de diseminación. Los tratamientos incluyen cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, terapia biológica, trasplante, terapia fotodinámica, entre otros [20,26].

La quimioterapia es el tratamiento de primera opción para muchos tipos de cáncer y casi siempre se usa como tratamiento sistémico. Diversos fármacos anticancerígenos como paclitaxel, doxorubicina y vinblastina han sido usados

clínicamente para tratar tumor de mama, pulmón, estómago, próstata, colon, páncreas y otros tumores sólidos [27]. En la actualidad se usan más de 100 medicamentos de quimioterapia, ya sea solos o en combinación con otros medicamentos o tratamientos [25].

Los agentes quimioterapéuticos de origen vegetal usados clínicamente para el tratamiento de cáncer pueden clasificarse estructuralmente en cuatro principales grupos: los alcaloides de la vinca [vincristina (**1**), vinblastina (**2**)], los lignanos derivados de la podofilotoxina (**3**), los diterpenoides de tipo taxano [paclitaxel (**4**)] y los alcaloides quinolínicos derivados de la camptotecina (**5**) (Figura 4) [28].

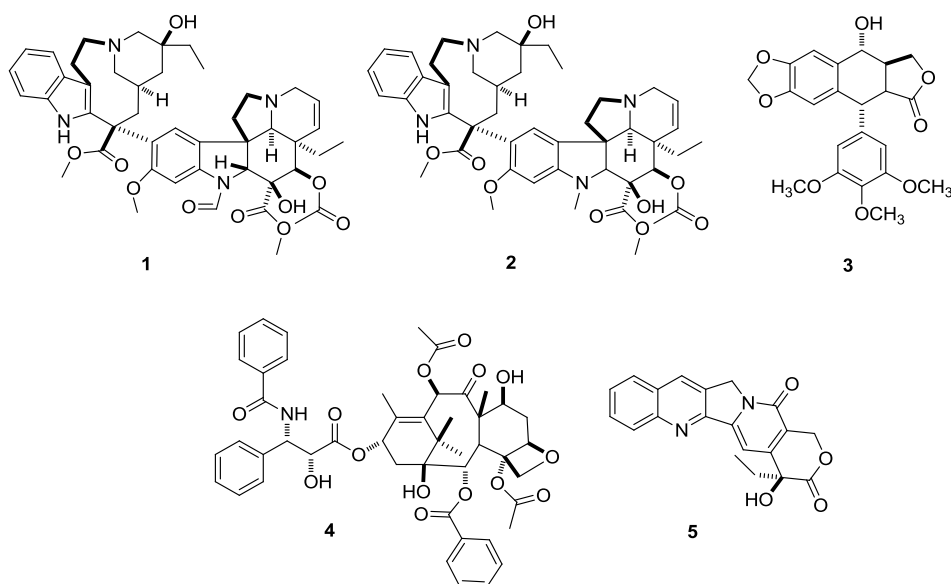


Figura 4. Agentes anticancerígenos de origen vegetal.

1.4.4 Mecanismo de acción de los fármacos anticancerígenos

Tradicionalmente, los fármacos anticancerígenos estaban agrupados sólo en tres grupos: quimioterapia, terapia hormonal e inmunoterapia. Sin embargo, esta clasificación no incluye a los nuevos fármacos que inhiben vías de señalización u otros mecanismos de acción. El mecanismo de acción de los fármacos anticancerígenos incluye atacar a la célula tumoral u otros elementos involucrados en la carcinogénesis (endotelio, matriz extracelular, sistema inmune, células del huésped) [29-30]. La diana puede ser localizada a nivel del ADN, ácido ribonucleico (ARN) o proteína, por lo que en este documento los fármacos serán clasificados de acuerdo con el blanco terapéutico.

1.4.4.1 Fármacos que atacan directamente el ADN de células tumorales

Los fármacos que se encuentran en esta categoría actúan sobre el ADN ya sea rompiendo las hélices, interfiriendo con las proteínas relacionadas con el ADN o modificando la expresión de genes específicos.

1.4.4.1.1 Fármacos que afectan las hélices del ADN: agentes alquilantes

Los agentes alquilantes fueron los primeros compuestos que se usaron para el tratamiento de cáncer. Estos fármacos forman aductos entre las hebras del ADN lo que ocasiona una alteración en la estructura o función del mismo. Las

familias que corresponden a este tipo de fármacos incluyen las mostazas nitrogenadas (mecloretamina, ciclofosfamida (**1**), clorambucil), etileniminas y metilmelaminas (hexametilmelamina, tiotepa), alquilsulfonatos (busulfán (**2**)), nitrosoureas (carmustina, lomustina, semustina, estreptozotocina), triazenos (dacarbazina (**3**)), antibióticos (bleomicina, mitomicina (**4**)) y compuestos de platino (cisplatino, carboplatino (**5**), oxaliplatino). Figura 5 [29, 31].

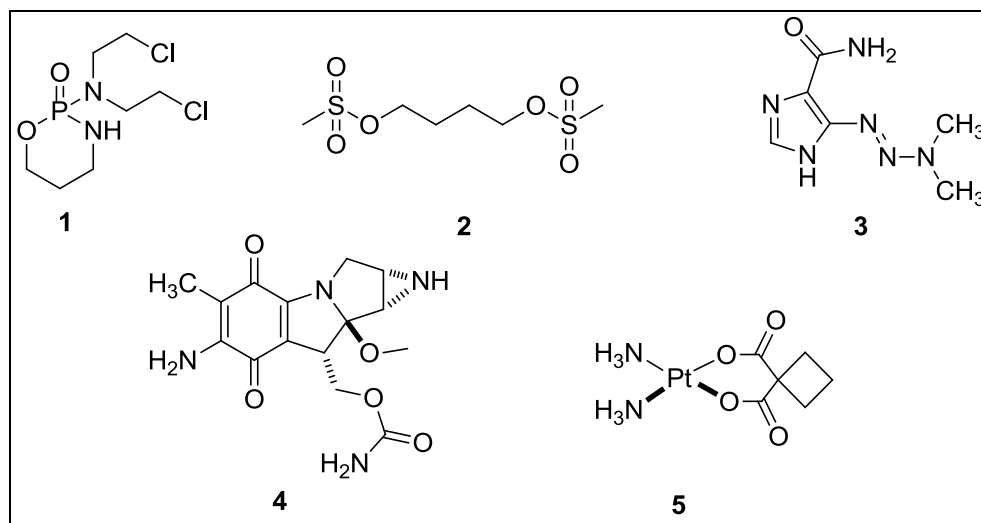


Figura 5. Agentes alquilantes

1.4.4.2 Inhibidores de proteínas relacionadas con el ADN.

La estructura del ADN y el proceso de replicación y transcripción depende de algunas proteínas que han sido blancos terapéuticos de los agentes anticancerígenos. Este grupo incluye a los inhibidores de topoisomerasas, enzimas relacionadas con la síntesis del ADN, enzimas relacionadas con las histonas y factores de transcripción.

1.4.4.2.1 Inhibidores de topoisomerasa

Las ADN topoisomerasas modulan la topología del ADN por la modificación de la estructura terciaria de la doble hélice sin alterar las secuencias de nucleótidos. La topoisomerasa tipo I genera fragmentos de hebras de ADN transitorios, mientras que la topoisomerasa tipo II produce rupturas de cadena doble [32, 33]. Los fármacos que inhiben a la topoisomerasa tipo I son los derivados de camptotecinas: topotecan e irinotecan. Los fármacos inhibidores de la topoisomerasa tipo II incluyen los derivados de podofilotoxina (etopósido y tenipósido), antraciclinas naturales (doxorubicina y sus análogos epirubicina e idarubicina) y sintéticas (mitoxantrona) (Figura 6) [30].

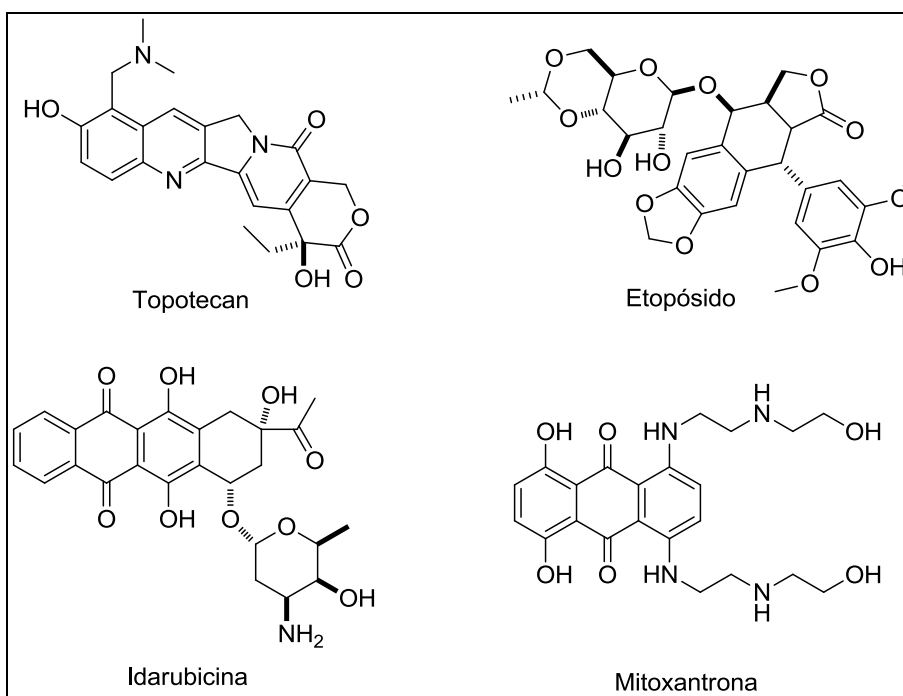


Figura 6. Inhibidores de topoisomerasas

1.4.4.2.2 Antimetabolitos

Los antimetabolitos interfieren con enzimas que contribuyen a la síntesis de ADN. Este grupo incluye a los antifolatos (metotrexato, pemetrexed), inhibidores de la timidilato sintasa (raltitrexed, floxuridina y 5-fluorouracilo), análogos de pirimidinas (citarabina y gemcitabina) y análogos de adeninas (fludarabina, pentostatina y cladribina, Figura 7) [30, 34].

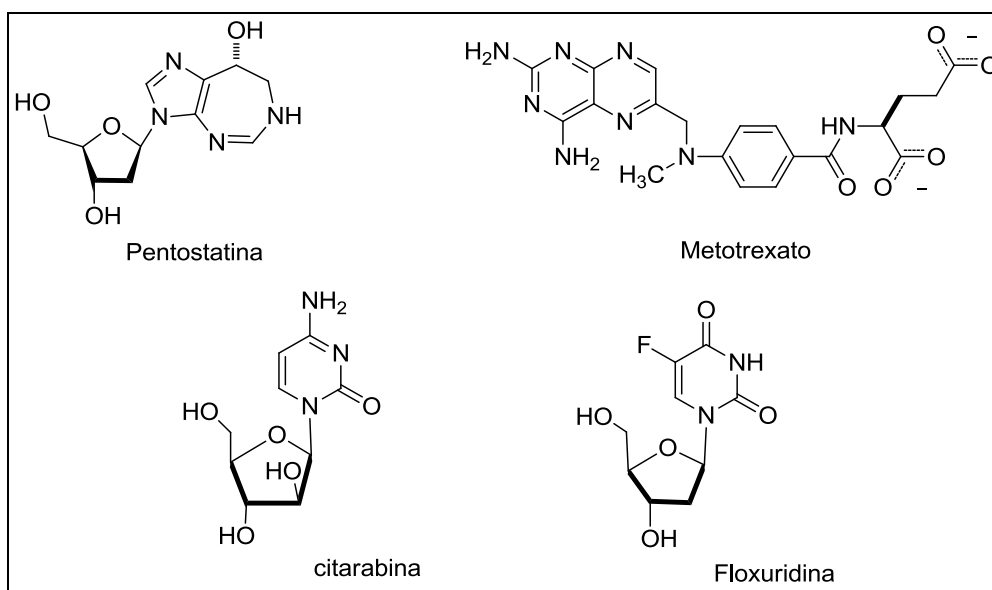


Figura 7. Algunos antimetabolitos usados en la quimioterapia

1.4.4.2.3 Enzimas relacionadas con las histonas

Las histonas desacetilasas eliminan los grupos acetilos de los residuos de lisinas que se encuentran en las colas de las histonas conduciendo a la compactación de la cromatina y la represión transcripcional. Estos fármacos son

muy promisorios debido a su baja toxicidad [35, 36]. Los fármacos actualmente en el mercado con este mecanismo son: vorinostat, romidepsina, panobinostat y belinostat (Figura 8) [37].

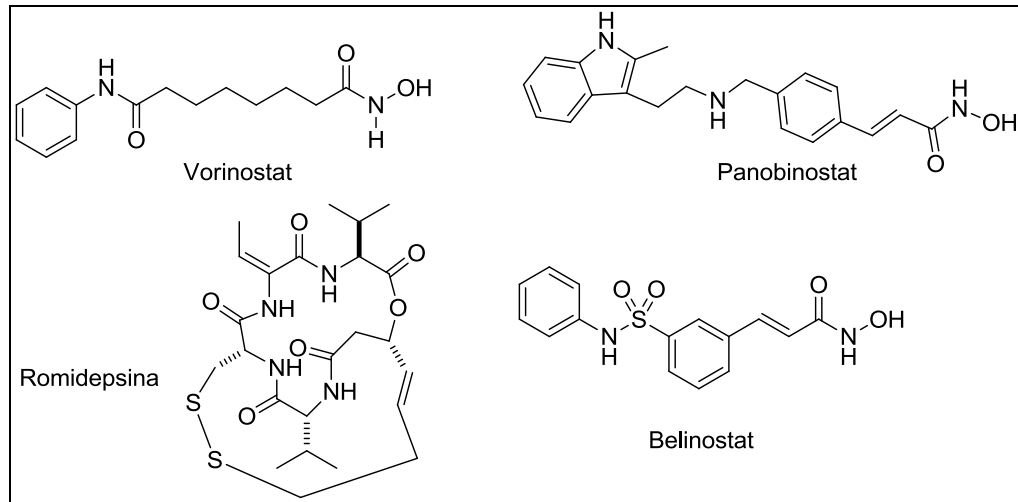


Figura 8. Inhibidores de las histonas desacetilasas

1.4.4.2.4 Inhibidores de factores de transcripción

Una alta proporción de los oncogenes y genes supresores de tumores codifican los factores de transcripción, por lo que una activación aberrante de estos factores conduce a la expresión desregulada de genes asociados con el desarrollo y progresión del tumor.

Existen cuatro familias de factores de transcripción: el factor nuclear kB (NF-kB), los transductores de señal y activadores de transcripción (STAT), el factor inducible de hipoxia-1 (HIF-1) y los co-activadores de los receptores de

esteroides. Los fármacos que inhiben algunos de estos factores de transcripción de manera directa o indirecta son el bortezomib y la trabectedina [30].

1.4.4.2.5 Genes específicos

Los fármacos representativos en este grupo son: los esteroides, antihormonas y retinoides, los cuales modifican la expresión de genes específicos. Las hormonas esteroideas como los glucocorticoides (prednisolona y dexametasona), se unen al receptor de proteínas en el citoplasma o núcleo para formar el complejo hormona-receptor. Este complejo tiene la capacidad de activar secuencias regulatorias en el ADN. Los antiestrógenos (tamoxifeno y fulvestrant) y antiandrógenos (flutamida y bicalutamida) bloquean los receptores de los estrógenos y andrógenos (Figura 9), respectivamente, los cuales son factores de transcripción regulados por ligandos situados en el núcleo. Los agentes antiaromasas (anastrozol, letrozol y exemestano) actúan en el citoplasma de las células tumorales aunque también en los tejidos periféricos. Los agonistas de LH-RH (Hormona liberadora de gonadotropina) se unen a un receptor específico de membrana unido a una proteína G en el hipotálamo. Los fármacos usados son: goserelina, triptorelina y buserelina [30].

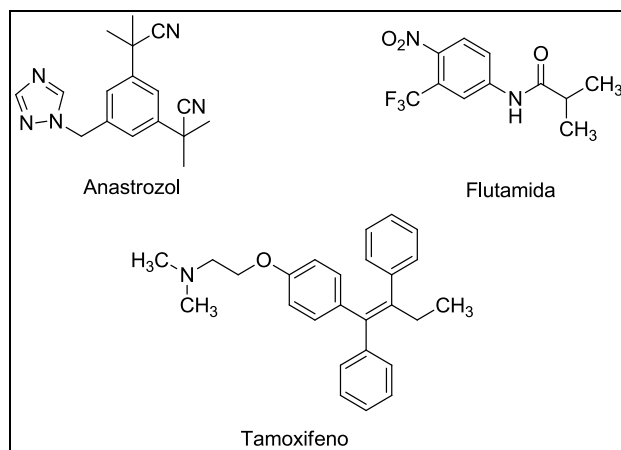


Figura 9. Fármacos que modifican la expresión génica

1.4.4.3 Fármacos dirigidos a los receptores de membrana

Los fármacos que se unen a receptores de membrana se dividen en dos grupos: los anticuerpos monoclonales y pequeñas moléculas. Los anticuerpos monoclonales bloquean el dominio extracelular del receptor. Ejemplo de estos son los anti-CD20 (rituximab, ibritumomab-I, tositumomab-I), los anti-CD52 (Alemtuzumab), anti-Her-2 (Trastuzumab) y los Anti-EGFR (cetuximab) [30].

Por otro lado, moléculas pequeñas cruzan la membrana e inhiben el dominio intracelular, por lo general una tirosina quinasa. Gefitinib, erlotinib, lapatinib y certinib son los fármacos que componen este grupo (Figura 10) [30, 37].

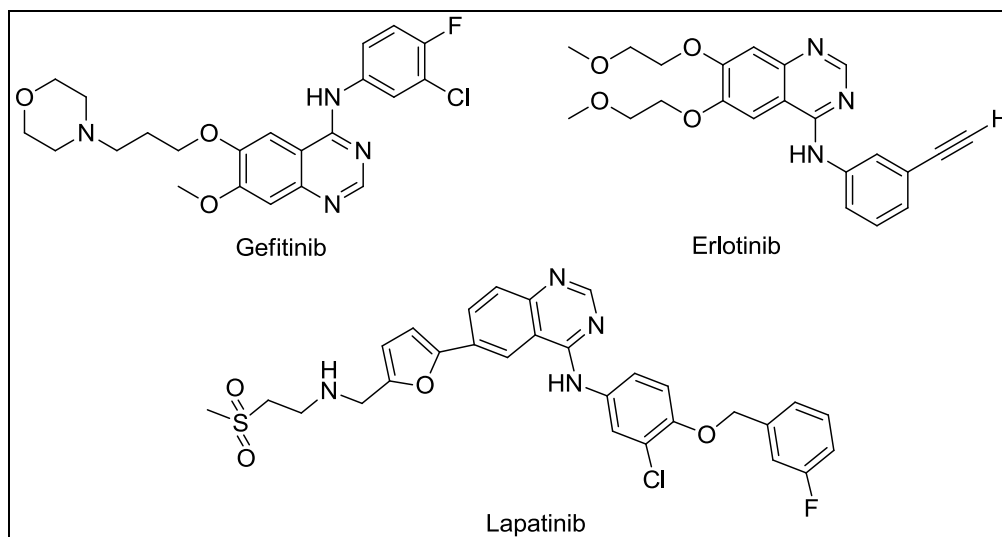


Figura 10. Fármacos inhibidores de receptores de membrana

1.4.4.4 Fármacos dirigidos a las vías de señalización intracelular

Existen diversas vías metabólicas las cuales conducen las señales de proliferación al núcleo. Estas señales son activadas por factores de crecimiento, las cuales son blancos terapéuticos ideales. El fármaco más conocido de este grupo es el imatinib, el cual inhibe la tirosina quinasa de bcr/abl uniéndose a sus aminoácidos y evitando la subsecuente fosforilación de sus sustratos[38]. Existen otros blancos terapéuticos como las proteínas Ras, las vías de fosfatidilinositol, proteasoma y las quinazas dependientes de ciclina.

La proteína Ras está involucrada en diversos procesos celulares como: la apoptosis, la integridad del citoesqueleto, la proliferación, diferenciación, adhesión y migración celular. Sin embargo, su función se altera en los tumores malignos, provocando un aumento en la capacidad de invasión y metástasis, y

una disminución de la apoptosis [39]. Esta proteína es activada por la farnesil transferasa, por lo que los inhibidores de esta enzima, lonafarnib y tipifarnib, actúan como falsos metabolitos de esta enzima deteniendo la cascada de señalización [30].

La vía de señalización de la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K, por sus siglas en inglés) está involucrada en el proceso de crecimiento y supervivencia celular. La PI3K activa a los segundos mensajeros (PIP2 y PIP3) conduciendo a la activación de la proteína Akt, la cual está involucrada en procesos de motilidad e invasión celular. La Akt activa proteínas como mTOR, la cual está relacionada con el crecimiento celular y la apoptosis, por lo que una activación aberrante de esta proteína conduce a un crecimiento celular descontrolado. Los fármacos everolimus y temsirolimus son derivados de la rapamicina y son inhibidores de la mTOR [40].

Por otro lado, la PI3K activa otras cinasas como la proteína cinasa C, la cual activa al factor nuclear de cadenas kappa de las células beta (NF- κ B), una enzima que está involucrada en la apoptosis. Sin embargo, la proteína cinasa C puede ser inhibida por el macrólido briostatina [30].

1.4.4.5 Fármacos que se unen a la tubulina

La tubulina es una proteína heterodimérica de 9 nm de longitud. Esta proteína es la unidad principal de los microtúbulos, los cuales están involucrados en mantener la forma de la célula, el transporte intracelular y la mitosis. Los fármacos inhibidores de tubulina evitan que esta proteína forme los dímeros necesarios para la formación de los microtúbulos, propiciando muerte celular. Los alcaloides vincristina, vinblastina, vinflunina y vinorelbina son inhibidores de la tubulina [41].

Por otro lado, los alcaloides de tipo taxano paclitaxel y docetaxel, favorecen la polimerización y ensamblaje de los microtúbulos, pero se unen a estos impidiendo que el huso mitótico se forme correctamente y que el proceso de mitosis se efectúe [34].

Las células cancerosas pueden presentar resistencia a paclitaxel y docetaxel, por lo que las epotilonas pueden ser una opción. Las epotilonas son macrólidos que se unen a los microtúbulos de una manera similar a los taxanos. La ixabepilona es un ejemplo de este grupo [42,43].

1.4.4.6 Fármacos que actúan sobre el endotelio

Conocer los mecanismos de invasión y migración de las células cancerosas a nivel molecular ha permitido identificar nuevos objetivos para evitar y prevenir la

diseminación de los tumores. Estos incluyen los procesos de angiogénesis, la matriz extracelular y el sistema inmune.

El proceso de angiogénesis (formación de vasos sanguíneos) es activado en las células cancerosas cuando éstas presentan hipoxia y se inicia con la expresión de proteínas como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés) o algunas tirosinas quinasas. El VEGF estimula la proliferación y supervivencia de las células endoteliales. Fármacos como la apilidina, enzastaurina[30], los derivados de talidomida [44] y el anticuerpo monoclonal bevacizumab, son opciones para inhibir el VEGF [30].

Para que un tumor pueda invadir, este requiere de la migración dependiente de adhesión de las células cancerosas en los tejidos circundantes, alterando genes implicados en la sobrevivencia y proliferación de la célula tumoral. Este proceso puede ser detenido a nivel de las metaloproteinasas (MMPs, enzimas dependientes de zinc responsables de la degradación proteolítica de la matriz extracelular), o de las moléculas de adhesión como: las integrinas, caderinas, selectinas y la familia de las IgG. Los compuestos sintéticos marimastat o prinomastat, son ejemplos de inhibidores de las metaloproteinasas[30]. Diversos fármacos como cilengitida [45] y MK0429 [46] son inhibidores de integrinas pero aún están en fase II y I, respectivamente.

Otra manera de inhibir las células endoteliales y tumorales es mediante la

inhibición de la superóxido dismutasa-1 la cual está involucrada en la activación de factores de angiogénesis como VEGF, NF- κ B, IL-6 e IL-8. El compuesto ATN-224 es un promisorio inhibidor de la superóxido dismutasa y está en ensayos clínicos para el tratamiento de cáncer de próstata, mama y otros tipos de cáncer [47,48].

A pesar de la cantidad de opciones terapéuticas existentes y de los estudios a nivel celular del comportamiento de las células cancerosas, no se ha logrado erradicar esta enfermedad. De ahí la importancia de que diversos grupos de investigación continúen en la búsqueda de nuevas y promisorias alternativas con la finalidad de curar, controlar y/o prevenir esta enfermedad.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

2.1 Funcionalización de enlaces C(sp³)-H contiguos a nitrógeno

2.1.1 Generalidades

La síntesis de heterociclos que contienen nitrógeno son de gran importancia debido a sus propiedades biológicas y farmacéuticas [49-50]. Existen diversas metodologías para la obtención de este tipo de ciclos, sin embargo, las rutas sintéticas suelen ser largas (mayor a 4 etapas), tediosas, de bajos rendimientos y de limitada diversidad estructural [51]. Una de las maneras de mejorar la preparación e incrementar la diversidad estructural de productos naturales y sintéticos es mediante la activación y funcionalización de enlaces C-H contiguos a un heteroátomo para la formación de nuevos enlaces carbono-carbono o carbono heteroátomo mediante el uso de catalizadores metálicos, oxidantes u otros reactivos [52]. La directa funcionalización del carbono α al nitrógeno en

tetrahidroisoquinolinas, indoles, piridinas [53], fenantridinas [54] y otras aminas terciarias, se puede lograr mediante las reacciones de acoplamiento cruzado deshidrogenativo (ACD). Las reacciones de ACD se definen como el acoplamiento cruzado de dos enlaces C-H diferentes de pronucleófilos y proelectrófilos evitando la preparación preliminar de grupos funcionales y logrando esquemas de síntesis más cortos y eficientes [55].

2.1.2 Funcionalización del enlace C(sp³)-H en isoquinolinas

La funcionalización del carbono α al nitrógeno de aminas, en especial de tetrahidroisoquinolinas (THIQs) ha sido estudiada en los últimos años debido a que es una plataforma que se encuentra presente en diversos productos naturales con propiedades biológicas y farmacológicas relevantes. Diversas metodologías han sido reportadas para lograr la funcionalización de THIQs. Sólo por mencionar algunas, en 2005 Li y cols. reportaron la funcionalización de THIQs con una variedad de indoles y malonatos, usando bromuro cuproso (CuBr) como catalizador e hidroperóxido de *tert*-butilo (*t*-BuOOH) como agente oxidante, obteniéndose rendimientos de 49 a 85% [55,56]. Por otro lado, Yu y cols. reportaron la funcionalización de THIQs con alquinos usando yoduro cuproso (CuI) en tolueno a 50°C [57]. Wang y cols. funcionalizaron THIQs con olefinas, usando triflato de cobre II (Cu(OTf)₂) como catalizador y oxígeno (O₂

molecular) como oxidante, en diclorometano (DCM) a temperatura ambiente, obteniéndose rendimientos de 47 a 90% [58]. Prabhu y cols. reportaron la funcionalización de THIQs con fosfitos, usando trióxido de manganeso (MnO_3) y O_2 en excelentes rendimientos (86-95%) [59]. Yoon y cols. reportaron la funcionalización de THIQs con aceptores de Michael por fotocatalisis, usando catalizadores de iridio y rutenio y luz fluorescente compacta como fuente de radiación, en rendimientos superiores al 90% [60]. Prabhu y cols. reportaron la funcionalización de THIQs con una gran diversidad de pronucleófilos como los malonatos, indoles [60], cumarinas, fosfitos, nitroalcanos, fenoles y nitrilos, usando diyodo (I_2) como catalizador y O_2 como oxidante en MeOH [61]. Considerando que la reacción de ACD ha permitido incorporar nucleófilos estructuralmente diversos en plataformas químicas sencillas, resulta interesante aplicar esta metodología en la funcionalización de productos naturales o fármacos para aumentar sus diversidades estructurales y/o para mejorar sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas.

2.2 Síntesis de análogos de alcaloides benzo[c]fenantridínicos

La modificación estructural de productos naturales complejos es un reto desafiante en síntesis orgánica. Desde un enfoque semisintético, la modificación de los grupos funcionales existentes en los productos naturales puede generar análogos con mayor potencial farmacológico. Aunque este enfoque conduce a una menor diversidad estructural, se han obtenido muchos

derivados de productos naturales privilegiados con propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas mejoradas en comparación con los compuestos originales [62].

Debido a un interés renovado en la actividad biológica de los compuestos benzo[c]fenantridínicos, la síntesis de éstos resulta de gran importancia en la química heterocíclica. Diversos grupos de investigación han sintetizado derivados de alcaloides de tipo benzo[c]fenantridina. En 2005, Clement y cols. [9] sintetizaron 31 derivados de 6-amino-11,12-dihidrobencoc]fenantridinas y 23 derivados de 6-amino-11,12-bencoc]fenantridinas sustituidos en la posición 11, con grupos aromáticos, fenoles y halogenuros de arilo.

Por otro lado, Okada y cols. [63] sintetizaron alcaloides como queleritrina, sanguinarina y un análogo del alcaloide corinolina, usando protopina y la α -alocriptopina como precursores, metabolitos secundarios mayoritarios de *B. cordata*. Cushman y cols. [64] reportaron la síntesis de un análogo del alcaloide nitidina, aunado a la determinación de sus propiedades anticancerígenas *in vitro* e *in vivo*. Por otro lado, Bisagni y cols. [65] sintetizaron 10 análogos de 7,8,9,10-tetrahidrobencoc]fenantridin-6(5H)-ona y sus correspondientes benzofenantridinas sustituidas en la posición 6 con diferentes (dimetilamino)alquilaminas y posteriormente se determinaron sus propiedades anticancerígenas. LaVoie y cols. [66] sintetizaron siete benzo[l]fenantridinas bioisómeros de nitidina y evaluaron su capacidad inhibitoria de topoisomerasa tipo I y II. En 2013, Yu y cols. [67] reportaron la síntesis de 27 fenantridinas

mediante una reacción de multicomponentes usando un fotocatalizador de iridio e irradiando con un diodo emisor de Luz (LED). Studer y cols. [68] reportaron la síntesis de 20 derivados de fenantridinas en dos pasos de reacción, uno de ellos vía radicales.

A pesar de la gran cantidad de alcaloides tipo benzofenantridina y análogos sintetizados, se ha tenido poco progreso en la preparación de compuestos con sustituyentes en los carbonos contiguos al átomo de nitrógeno[9]. Por tanto, en el presente proyecto de investigación se propuso la síntesis de varios análogos de alcaloides benzofenantridínicos mediante la activación y funcionalización de los enlaces C-H contiguos al átomo de nitrógeno.

2.3 Actividad anticancerígena de alcaloides benzofenantridínicos

Los alcaloides de tipo benzofenantridina han tomado gran importancia debido a sus propiedades farmacológicas, en especial su actividad antimicrobiana y anticancerígena. Por tal motivo, diversos grupos de investigación han realizado estudios sobre su actividad citotóxica y anticancerígena, aunado a la determinación de sus mecanismos de acción.

Ulrichová y cols. [69] reportaron que los alcaloides sanguinarina y dihidrosanguinarina presentan actividad antileucémica *in vitro* a una concentración inhibitoria media (CI₅₀) de 9 y 20 μM , respectivamente. Además mencionan que la dihidrosanguinarina activa la caspasa 3 y 9 mientras que la sanguinarina activa las caspasas 3, 8 y 9. El mecanismo por el cual inducen la muerte celular es dosis-dependiente, es decir, sanguinarina induce la muerte celular por apoptosis a una concentración de 0.5 μM y necrosis a una concentración de 1-4 μM , mientras que la dihidrosanguinarina induce necrosis a una concentración de 5 μM y apoptosis a 10 μM [69]. Por otro lado, Hecht y cols. [70] reportaron que la nitidina e isofagaridina inhiben la topoisomerasa I a 55 μM , lo que en comparación con el control positivo camptotecina (167 μM), los hace buenos candidatos como inhibidores de topoisomerasa I. En 2008, Ulrichová y cols. [71] reportaron la actividad citotóxica de queleritrina y dihidroqueleritrina frente a células de leucemia humana (HL-60) y llegaron a la conclusión de que estos alcaloides disminuyen la viabilidad celular debido a la activación de diversos eventos apoptóticos como la activación de la caspasa 9 y 3. Además, la actividad de la caspasa 8 es elevada cuando la célula leucémica está en contacto con sanguinarina. Los autores reportaron que además de inducir apoptosis, estos alcaloides inducen necrosis y provocan la acumulación de las células leucémicas en la fase G1 del ciclo celular afectando la distribución celular. Quin y Deng reportaron el aislamiento de nuevos alcaloides dihidrobenzofenantridínicos conocidos como maclekarpina A-E (3 análogos de dihidrosanguinarina y 2 análogos de dihidroqueleritrina) obtenidos a partir de *Macleaya microcarpa* y determinaron actividad anticancerígena frente a 5

líneas celulares cancerosas (colon, hígado, estómago, ovario y pulmón). Ellos observaron que 4 de los nuevos alcaloides mostraron una actividad citotóxica menor a 5 μM frente a algunas líneas celulares lo cual es comparable con los valores mostrados por el control positivo camptotecina [72]. Symanek y cols. realizaron estudios sobre la hepatotoxicidad de sanguinarina y queleritrina en células de hepatocitos humanos y porcinos debido a que dos extractos (sanguiritrina y sanguinaria) se encuentran a la venta en China y Rusia para el tratamiento de enfermedades musculares y se usan como antimicrobiano y antiplaquetario en Rusia. Ellos realizaron un estudio en ratones y reportaron que estos compuestos son tóxicos a dosis altas, por lo que se recomienda el uso de estos extractos en dosis moderadas. Después de realizar estudios para conocer la causa de la toxicidad de estos alcaloides, llegaron a la conclusión que es debido a la unión de los grupos tiol (SH) de las proteínas al grupo iminio de los alcaloides [6]. Barthomeuf y cols. [73] reportaron que la sanguinarina causa muerte celular debido a una respuesta rápida apoptótica inducida por su unión con el glutatión, un antioxidante encargado de neutralizar las especies reactivas de oxígeno (EROs). Al disminuir la cantidad de glutatión reducida (GSH), se rompe el equilibrio oxido-reducción conduciendo a estrés oxidativo celular y propiciando que la célula inicie el proceso de apoptosis por la activación de las caspasas. En 2013, Choi y cols. [74] reportaron la actividad citotóxica de sanguinarina en células cancerosas de colon (HCT-116) y el mecanismo por el cual lo induce es por una sobreproducción de EROs y consecuente activación de la expresión de la proteína Egr-1 (Early Growth Response-1), la cual suprime el tumor después de un daño celular. Además, las

EROs pueden dañar la membrana mitocondrial ocasionando la activación de las caspasas. Por lo tanto, los autores sugieren que la sanguinarina genera las EROs que se sitúan hacia una secuencia de material genético involucrado en la activación de señalización de Egr-1 y otras moléculas activadoras de apoptosis en células HCT-116. Trentesaux y cols. reportaron el efecto citotóxico que tiene el alcaloide fagaronina sobre la línea celular eritroleucémica (K562) caracterizada por tener células inmaduras que proliferan y se acumulan rápidamente. Ellos reportaron que la fagaronina favorece la diferenciación (maduración) celular uniéndose a regiones específicas de eritrocitos, por lo que al aumentar la diferenciación celular pierden su capacidad de proliferación y no se observa citotoxicidad aguda en las células ya diferenciadas. La fagaronina puede ser una opción coadyuvante en la quimioterapia convencional para el tratamiento de leucemias eritroides [75].

A pesar de que existen reportes sobre los mecanismos de acción por el cual algunos alcaloides benzofenantridínicos presentan su actividad anticancerígena, su uso está limitado debido a su alta unión a proteínas y al ADN lo que conlleva a mayor toxicidad y menor selectividad hacia las células cancerosas [76]. Por tal motivo, es importante diseñar nuevos análogos de estos alcaloides que presenten selectividad y mayor toxicidad hacia las células cancerosas.

2.4 Apoptosis

La apoptosis se define como una muerte programada intracelular, en el que un programa de "suicidio" se activa dentro de la célula, lo que lleva a la fragmentación del ADN, el encogimiento del citoplasma, los cambios de la membrana y la muerte celular. Al alterarse la superficie de la célula, ésta célula es reconocida por una célula vecina (la cual aprovecha los componentes orgánicos como energía) o por un macrófago para ser fagocitada antes de que ocurra una fuga de su contenido y así evitar la activación del proceso inflamatorio (Figura 11) [77, 78].

Este proceso ocurre normalmente como un proceso homeostático para el mantenimiento de las células en diversos tejidos y como un mecanismo de defensa cuando la célula es dañada por el sistema inmune, agentes nocivos (radiación, fármacos) y patógenos [79].

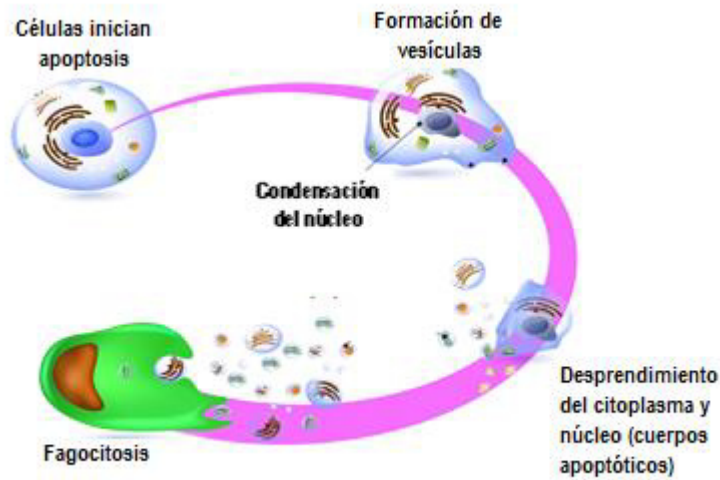


Figura 11. Proceso de apoptosis [80].

2.4.1 Mecanismos de apoptosis

La maquinaria apoptótica se divide en dos clases de componentes: sensores y efectores. Los sensores monitorean las condiciones ambientales intra- y extracelular y esas señales influirán en la supervivencia o muerte celular. Ejemplo de estos sensores ligando/receptor incluyen: IGF-1/IGF-1R y IL-3/IL-3R; mientras que, los sensores que favorecen la muerte celular ligando/receptor incluyen: FAR/FASr y THF α -TNF-R1. Los sensores intracelulares detectan anomalías en la células como: daño al ADN, desbalance en la señalización ocasionando activación de oncogenes, factores de crecimiento insuficientes e hipoxia [81, 82].

La cadena apoptótica es controlada por proteínas reguladores de la familia Bcl-2 donde se incluyen las proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1), las cuales actúan suprimiendo las proteínas pro-apoptóticas (Bad y Bax) que se encuentran incrustadas en la membrana mitocondrial y que desencadenan la apoptosis [83]. Cuando Bax y Bad se liberan de la membrana, provocan una alteración en la mitocondria causando la liberación del citocromo C al citosol que, al unirse con el factor activador de proteasa (FAP-1) forma un apoptosoma que finalmente se unirá a la procaspasa 9, activándose la cascada de las caspasas [78]. Las caspasas son un grupo de cistein-proteasas inactivas, que son activadas al escindir sus sustratos manteniendo su residuo aspártico e iniciando diversos procesos proteolíticos hasta lograr la muerte celular [84].

El proceso de apoptosis en células cancerosas está afectada de tal manera que evitan que estas células mueran, por lo cual es importante buscar fármacos que activen este proceso en las células tumorales para la supervivencia del paciente.

2.5 Topoisomerasas

Las topoisomerasas son una familia de enzimas nucleares que regulan la geometría tridimensional del ADN favoreciendo los procesos metabólicos relacionados con la separación de las cadenas de ADN como la transcripción, reparación y replicación [32]. Estas enzimas se clasifican de acuerdo a la cantidad de hebras que pueden cortar y ligar: la enzima monomérica tipo I (topo I) cataliza la formación de fragmentos en una cadena de ADN de doble hélice sin requerimientos de energía, mientras que la enzima dimérica tipo II (topo II) escinden ambas hebras del ADN de doble hélice en forma dependiente de ATP [33]. Algunos alcaloides isoquinolínicos naturales [70] y sintéticos [66],[85] han demostrado que inhiben a la Topo I, por lo que el presente trabajo de investigación se enfocó en la inhibición de la Topo I.

2.5.1 Topoisomerasa I (Topo I)

La Topoisomerasa de tipo I (Topo I) rompe de manera transitoria una de las cadenas de la doble hélice del ADN permitiendo la relajación del ADN superenrollado y al mismo tiempo unir el mismo enlace que fue hidrolizado anteriormente a su cadena origen [86].

El mecanismo catalítico de la Topo I implica un ataque nucleofílico por el grupo OH del sitio activo de la tirosina (Tyr723 en TopoI humano) al grupo fosfato del extremo 3' de la hebra de corte, lo que resulta en la hidrólisis del enlace fosfodiéster del ADN y la formación de un complejo covalente ADN binario-Topo I (complejo escindible). Después de la escisión, la cadena de ADN rota puede girar alrededor de la cadena ininterrumpida y retirar el ADN superenrollado para su posterior ligación (Figura 12) [87].

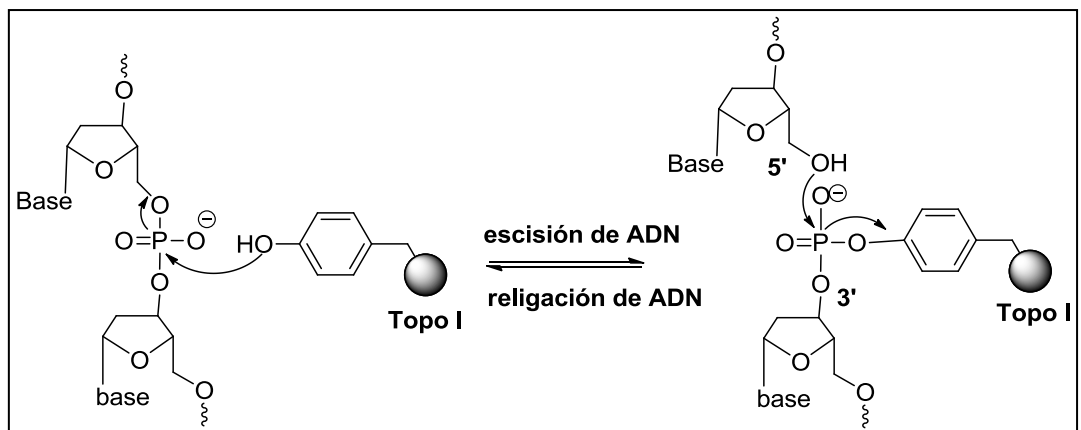


Figura 12. Mecanismo catalítico de la topoisomerasa I [87].

2.5.2 Inhibición de la Topo I

Los inhibidores de la topoisomerasa I actúan como inhibidores interfaciales debido a que no inhiben el sitio catalítico, si no que capturan el complejo de escisión Topo I-ADN evitando que la Topo I realice el proceso de ligación (Figura 13) [88]. Al bloquearse el proceso de ligación en el ciclo celular, se generan fragmentos de cadena simple de ADN que dañan la integridad del genoma. El aumento de estos fragmentos activan los procesos de apoptosis conduciendo a la muerte celular [85].

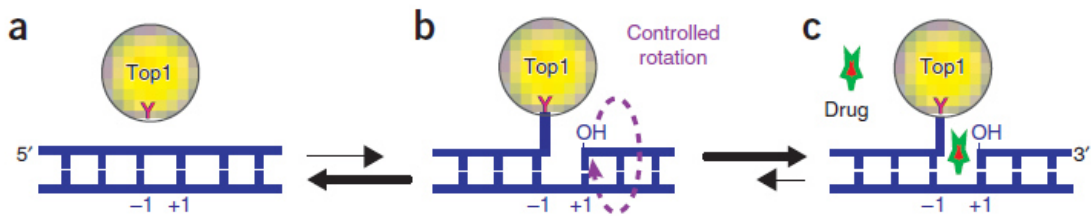


Figura 13. Mecanismo de acción de inhibidores de Topo-I [85].

Actualmente, los derivados de camptotecina (irinotecan y topotecan, belotecan) representan la única clase de inhibidores topo I que se prescriben para el tratamiento de cáncer ovárico, pulmonar y colorrectal [89]. Sin embargo, la inestabilidad química de las camptotecinas debido a la hidrólisis de la lactona en el torrente sanguíneo, el corto tiempo que se mantiene atrapado el complejo de escisión, la toxicidad de éstas al presentarse efectos adversos como diarrea y neutropenia, y la resistencia que presentan las células cancerosas que sobreexpresan las bombas de expulsión de fármacos son algunas de las limitaciones que presentan las camptotecinas [87]. Por tanto, se continúa la búsqueda de nuevas entidades químicas que inhiban a la Topo I de forma más efectiva y menos tóxica para el paciente.

2.6 Mecanismo de resistencia de las células cancerosas hacia los fármacos

El tratamiento de diversos cánceres ha sido cada vez más específico hacia las dianas moleculares gracias a los estudios de los oncogenes y los genes supresores de tumores que están relacionados con el desarrollo de los cánceres, lo que ha incrementado la efectividad de la quimioterapia anticancerígena. Sin embargo, existen otros factores que impiden que los fármacos anticancerígenos cumplan su objetivo. Estos factores involucran al huésped y al comportamiento de las células cancerosas [90].

2. 6. 1. Factores que involucran al huésped

Los factores que involucran al huésped en la resistencia que presentan las células cancerosas a la terapia anticancerígena incluyen:

- Factores farmacocinéticos

Estos incluyen mala absorción del fármaco, metabolismo o excreción rápida del fármaco y la edad del paciente, en especial las personas de edad avanzada que no toleran las dosis usadas para el tratamiento por lo que es necesario

disminuir la dosis de administración conduciendo a que no se alcancen los niveles séricos óptimos del fármaco [90].

- Factores tumor-fármaco

Otro factor es la incapacidad para administrar un fármaco al sitio de un tumor, como podría ocurrir con tumores voluminosos o con agentes biológicos de alto peso molecular y baja penetración en el tejido, tales como los anticuerpos monoclonales y las inmunotoxinas [90].

2.6.2 Factores relacionados con las células cancerosas

2.6.2.1 Factores tumor-huésped

En este rubro se incluye el metabolismo local de un fármaco por células no tumorales, las características inusuales del suministro de sangre del tumor que pueden afectar al tiempo de tránsito de drogas dentro de los tumores y la forma en la que las células cancerosas interactúan entre sí y con las células intersticiales del huésped [89].

2.6.2.2 Mecanismos de resistencia a fármacos

Existen varios mecanismos por el cual las células cancerosas se vuelven resistentes a los fármacos. Algunos de los mecanismos son: la pérdida del receptor en la superficie celular, la pérdida del transportador del fármaco, alteración por mutación de una diana específica del fármaco. Cuando se observa que un tumor específico presenta cierta resistencia a una clase de fármacos, ese tumor puede ser tratado mediante el uso de fármacos con diferente mecanismo de acción para atacar en varias dianas terapéuticas. Sin embargo, si estas células presentan de manera simultánea resistencia a varios fármacos, se promueve la resistencia multifármaco, se disminuye la acumulación intracelular del fármaco por una baja recaptación, se aumenta la expulsión de fármaco o se afecta la membrana lipídica. Estos cambios bloquean la apoptosis (mecanismo de acción de diversos fármacos), activan mecanismos de detoxificación de fármacos y de reparación de ADN y alteran el ciclo celular en puntos de control que hacen que las células cancerosas resistan a los fármacos anticancerígenos [90]. Por tanto, la resistencia a múltiples fármacos es el mecanismo principal por el cual las células cancerosas desarrollan resistencia a la quimioterapia.

La resistencia de las células cancerosas a la terapia se ha relacionado con al menos tres bombas de expulsión de fármacos: la glicoproteína-P (P-gp/MDR-1), la proteína asociada a la resistencia a múltiples fármacos (MRP-1) y una

proteína que se expresa exclusivamente en la línea de carcinoma mamario (BCRP) y en algunas leucemias [91].

2.5.2.2.1 Glicoproteína-P (gp-P)

La glicoproteína-P (gp-P) es una fosfoglicoproteína de 170 kDa que está constituida por dos regiones transmembranales y dos casetes de unión a trifosfato de adenosina (ATP), cada uno de los cuales contienen 6 dominios transmembranales. Esta glicoproteína es una bomba transportadora de fármacos que se activa cuando su gen MDR1/ABCB1 (*multidrug resistant 1*) se expresa y está implicada en el flujo de salida de fármacos, nutrientes y otras moléculas biológicamente importantes dentro, fuera y a través de las membranas celulares [92].

La gp-P es capaz de detectar y unirse a productos naturales hidrófobos neutros y catiónicos a medida que van entrando en la membrana plasmática. Al existir el complejo gp-P-fármaco se activa uno de los dominios unidos a ATP, lo que conduce a su hidrólisis del dominio, ocasionando un cambio en la forma de la gp-P y promoviendo la liberación del fármaco al espacio extracelular [90,91].

Diversos estudios han encontrado que la gp-P se expresa ampliamente en cánceres del tracto gastrointestinal, cánceres del sistema hematopoyético, cánceres del sistema genitourinario y cánceres infantiles. La mayoría de los productos naturales utilizados en la terapia anticancerígena como la

doxorrubicina, daunorrubicina, vinblastina, vincristina, paclitaxel, etopósido, ya no son efectivos frente a las células que expresan la proteína gp-P [92].

2.5.2.2.2 Proteína 1 asociada a la resistencia a múltiples fármacos (MRP-1)

La MRP-1 es una proteína de 190 kDa que pertenece a los transportadores dependientes de ATP (casete ABC) y fue descubierta en células de cáncer de pulmón que no expresan la gp-P. El gen que expresa esta proteína es la ABCCI. Este transportador se une a productos naturales y fármacos aniónicos o a fármacos que han sido modificados por el glutatión o por reacciones de conjugación, glucosilación y glucoronilación. Se han realizado estudios en donde demuestran que paclitaxel, las antraciclinas y los alcaloides de la vinca también se unen a la MRP-1 [93].

2.5.2.2.3 Proteína de resistencia en carcinoma mamario (BCRP)

La proteína de resistencia en cáncer de mama (BCRP) que pesa 75 kDa fue aislada de una línea celular de cáncer de mama resistente a verapamil (un inhibidor de la gp-P) y a doxorrubicina. Esta proteína transportadora es otra bomba de expulsión que pertenece a otra familia del casete de proteínas de unión a ATP (familia G) y el gen que la expresa es el ABCG2. Algunos estudios mencionan que la BCRP se encuentra en células primitivas preferentemente en la médula ósea teniendo como función proteger a la célula de xenobióticos. Se ha reportado que las células de cáncer que expresan esta proteína son

resistentes a mitoxantrona, topotecan, metotrexato, doxorrubicina, verapamil y otros agentes xenobióticos [94].

La resistencia que han desarrollado las células cancerosas a múltiples familias de fármacos anticancerígenos se ha incrementado en los últimos años. Por tanto, la búsqueda de novedosas plataformas que reviertan esta resistencia sigue siendo prioridad en el área de la salud a nivel mundial.

CAPÍTULO 3

JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS y OBJETIVOS

3.1 Justificación del proyecto

Como ya se mencionó anteriormente, el cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, nacional y estatal. A pesar de los fármacos existentes para el tratamiento del cáncer, la quimioterapia no ha sido exitosa contra el cáncer debido a la resistencia que han desarrollado las células malignas a múltiples fármacos y la falta de selectividad de los mismos por las células cancerosas.

Por tanto, la búsqueda de nuevas entidades químicas con actividad anticancerígena puede ofrecer una opción para revertir esta problemática. Así, en este proyecto de investigación se propuso la obtención de análogos sintéticos y semisintéticos de alcaloides benzo[c]fenantridínicos mediante la activación y funcionalización del enlace C-H contiguo al nitrógeno, así como determinar sus propiedades citotóxicas y el mecanismo de acción.

3.2 Hipótesis

Las 5,6-dihidrobenzo[c]fenantridinas semisintéticas y sintéticas C(6)-funcionalizadas poseen mayor actividad citotóxica que la doxorrubicina.

3.3 Objetivo General

Sintetizar, caracterizar, determinar la actividad citotóxica y el mecanismo de acción de las 5,6-dihidrobenzo[c]fenantridinas C(6)-funcionalizadas.

3.4 Objetivos Específicos

1. Colectar semillas de *Bocconia latisejala*.
2. Purificar dihidrosanguinarina (DHS) y dihidroqueleritrina (DHQ) a partir del extracto metanólico de las semillas.
3. Sintetizar *N*-metil-5,6-dihidrobenzo[c]fenantridina (DHB) y realizar reacciones de funcionalización del enlace C(sp^3)-H bencílico
4. Realizar modificaciones semisintéticas a dihidrosanguinarina (DHS) y dihidroqueleritrina (DHQ) mediante la funcionalización del enlace C(sp^3)-H bencílico.
5. Caracterizar las 5,6-dihidrobenzo[c]fenantridinas semisintéticas y sintéticas C(6)-funcionalizadas por técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

6. Evaluar la actividad citotóxica de las 5,6-dihidrobenzo[c]fenantridinas funcionalizadas frente a tres líneas celulares de cánceres humanos y una línea celular normal.
7. Determinar el mecanismo de acción de los compuestos más citotóxicos.

CAPITULO 4

PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Ubicación de los departamentos involucrados en este proyecto

La parte experimental de este proyecto fue realizada en diversas instituciones:

La obtención de los alcaloides naturales, la preparación de los derivados semisintéticos y la re-obtención de los compuestos sintéticos se realizaron en el Laboratorio de Química de Productos Naturales ubicado en la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.

La síntesis de la plataforma *N*-metil-5,6-dihidrobenzo[*c*]fenantridina y sus derivados se realizaron en el Laboratorio de Síntesis Orgánica 2-3 ubicado en el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

La determinación de la actividad citotóxica de los compuestos fue realizada en el Laboratorio de Ensayos Biológicos del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

La determinación del mecanismo de acción se realizó en el Instituto Nacional de Cancerología ubicado en la Ciudad de México

4.2 Materiales y Métodos

4.2.1 Aislamiento y purificación de compuestos por cromatografía

Para la realización de cromatografías en columna se utilizó gel de sílice (SiO_2 , marca EMD Chemicals Inc.) como fase estacionaria, con tamaño de partícula de 0.040-0.063 mm (230-400 mesh). Los disolventes utilizados fueron hexano (Hex), acetato de etilo (AcOEt), diclorometano (DCM), cloroformo (CHCl_3), metanol (MeOH) y acetona.

Para la realización de cromatografía en capa fina (CCF) preparativa se utilizaron cromatofolios marca Fluka analytical DC-Alufolien-Kieselgel de un grosor de 0.2 mm con indicador fluorescente $\text{UV}_{254\text{nm}}$. Como reveladores se usaron una lámpara de UV marca Spectroline (λ 254 y 365 nm), solución de

sulfato cérico amoniacal, solución de vainillina y solución de ácido fosfomolibdico.

Para eliminar disolvente de las muestras se utilizó el evaporador rotativo marca Yamato modelo BM500 y Polyscience modelo 9100.

4.2.2 Síntesis de *N*-metil-5,6-dihidrobenzo[*c*]fenantridinas C(6) funcionalizadas

Las reacciones de funcionalización de los compuestos **1**, **2** y **3** se llevaron a cabo en presencia de bromuro cuproso (CuBr) y 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ) o aire en acetonitrilo (CH₃CN) y/o tolueno. Los nucleófilos usados para la funcionalización de las *N*-metil-5,6-dihidrobenzo[*c*]fenantridinas naturales y sintéticas fueron: malonato de etilo, malonato de dimetilo, indol, 2-metilindol, pirrol, fosfito de dibutilo, fosfito de dietilo, nitrometano, nitroetano, nitropropano, acetofenona, acetoacetato de etilo, cianuro de trimetilsilano, ácido de Meldrum, fenilacetileno y el 4-(2-propin-1-iloxi)benzaldehído.

4.2.3. Síntesis de *N*-metil-5,6-dihidrobenzo[*c*]fenantridina.

Para la síntesis de *N*-metil-5,6-dihidrobenzo[*c*]fenantridina (**3**) se usaron: a) cianoborohidruro de sodio (NaBH_3CN), cloruro de indio(III) (InCl_3), 2-bromobenzaldehído y 1-naftilamina para la aminación reductiva; b) yodometano (CH_3I) e hidruro de sodio (NaH) en tetrahidrofurano (THF) para la metilación; c) acetato de paladio(II) ($\text{Pd}(\text{OAc})_2$), trifluoroborato de triciclohexilfosfina ($\text{PCy}_3 \cdot \text{HBF}_4$), carbonato de cesio (Cs_2CO_3) en dimetilacetamida (DMA) para la ciclación intramolecular de Heck.

4.2.4 Elucidación estructural de los compuestos obtenidos

Los puntos de fusión de los compuestos se determinaron en un aparato Fisher-Johns. Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H (RMN ^1H) de los compuestos se obtuvieron en los instrumentos Varian Unit (300 MHz) y Bruker AVANCE (300 MHz) usando cloroformo deuterado (CDCl_3) como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como estándar interno. Los desplazamientos químicos (δ) se reportaron en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) se reportaron en Hertz (Hz). La multiplicidad de señales fue descrita como singulete (s), doblete (d), triplete (t), cuarteto (q), multiplete (m), doblete de dobletes (dd), doblete de tripletes (dt). Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C (RMN ^{13}C) fueron obtenidos en un espectrómetro de RMN a 75

MHz usando CDCl_3 como disolvente (señal residual de CHCl_3 en 77.0 ppm); mientras que, los desplazamientos químicos (δ) se dan en ppm. Los espectros de Infrarrojo fueron obtenidos en un espectrofotómetro Bruker Tensor 27 y las absorciones son reportadas en número de onda (ν , cm^{-1}). Las Espectrometrías de Masas de baja y alta resolución (EMBR y EMAR) fueron realizadas en un espectrómetro JEOL JMS-AX505HA.

4.2.5 Determinación de la actividad citotóxica

4.2.5.1 Rastreo de actividad citotóxica de los compuestos

4.2.5.1.1 Preparación de la línea celular

Las líneas celulares que se utilizaron en este proyecto pertenecen al panel del NCI (National Cancer Institute), las cuales fueron adaptadas al medio de cultivo RPMI-1640 adicionado con suero fetal bovino (10%), una mezcla de antibióticos-antimicóticos al 10% y 2 mM de glutamina en cajas petri.

Las líneas celulares fueron adheridas a las cajas Petri para su crecimiento y después de 24-48 horas de incubación, se adicionó 1 mL de 0.05% de tripsina-EDTA para desprenderlas de las caja petri. Enseguida del desprendimiento de las células, se adicionaron de 5-10 mL de medio de cultivo para inactivar la tripsina. Las células en suspensión fueron depositadas en tubos cónicos y

centrifugadas por 3 minutos (min.) para obtener el paquete celular que sería resuspendido en medio de cultivo. A partir de esta suspensión, se tomó una alícuota y se agregó azul de tripano, para el conteo de la población de células viables y ajustar la densidad del inoculo. Determinando el número de células por mL (5000-10000, dependiendo de la línea celular), se hicieron los ajustes necesarios para depositar el inoculo en un volumen de 100 μ L/pozo a la densidad correspondiente a cada línea celular. Cada placa fue inoculada con la línea celular por triplicado y fue preincubada por 24 horas (hrs.) a 37 °C con una atmósfera de 5% de CO₂ y 100% de humedad relativa, para favorecer la estabilidad de éstos antes de adicionar las sustancias a probar.

4.2.5.1.2. Rastreo de Actividad citotóxica a 50 μ M.

Para un rastreo primario de actividad citotóxica de un compuesto puro, se probó la concentración más alta permitida (50 μ M). Todas las fueron solubilizadas en dimetilsulfóxido (DMSO) o agua 100 veces más concentradas que la concentración a probar. Después de la preparación de las muestras en solución y en el caso de realizar curvas concentración-respuesta (5 diluciones se prueban) se agregaron 100 μ L, siendo el volumen final del pozo de 200 μ L. Nuevamente la microplaca fue incubada por 48 hrs. bajo las condiciones antes mencionadas. Al finalizar el periodo de incubación de los compuestos con las células, éstas fueron precipitadas (o fijadas) *in situ* añadiendo 50 μ L de una solución de ácido tricloroacético (TCA) frío al 50% e incubadas a 4°C por 60

min. Se desechó el sobrenadante y las placas fueron lavadas 5 veces con agua desionizada y secadas al ambiente. El teñido de las células fijadas al sustrato del pozo se realizó con 100 µL de una solución al 0.4% de sulforrodamina B (SRB) y se incubó por 30 min. a temperatura ambiente. La SRB no unida se removi6 por 3 lavados con 1% de 1cido ac6tico y se dej6 secar al ambiente. A las placas teñidas se les agregaron 100 µL de un buffer de base tris y se agitaron por 10 min. para favorecer la disoluci6n del complejo; a continuaci6n se midi6 la densidad 6ptica (DO) en un lector de microplacas (Synergy/Biotek) a una longitud de onda de 515 nm. Los datos se procesaron obteniendo el promedio de la DO de los 3 pozos/l6nea tratados con el compuesto (DOt), los 3 pozos tratados con DMSO (DOc) y los 2 pozos testigos (aquellos que tienen compuesto y no tienen c6lulas, DOb). El porcentaje de inhibici6n del crecimiento (%IC) se calcul6 con la siguiente expresi6n:

$$\%IC = 100 - ((DOt - DOb) / (DOc - DOb)) * 100$$

4.3 Determinaci6n del mecanismo de acci6n

4.3.1 Apoptosis

El mecanismo de acci6n de los compuestos m1s promisorios se determin6 mediante la detecci6n de apoptosis usando el ensayo de Anexina V en las c6lulas de carcinoma prost1tico (PC-3).

Las células fueron cultivadas en el medio DMEM-F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino. Posteriormente, las células fueron colectadas y centrifugadas por 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se descartó y las células fueron resuspendidas a una concentración de 1×10^6 células/mL en medio de cultivo, se sembraron 1.5×10^6 células en cada caja de 75 mL y se incubaron por 24 horas. Posteriormente, se preparó una solución stock del compuesto a evaluar a 10 mM en DMSO y se diluyó en 10 mL de medio de cultivo a una concentración final de 5 μ M. A las muestras no tratadas se les adicionaron una concentración equivalente de DMSO para usarse como control. Las células se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ en aire por 48 horas. Después, se colectó el medio de las cajas en un tubo cónico se agregaron 5 mL de la solución de tripsina y se incubó por 5 minutos. La solución de tripsina se recuperó y se reunió con el medio colectado anteriormente. Las células se centrifugaron por 5 min. y se descartó el sobrenadante. El pellet obtenido de células fue resuspendido en 250 μ L de búfer (proveniente del kit de Anexina), se tomaron 100 μ L del stock y se transfirieron a un tubo para citometria de flujo. Se agregaron 3 μ L de FITC-Anexina y 3 μ L de yoduro de propidio y las muestras se agitaron gentilmente y se incubaron por 15 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Finalmente se agregaron 400 μ L del búfer (proveniente del kit de Anexina) y los tubos se mantuvieron en hielo hasta la lectura de las muestras en el citómetro de flujo. Las muestras deben de ser leídas antes de cumplir 1 hora de estar en contacto con los fluoróforos.

4.3.2 Inhibición de la topoisomerasa I

La determinación de inhibición de topoisomerasa I se realizó de acuerdo con lo reportado por Nguyen y cols. [85]. Aproximadamente 2 nM sustrato de ADN radiomarcado se incubó con Top1 recombinante en 20 μ L de tampón de reacción a temperatura ambiente durante 20 min en presencia de varias concentraciones de compuestos. Las reacciones se terminaron mediante la adición de dodecil sulfato de sodio (SDS, por sus siglas en inglés) a una concentración final del 0.5%, seguido de la adición de dos volúmenes de colorante de carga [80% de formamida, hidróxido de sodio 10 mM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, por sus siglas en inglés) 1 mM, 0.1% cianol de xileno, y 0.1% de azul de bromofenol]. Las alícuotas de cada mezcla de reacción se sometieron a una electroforesis en gel de poliacrilamida (EGPA) desnaturalizante 20%. Los geles se secaron y se visualizaron usando un PhosphorImager y software ImageQuant.

4.4 Disposición de residuos

La disposición de residuos de la parte fitoquímica y semisintética del proyecto se realizó de acuerdo a las normas establecidas por el departamento de manejo y control de residuos de la Facultad de Ciencias Químicas-UANL.

La disposición de los residuos de la parte sintética y de la actividad citotóxica del proyecto se realizó en base a las normas establecidas por el departamento de manejo y control de residuos del Instituto de Química-UNAM.

La disposición de los residuos generados para la determinación del mecanismo de acción de los compuestos obtenidos en el proyecto se realizó en base a las normas establecidas por el departamento de manejo y control de residuos del Instituto Nacional de Cancerología y del National Cancer Institute.

4.5 Obtención de los alcaloides dihidrobenzo[c]fenantridínicos

4.5.1 Material vegetal

Las semillas usadas para el aislamiento de los alcaloides naturales se obtuvieron a partir de la especie *B. latispala*, la cual es nativa del estado de Nuevo León.

4.5.2 Colecta de semillas de *B. latispala*

Las semillas de *B. latispala* fueron colectadas en los municipios de San Pedro Garza García y Monterrey, localizados en el estado de Nuevo León. La primera

y tercera colecta se realizó el 4 de Agosto de 2013 y el 9 de Agosto de 2015 en San Pedro Garza García. La especie fue localizada en una zona pedrera ubicada en la zona montañosa de San Pedro a una altitud de 1500 msnm. La segunda colecta se realizó el 17 de Agosto de 2013 en Monterrey (La Estanzuela) a la orilla del río en una zona pedrera. Un ejemplar de la planta fue identificado por la Dra. Marcela González Álvarez y se encuentra depositado en el Herbario UNL de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León con números de folio 26666, 26667 y 26668. Se obtuvieron 1.7 Kg de semillas durante la colecta de 2013 y 1.2 Kg de semillas durante la colecta de 2015.

4.5.3 Preparación del extracto metanólico a partir de las semillas de *Bocconia latisepala*.

El extracto orgánico se obtuvo a partir de 1.7 Kg y 1.2 Kg de semillas. Para ello, las semillas fueron molidas con una licuadora hasta la obtención de un polvo, el cual se sometió a maceración con 4 L de metanol por 48 hrs. Posteriormente, el macerado se filtró y la fracción soluble en metanol se concentró en un evaporador rotativo a una temperatura de baño de 40° C. La materia orgánica se recuperó y se dejó reposar con metanol por 48 horas repitiéndose la operación anterior dos veces. Después de haber reunido las cuatro extracciones y de concentrar la mezcla hasta un volumen de 30 mL, se dejó

evaporar el disolvente a temperatura ambiente para la obtención del extracto metanólico seco. Durante la fase de evaporación precipitaron sólidos insolubles en MeOH 8 g en la primera colecta y 30 g de la segunda colecta los cuales fueron solubles en CHCl_3 . La presencia de los alcaloides dihidrobenzo[*c*]fenantridínicos de interés (**1** y **2**) fue confirmada, mediante cromatografía de capa delgada (CCD), en los sólidos insolubles en metanol, pero no en el extracto metanólico. Por lo anterior, se trabajó con los sólidos insolubles.

4.5.4 Aislamiento y purificación de los alcaloides naturales a partir de *B. latisepala*

A partir de los sólidos insolubles, se realizó una cromatografía en columna de vidrio de 60 x 8 cm. La columna fue empacada con gel de sílice y eluída con Hexano/ CHCl_3 en gradiente de polaridad. El gel de sílice fue preparado con Hexano 100% y se inició la elución de la columna con Hexano/ CHCl_3 (4:1).

Durante el fraccionamiento se purificaron 2 alcaloides benzo[*c*]fenantridínicos, los cuales fueron identificados por sus datos espectroscópicos como

dihidrosanguinarina (DHS **1**, 1.1 g, 0.03%) y dihidroqueleritrina (DHQ **2**, 1.5 g, 0.05%) (Figura 14).

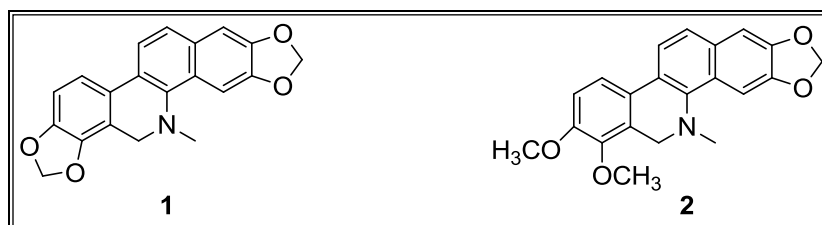
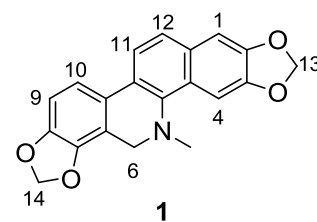


Figura 14. Alcaloides dihidrobenzo[c]fenantridínicos obtenidos a partir de *B. latisejala*

4.5.4.1 Datos espectroscópicos de los alcaloides naturales

Dihidrosanguinarina (**1**, DHS)

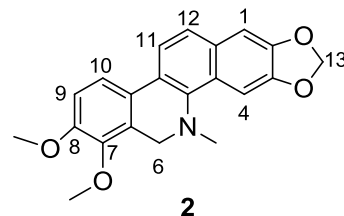
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.69 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H-12), 7.67 (s, 1H, H-4), 7.48 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-11), 7.30 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-10), 7.11 (s, 1H, H-1), 6.86 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-9), 6.05 (s, 2H, OCH₂O), 6.04 (s, 2H, OCH₂O), 4.20 (s, 2H, H₂-6), 2.62 (s, 3H, CH₃-N). **RMN ¹³C** (75



MHz, CDCl₃), δ (ppm): 148.10 (C8), 147.47 (C2), 147.05 (C3), 144.58 (C7), 142.46 (C5a), 130.75 (C12a), 127.21 (C4a), 124.3 (C10a,C11a), 123.90 (C12), 120.31 (C11), 116.16 (C10), 113.5 (C6a), 107.15 (C9), 104.30 (C1), 101.29 (C14), 101.01 (C13), 100.70 (C4), 48.41(C5), 41.54 (C6).

Dihidroqueleritrina (2, DHQ).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.71 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-12), 7.68 (s, 1H, H-4), 7.52 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-11), 7.48 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H-10), 7.11 (s, 1H, H-1), 6.95 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-9), 6.05 (s, 2H, OCH₂O), 4.29 (s, 2H, H₂-6), 3.93 (s, 3H, OCH₃), 3.87 (s, 3H, O-CH₃) 2.59 (s, 3H, N-CH₃). **RMN ¹³C** (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 152.2 (C8), 148.0 (C2), 147.4 (C3), 142.0 (C7a), 130.8 (C5a), 126.3 (C12a), 126.2 (C4a), 126.2 (C6a) 124.22 (C10a, C11a), 123.74 (C12), 120.08 (C11), 118.7 (C10), 110.90 (C9), 104.328 (C4), 101.0 (C13), 100.69 (C1), 61.09 (CH₃O-C7), 55.79 (CH₃O-C8), 48.7 (C6), 41.20 (C5).



4.6 Procedimiento para la obtención de los derivados de dihidrosanguinarina

En un vial de vidrio de 8 mL se adicionaron DHS (15 mg, 0.045 mmol), CuBr (0.29 mg, 0.0022 mmol), nucleófilo (0.135 mmol) y 0.5 mL de CH₃CN, dejándose la mezcla de reacción en agitación constante a temperatura ambiente por 5 horas. Posteriormente, la mezcla de reacción se diluyó con AcOEt y se filtró a través de celita. Las fase orgánica fue concentrada en un evaporador rotativo, dando un residuo café oscuro que fue fraccionado por cromatografía en columna relámpago con Hexano:AcOEt (8:2 v/v) hasta la obtención del derivado correspondiente.

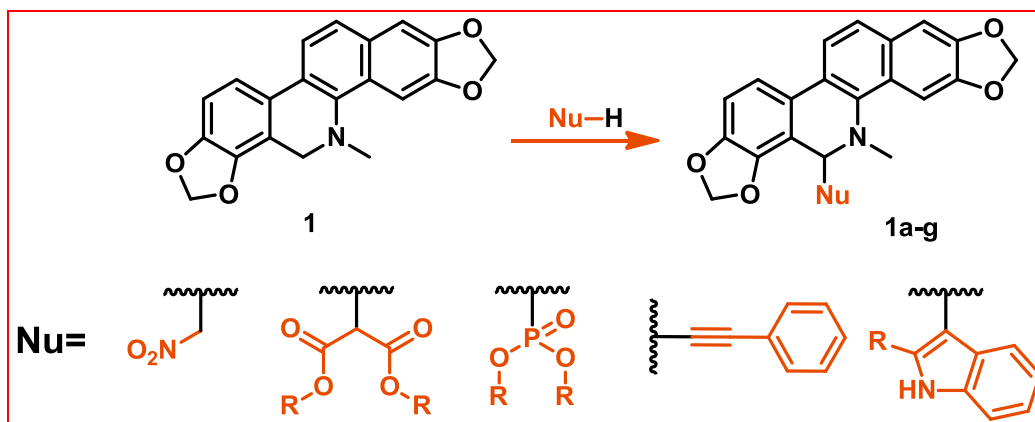


Figura 15. Esquema de reacción de ACD entre DHS y diversos nucleófilos

4.6.1 Datos espectroscópicos de los derivados de DHS.

6-(Dimetilmalonil)-5,6-dihidrosanguinarina (**1a**). Este compuesto fue obtenido

como un sólido blanco que funde a 228° C. **RMN ¹H** (300

MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.70 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-11),

7.49 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-12), 7.40 (s, 1H, H-4), 7.34 (d,

J = 8.1 Hz, 1H, H-10), 7.10 (s, 1H, H-1), 6.89 (d, *J* = 8.1

Hz, 1H, H-9), 6.05 (s. a. 1H, OCH₂O-14), 6.03 (s. a., 2H, OCH₂O-13), 6.02 (s. a.,

1H, OCH₂O-14), 5.08 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H, H-6), 3.68 (s, 3H, H₃-5'), 3.58 (s, 3H,

H₃-4'), 3.44 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, H-2'), 2.66 (s, 3H, N-CH₃). **RMN ¹³C** (75 MHz,

CDCl₃), δ (ppm): 168.0 (C3'), 167.1 (C1'), 148.2 (C8), 147.7 (C2), 147.2 (C3),

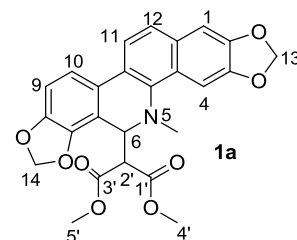
145.4 (C7), 138.5 (C5a), 131.1 (12a), 127.3 (C4a), 126.1 (C10a), 124.3 (C11a),

123.4 (C12), 120.1 (C11), 117.1 (C10), 112.5 (C6a), 108.4 (C9), 104.5 (C1),

101.6 (C14), 101.1 (C13), 100.6 (C4), 57.4 (C6), 55.2 (C2'), 52.5 (C4'), 52.4

(C5'), 42.5 (C-N5). **EMAR (ESI), [M+1]⁺** calculado para C₂₅H₂₂NO₈: 464.13584,

observado: 464.13628.



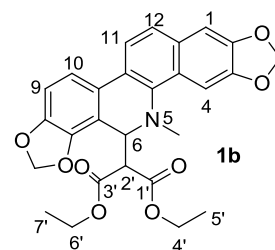
6-(Dietilmalonil)-5,6-dihidrosanguinarina (**1b**). Este compuesto fue obtenido

como una película amarilla. **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃), δ

(ppm): 7.71 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-12), 7.49 (d, *J* = 8.1 Hz,

1H, H-11), 7.42 (s, 1H, H-4), 7.34 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-

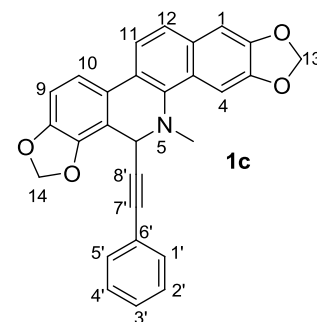
10), 7.10 (s, 1H, H-1), 6.89 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-9), 6.03



(s. a., 2H, OCH₂O-13), 6.03 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, OCH₂O-14), 6.01 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, OCH₂O-14), 5.10 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H, H-6), 4.18 (m, $J = 7.2, 4.5$ Hz, 2H, H₂-6'), 4.0 (m, $J = 7.2$ Hz, 2H, H₂-4'), 3.40 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H, H-2'), 2.66 (s, 3H, CH₃-N), 1.13 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, H₃-7'), 1.07 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, H₃-5'). **RMN ¹³C** (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 167.6 (C3'), 167.2 (C1'), 148.6 (C8), 147.6 (C2), 146.8 (C3), 145.3 (C7), 138.3 (C5a), 130.8 (C12a), 127.1 (C10a), 126.3 (C4a), 124.1 (C12), 123.50 (C11a), 120.4 (C11), 117.0 (C10), 112.6 (C6a), 108.1 (C9), 104.4 (C1), 101.5 (C14), 101.1 (C13), 100.8 (C4), 61.4 (C4'), 61.36 (C6'), 57.3 (C6), 55.4 (C2'), 42.0 (C-N5), 14.1 (C5'). 13.9 (C7'). **EMAR (ESI), [M+1]⁺** calculado para C₂₇H₂₆NO₈: 492.16584, observado: 492.16682.

6-(2'-Feniletinil)-5,6-dihidrosanguinarina (**1c**). Este compuesto fue obtenido como un sólido color rosa tenue que funde a 205 °C.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.77 (s, 1H, H-4), 7.73 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-11), 7.51 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, H-12), 7.35 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-10), 7.17 – 7.12 (m, 5H, H₅-1'-5'), 7.11 (s, 1H, H-1), 6.90 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-9),



6.12 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, OCH₂O-14), 6.07 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, OCH₂O-14), 6.05 (s.a., 2H, OCH₂O-13), 5.36 (s, 1H, H-6), 2.67 (s, 3H, CH₃-N). **RMN ¹³C** (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 148.2 (C8), 147.7 (C2), 147.5 (C3), 144.6 (C7), 140.6 (C5a), 131.9 (C1', C5'), 131.0 (C12a), 127.9 (C4', C3', C2'), 127.4 (C4a), 126.0 (C10a),

124.4 (C12), 123.8 (C11a), 123.0 (C6'), 120.3 (C11), 116.9 (C10), 113.6 (C6a), 108.0 (C9), 104.3 (C1), 102.13 (C8'), 101.8 (C14), 101.1 (C13), 101.0 (C4), 87.7 (C7'), 49.6 (C-6), 41.3 (C-N5). **EMAR (ESI), [M+1]⁺** calculado para C₂₈H₂₀NO₄: 434.13923, observado: 434.13958.

6-(Dietilfosfonil)-5,6-dihidrosanguinarina (**1d**). Este compuesto fue obtenido

como un sólido beige que funde a 175-177 °C. **RMN ¹H**

(300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.71 (s, 1H, H-4), 7.65 (d, *J*

= 8.7 Hz, 1H, H-12), 7.45 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-11), 7.31

(d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-10), 7.08 (s, 1H, H-1), 6.88 (d, *J* =

8.1 Hz, 1H, H-9), 6.10 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, OCH₂O-14), 6.06 (s, 3H, OCH₂O-13,

OCH₂O-14), 4.76 (d, *J* = 24.3 Hz, 1H, CH-P), 4.13– 3.91 (m, 2H, OCH₂-6'), 3.84–

3.50 (m, 2H, OCH₂-3'), 2.77 (s, 3H, CH₃-N), 0.99 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, H₃-7'), 0.95

(t, *J* = 7.2 Hz, 3H, H₃-4'). **RMN ¹³C** (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 149.65 (C8),

148.3 (C2), 147.7 (C3), 147.4 (C7), 140.6 (C5a), 131.0 (C12a), 126.8 (C4a),

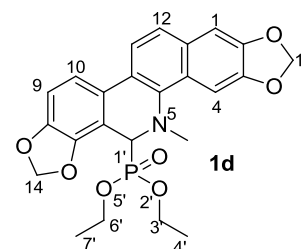
126.8 (C10a), 126.72 (C11a), 124.2 (C12), 120.0 (C11), 116.5 (C10), 108.3

(C9), 104.4 (C1), 101.7 (C14), 101.1 (C13), 100.8 (C4), 62.7 (d, *J* = 7.5 Hz, C6'),

62.5 (d, *J* = 7.5 Hz, C3'), 57.1 (d, *J* = 166.5 Hz, C6), 44.7 (d, *J* = 20.3 Hz, C-N5),

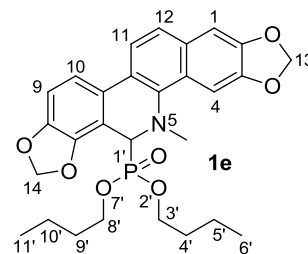
16.2 (d, *J* = 6.8 Hz, C4', C7'). **EMAR (ESI), [M+1]⁺** calculado para C₂₄H₂₅NO₇P:

470.13686, observado: 470.13644.



6-(Dibutilfosfonil)-5,6-dihidrosanguinarina (**1e**). Este compuesto fue obtenido como un sólido gris claro que funde a 80-81°C. **RMN ¹H**

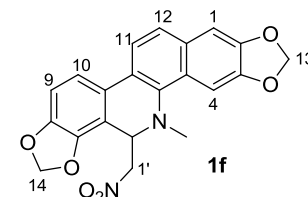
(300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.7 (s, 1H, H-4) 7.65 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-12), 7.45 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-11), 7.32 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-10), 7.08 (s, 1H, H-1), 6.87 (d, *J* = 7.8



Hz, 1H, H-9), 6.09 (s. a., 1H, OCH₂O-14), 6.04 (s. a., 3H, OCH₂O-13, OCH₂O-14), 4.75 (d, *J* = 24.6 Hz, 1H, CH-P), 3.80 – 3.67 (m, 3H, OCH₂-3' OCH-8'), 3.52-3.47 (m, 1H, OCH-8'), 2.76 (s, 3H, N-CH₃), 1.31-1.22 (m, 4H, H₂-9', H₂-4'), 1.14-1.04 (m, 4H, H₂-5', H₂-10'), 0.76 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, H₃-11'), 0.75 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, H₃-6'). **RMN ¹³C** (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 148.2 (C8), 147.6 (C2), 147.4 (C3), 145.7 (C7), 140.6 (C5a), 131.1 (C12a), 126.8 (C4a), 126.7 (C10a), 126.7 (11a), 124.1 (C12), 120.0 (C11), 116.3 (C10), 110.2 (C6a), 108.2 (C9), 104.3 (C1), 101.8 (C14), 101.2 (C13), 100.9 (C4), 66.2 (d, *J* = 7.5 Hz, C8'), 65.6 (d, *J* = 6.0 Hz, C3'), 57.1 (d, *J* = 166.5 Hz, C6), 44.7 (d, *J* = 20.3 Hz, C-N5), 32.4 (d, *J* = 6.0 Hz, C9', C4') 18.8 (C5'), 18.5 (d, *J* = 7.5 Hz, C10'), 13.6 (C6', C11'). **EMAR (ESI), [M+1]⁺** calculado para C₂₈H₃₃NO₇P: 526.19946, observado: 526.20070.

6-(Nitrometil)-5,6-dihidrosanguinarina (**1f**). Este compuesto fue obtenido como un sólido blanco con un punto de fusión de 238-240 °C.

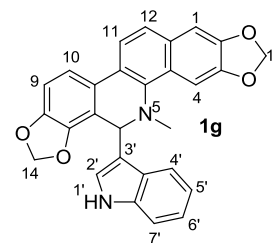
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.67 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-12), 7.52 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-11), 7.50 (s, 1H, H-



4), 7.38 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-10), 7.10 (s, 1H, H-1), 6.92 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-9), 6.10 (s, 1H, OCH₂O-14), 6.09 (s, 1H, OCH₂O-14) 6.06 (s. a., 2H, OCH₂O-13), 5.17 (dd, $J = 10.8, 4.5$ Hz, 1H, H-6), 4.32 (dd, 12.0, 4.5 Hz, 2H, H-1a'), 4.25 (dd, $J = 11.4, 11.1$ Hz, H-1b') 2.69 (s, 3H, N-CH₃). **RMN ¹³C** (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 148.5 (C8), 148.1 (C2), 147.3 (C3), 145.3 (C7), 138.0 (C5a), 131.4 (C12a), 127.3 (C4a), 126.2 (C10a), 124.7 (C12), 122.6 (C11a), 119.8 (C11), 116.8 (10), 110.9 (C6a), 108.9 (C9), 104.3 (C1), 102.0 (C14), 101.3 (C13), 100.9 (C4), 75.8(C1'), 56.1(C6), 43.2 (C-N5). **EMAR (ESI), [M+1]⁺** calculado para C₂₁H₁₇N₂O₆: 393.10866, observado: 393.10856

6-(indolil)-5,6-dihidrosanguinarina (**1g**). Este compuesto fue obtenido como un polvo rojo que funde a 210-211°C. **RMN ¹H** (300 MHz,

CDCl₃), δ (ppm): 8.08 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-4'), 7.67 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-11), 7.66 (s, 1H, H-4), 7.60 (sa, 1H, NH), 7.38 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-7')



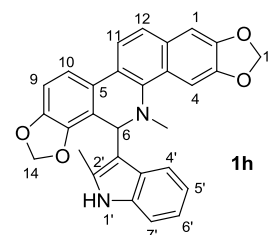
7.35 (d, $J = 8.7$, 1H, H-12), 7.19 – 7.07 (m, 3H, H-5', H-6', H-10), 6.98 (s, 1H, H-1), 6.92 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-9), 6.34 (s.a, 1H, H-2'), 6.04 (s, 1H, OCH₂O-13), 6.03 (s, 1H, OCH₂O-13), 5.99 (s.a., 1H, H-6), 5.94 (s.a., 1H, OCH₂O-14), 5.79 (s, 1H, OCH₂O-14), 2.84 (s, 3H, CH₃-N). **RMN ¹³C** (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 148.0 (C8), 147.4 (C2), 147.1 (C3), 145.0 (C5a), 136.6 (7'a), 131.0 (C12a), 127.6 (C4a), 127.0 (C10a), 126.8 (C11a), 123.6 (C12), 122.9 (C2'), 121.9 (C6'), 120.2 (C11), 120.1 (C3'a), 120.0 (C5'), 119.5 (C4'), 116.6 (C7'), 115.9 (C3'), 111.0 (C10), 107.6 (C9), 104.2

(C1), 101.5 (C14), 101.2 (C13), 100.9 (C4), 54.4 (C6), 42.8 (C-N5). **EMAR (ESI), [M+1]⁺** calculado para C₃₀H₂₀NO₄: 449.14369, observado: 449.14309.

6-(2'-metil-indolil)-5,6-dihidrosanguinarina (**1h**). Este compuesto fue obtenido

como un polvo rojo. **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

8.09 (s.a, 1H, NH), 7.66 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-4'), 7.51 (s, 1H, H-4), 7.37 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-11), 7.31 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-12), 7.23-7.20 (m, 1H, H-7'), 7.04 – 7.01 (m, 1H, H-



6'), 6.93-6.87 (m, 3H, H-9, H-10, H-5'), 6.91 (s, 1H, H-1), 5.95 (s. a., 1H, H-6), 5.92 (s.a, 2H, OCH₂O-13), 5.87 (s.a., 1H, OCH₂O-14), 5.72 (s, 1H, OCH₂O-14), 2.82 (s, 3H, CH₃-N), 1.93 (s, 3H, H₃-C2'). **RMN ¹³C** (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

147.8 (C8), 147.3 (C2), 147.3 (C3), 145.4 (C7), 141.8 (C5a), 134.7 (C7'a), 132.8 (C12a), 130.8 (C2') 128.8 (C3'a), 127.8 (C4a), 127.8 (C11a), 124.5 (C10a), 123.7 (C12), 120.3 (C6'), 120.1 (C10), 119.1 (C11), 119.0 (C5'), 116.14 (C4'), 115.8 (C6a), 110.0 (C7'), 110.0 (C3'), 107.7 (C9), 104.1 (C1), 101.5 (C14), 101.1 (C13), 100.9 (C4), 54.7 (C6), 42.7 (C-N5), 12.3 (CH₃-C2'). **EMAR (ESI), [M+1]⁺** calculado para C₃₀H₂₀NO₄: 463.16578, observado: 463.16654.

4.7 Procedimiento para la obtención de los derivados de DHQ.

En un vial de vidrio de 8 mL se agregó DHQ (15 mg, 0.0429 mmol), CuBr (0.30 mg, 0.00214 mmol), nucleófilo (0.129 mmol), *t*-BuOOH (3.87 mg, 0.0429 mmol) y 0.2 mL de CH₃CN, dejándose en agitación a temperatura ambiente por 5 horas. Posteriormente, la mezcla de reacción se filtró a través de celita y se diluyó con AcOEt. La fase orgánica recolectada fue concentrada en un evaporador rotativo dando un residuo café oscuro que fue purificado por cromatografía en columna relámpago (Hexano:AcOEt, 7:3) hasta la obtención del derivado correspondiente.

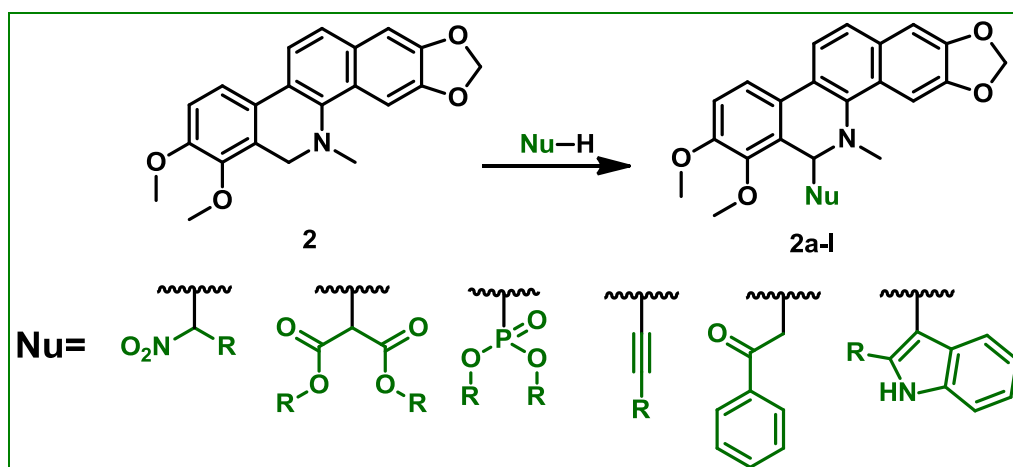
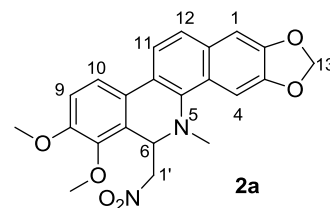


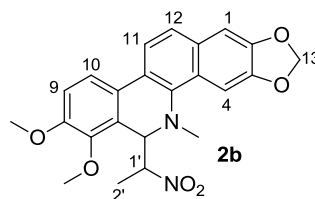
Figura 16. Reacción de ACD entre DHQ y diversos nucleófilos

4.7.1 Datos espectroscópicos de los derivados de DHQ.

6-(Nitrometil)-5,6-dihidroqueleritrina (**2a**). Este derivado se obtuvo como un sólido blanco que funde entre 196-197°C. **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.70 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-11), 7.60 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-12), 7.53 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-10), 7.52 (s, 1H, H-4), 7.12 (s, 1H, H-1), 7.05 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-9), 6.07 (s, 2H, OCH₂O), 5.35 (dd, *J* = 11.1, 4.2 Hz, 1H, H-6), 4.30 (dd, *J* = 11.7, 4.2 Hz, 1H, CH-NO₂), 4.16 (dd, *J* = 11.7, 11.1 Hz, 1H, CH-NO₂), 4.04 (s, 3H, CH₃O-C8), 3.96 (s, 3H, CH₃O-C7), 2.70 (s, 3H, CH₃-N). **RMN ¹³C** (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 151.9 (C8), 148.3 (C2), 147.9 (C3), 146.0 (C7), 138.0 (C5a), 131.2 (C7a, C12a), 127.3 (C4a), 125.2 (C6a), 124.4 (C12), 122.9 (C10a), 122.3 (C11a), 119.4 (C11), 118.8 (C10), 112.6 (C9), 104.2 (C4), 101.1 (C13), 100.7 (C1), 76.0 (C1'), 61.1 (CH₃O-C8), 56.6 (CH₃O-C7), 55.8 (C6), 42.8 (C-N5). **EMAR (ESI), [M+1]⁺** calculado para C₂₂H₂₁N₂O₆: 409.13996, observado 409.14060.



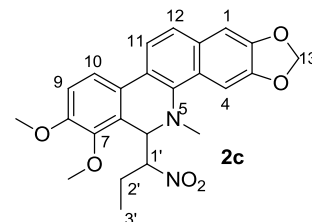
6-(1'-Nitroetil)-5,6-dihidroqueleritrina (**2b**). Este derivado se obtuvo como un sólido beige que funde a 193-195 °C. Isómero mayoritario **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.70 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-12), 7.57 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H-11), 7.56 (s, 1H, H-4), 7.48 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-10), 7.10 (s, 1H, H-1), 7.02 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-9), 6.06 (s, 2H, OCH₂O), 5.10 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H, H-6), 4.53 (q, *J*



= 6.9 Hz, 1H, CH-1'), 3.96 (s, 3H, CH₃O-C8), 3.93 (s, 3H, CH₃O-C7), 2.7 (s, 3H, CH₃-N), 1.19 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH₃-2'). **RMN ¹³C** (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 151.9 (C8), 148.4 (C2), 147.9 (C3), 146.6 (C7), 139.6 (C7a), 131.3 (C5a), 126.4 (C12a), 125.2 (C4a), 124.2 (C12), 123.8 (C6a), 123.4 (C10a), 119.6 (C11), 119.4 (C11a), 118.8 (C10), 112.8 (C9), 104.4 (C4), 101.1 (C13), 100.6 (C1), 85.7 (C1'), 61.0 (CH₃O-C8), 60.8 (CH₃O-C7), 55.8 (C6), 44.1 (C-N5), 14.2 (C2'). **EMAR (ESI), [M+1]⁺** calculado para C₂₃H₂₃N₂O₆: 423.15561, observado: 423.15618.

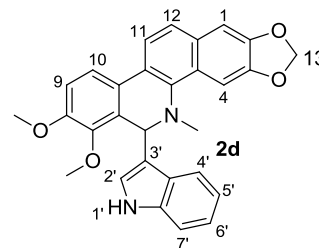
6-(1'-Nitropropil)-5,6-dihidroqueleritrina (**2c**). Este derivado se obtuvo como una resina transparente. **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

7.69 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-12), 7.56 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H-11), 7.50 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-10), 7.44 (s, 1H, H-4), 7.09 (s, 1H, H-1), 7.03 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-9), 6.04 (s. a., 2H,

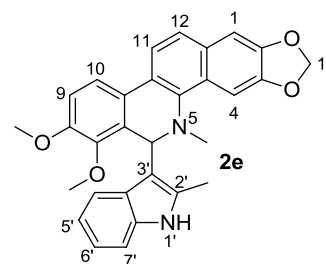


OCH₂O-13), 5.01 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H, H-6), 4.19 – 4.08 (td, 11.1, 3.0, H-1'), 3.97 (s, 3H, CH₃O-C8), 3.94 (s, 3H, CH₃O-C7), 2.58 (s, 3H, CH₃-N), 2.21 – 2.1 (m, 2H, H₂-2'), 0.69 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, H₃-3'). **RMN ¹³C** (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 148.8 (C8), 148.4 (C2), 147.9 (C3), 144.9 (C7), 138.8 (C7a), 131.1 (C5a), 127.3 (C12a), 126.6 (C4a), 124.4 (C12), 123.9 (C6a), 122.5 (C10a), 120.0 (C11a), 119.5 (C11), 119.4 (C10), 112.9 (C9), 104.2 (C4), 101.4 (C13), 100.8 (C1), 91.7 (C1'), 61.0 (OCH₃-C8), 60.4 (OCH₃-C7), 56.2 (C6), 42.7 (C-N5), 23.5 (C2'), 10.0 (C3'). **EMAR (ESI), [M+1]⁺** calculado para C₂₄H₂₅N₂O₆: 437.17126, encontrado: 437.17149.

6-(3'-Indolil)-5,6-dihidroqueleritrina (**2d**). Este compuesto se obtuvo como un sólido blanco que funde a 205-207 °C. **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8.16 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-4'), 7.78 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-10), 7.68 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-12), 7.65 (s, 1H, H-4), 7.60 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-11), 7.54 (s.a., 1H, NH), 7.45 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-7'), 7.39 (s, 1H, H-2'), 7.17-7.11 (m, 2H, H-5', H-6'), 7.13 (s, 1H, H-1), 7.02 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-9), 6.32 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, H-2'), 6.24 (s. a., 1H, H-6), 5.97 (s.a., 2H, OCH₂O-13), 3.96 (s, 3H, CH₃O-C8), 3.77 (s, 3H, CH₃O-C7), 2.87 (s, 3H, CH₃-N). **RMN ¹³C** (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 153.28 (C8), 151.5 (C2), 142.9 (C3), 139.4 (C7), 136.6 (C7'a), 130.9 (C5a), 127.5 (3'a), 126.1 (C12a), 126.0 (C4a), 125.8 (C6a), 124.1 (C10a), 123.8 (C11a), 123.4 (C12), 123.0 (C2'), 121.7 (C6'), 120.6 (C11), 119.7 (C5'), 119.3 (C4'), 119.1 (C10), 113.5 (C3'), 111.4 (C7'), 110.9 (C9), 104.1 (C1), 101.3 (C14), 101.0 (C13), 100.8 (C4), 61.4 (C6), 56.2 (CH₃O-C8), 53.9 (CH₃O-C7), 42.6 (C-N5). **EMAR (ESI), [M+1]⁺** calculado para C₂₉H₂₄N₂O₄: 434.17361, observado: 464.17309.



6-(2'-Metil-3'-indolil)-5,6-dihidroqueleritrina (**2e**). Este compuesto se obtuvo como un sólido rojo que funde a 227-228 °C. **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.69 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-11), 7.61 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-12), 7.56 (s, 1H, H-4), 7.41 (s.a., 1H, NH), 7.34 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-10), 7.32 (dd, *J* = 9.0, 4.2 Hz, 1H, H-4'), 7.07 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-9), 7.02 (m, 1H, H-7'),

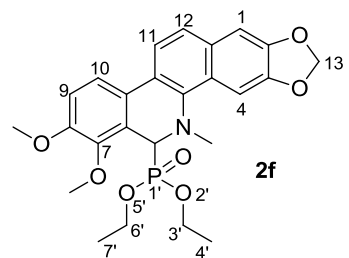


6.94 (s, 1H, H-1), 6.95 – 6.92 (m, 2H, H-5', H-6'), 6.00 (s.a., 1H, OCH₂O), 5.94 (s. a., 1H, OCH₂O), 5.89 (s, 1H, H-6), 3.95 (s, 3H, CH₃O-C8), 3.65 (s, 3H, CH₃O-C7), 2.83 (s, 3H, CH₃-N), 1.89 (s, 3H, H₃-2'). **RMN ¹³C** (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 152.4 (C8), 147.7 (C2), 147.2 (C3), 146.8 (C7), 141.9 (C7'a), 134.6 (C5a), 132.4 (C2'a), 130.9 (C3'a), 129.0(C12a), 128.2 (C4a), 127.7(6a), 127.0 (10a), 124.3 (11a), 123.4 (C12), 120.3 (C6'), 119.8 (C11), 119.3 (C5'), 119.0 (C4'), 118.5 (C10), 111.5 (C7'), 111.3 (C3'), 109.6 (C9), 103.9 (C4), 101.1 (C13), 100.6 (C1), 60.7 (OCH₃-C8), 55.7 (OCH₃-C7), 54.7 (C6), 42.4 (C-N5), 12.5 (C2'). **EMAR (ESI), [M+1]⁺** calculado para C₃₀H₂₇N₂O₄: 479.19708, observado: 434.19736.

6-(Dietilfosfonil)-5,6-dihidroqueleritrina (**2f**). Este compuesto se obtuvo como un

sólido blanco que funde a 177-178 °C. **RMN ¹H** (300

MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.70 (s, 1H, H-4), 7.68 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-12), 7.47 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-11), 7.45 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-10), 7.08 (s, 1H, H-1), 6.97



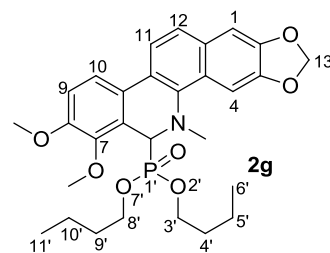
(d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-9), 6.05 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, OCH₂O), 6.04 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, OCH₂O), 5.09 (d, *J* = 24.9 Hz, 1H, CH-P), 4.01 (s, 3H, CH₃O-C8), 3.92 (s, 3H, CH₃O-C7), 3.87 – 3.38 (m, 4H, H₂-3', H₂-6'), 2.72 (s, 3H, CH₃N), 0.97 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, H₃-7'), 0.93 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, H₃-4'). **RMN ¹³C** (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 153.9 (C8), 147.9 (C2), 147.5 (C3), 140.8 (C7a), 131.2 (C5a), 126.9 (C12a), 126.7 (C4a), 125.9 (C6a), 125.5 (C10a), 124.1 (12), 122.0 (C11a), 119.6 (C11), 118.9 (C10), 112.6 (C9), 104.4 (C4), 101.1 (C13), 101.0 (C1), 62.4 (d, *J* =

6.8 Hz, C6'), 62.3 (d, $J = 6.8$ Hz, C3'), 60.9 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{O-C8}$), 56.8 (d, $J = 165$ Hz, C6), 55.7 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{O-C7}$), 44.0 (d, $J = 20.3$ Hz, C-N5), 16.2 (d, $J = 3.0$ Hz, C7', C4').

EMAR (ESI), $[\text{M}+1]^+$ calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{NO}_7\text{P}$ 486.16816, observado: 486.16795.

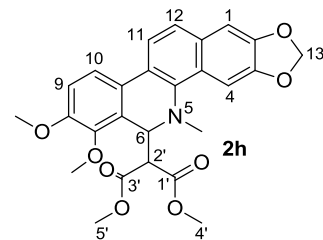
6-(Dibutilfosfonil)-5,6-dihidroqueleritrina (**2g**). Este derivado fue obtenido como un sólido beige que funde a 84-85 °C. **RMN ^1H** (300

MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7.69 (s, 1H, H-4), 7.67 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-12), 7.49 (d $J = 8.4$ Hz, 1H, H-10), 7.44 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-11) 7.08 (s, 1H, H-1), 6.97 (d, $J =$

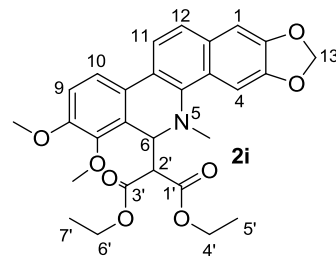


8.4 Hz, 1H, H-9), 6.03 (s. a., 2H, OCH_2O), 5.10 (d, $J = 25.2$ Hz, 1H, H-6), 4.01 (s, 3H, $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{O-C8}$), 3.92 (s, 3H, $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{O-C7}$), 3.83 – 3.77 (m, 1H, H-8'), 3.71 – 3.66 (m, 1H, H-8'), 3.60 – 3.51 (m, 2H, $\text{H}_2\text{-3}'$), 2.71 (s, 3H, $\text{H}_3\text{-N}$), 1.32 – 1.24 (m, 2H, $\text{H}_2\text{-9}'$), 1.19-1.13 (m, 4H, $\text{H}_2\text{-4}'$, $\text{H}_2\text{-5}'$), 1.1-0.96 (m, 2H, $\text{H}_2\text{-10}'$), 0.78 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, $\text{H}_3\text{-11}'$), 0.70 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, $\text{H}_3\text{-6}'$). **RMN ^{13}C** (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 152.3 (C8), 148.2 (C2), 147.7 (C3), 143.9 (C7a), 131.0 (C5a), 126.7 (12a), 126.31 (4a), 125.78 (6a), 124.9 (10a), 124.1 (11a), 123.8 (C12), 119.7 (C11), 118.4 (C10), 116.5 (11a), 112.1 (C9), 104.0 (C4), 101.0 (C13), 100.9 (C1), 66.1 (d, $J = 6.8$ Hz, C8'), 65.9 (d, $J = 7.0$ Hz, C3'), 60.8 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{O-C8}$), 56.9 (d, $J = 169.5$ Hz, C6), 55.8 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{O-C7}$), 43.9 (d, $J = 21.0$ Hz C-N5), 32.4 (d, $J = 6.8$ Hz, C4'), 32.3 (d, $J = 6.8$ Hz, C9'), 18.5 (d, $J = 9.8$ Hz C5', C10') 13.5 (C6', C11'). **EMAR (ESI), $[\text{M}+1]^+$** calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{37}\text{NO}_7\text{P}$: 542.23076, observado: 542.23202.

6-(2'-Dimetilmalonil)-5,6-dihidroqueleritrina (**2h**). Este derivado fue obtenido como unos cristales amorfos transparentes que funden a 196-198 °C. **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.73 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-12), 7.54 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-11), 7.48 (d, *J* = 8. Hz, 1H, H-10), 7.41 (s, 1H, H-4), 7.10 (s, 1H, H-1), 6.99 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-9), 6.04 (s, 1H, OCH₂O), 6.03 (s, 1H, OCH₂O), 5.20 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H, H-6), 3.91 (s, 6H, CH₃O-C8, CH₃O-C7), 3.63 (s, 3H, H₃-4'), 3.56 (s, 3H, H₃-5'), 3.37 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, H-2'), 2.68 (s, 3H, CH₃-N5). **RMN ¹³C** (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 168.5 (C3'), 167.1 (C1'), 152.0 (C8), 148.2 (C2), 147.6 (C3), 146.9 (C7), 138.5 (C5a), 131.1 (C12a), 127.2 (C4a), 125.1 (C6a), 124.4 (C10a), 124.1 (C12) 123.4 (C11a), 119.9 (C11), 119.1 (C10), 112.5 (C9) , 104.5 (C4), 101.6 (C13), 100.6 (C1), 61.1 (CH₃O-C8), 57.6 (CH₃O-C7), 56.9 (C4'), 55.5 (C6), 52.5 (C5'), 52.2 (C2'), 42.3 (C-N5). **EMAR (ESI), [M+1]⁺** calculado para C₂₆H₂₆NO₈: 480.16584, observado: 480.16628.



6-(2'-Dietilmalonil)-5,6-dihidroqueleritrina (**2i**). Este derivado fue obtenido como una película amarilla. **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.73 (d, *J* = 8.7 Hz 1H, H-11), 7.53 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-11), 7.47 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-10), 7.43 (s, 1H, H-4), 7.10 (s, 1H, H-1), 6.98 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-9), 6.02 (s, 2H, OCH₂O-13), 5.21 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, H-6), 4.13 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H, H₂-6'), 3.97 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H, H₂-4'), 3.91 (s, 6H, CH₃O-C8, CH₃O-C7), 3.34 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H, H-2'), 2.69 (s, 3H, CH₃-N), 1.09 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, H₃-

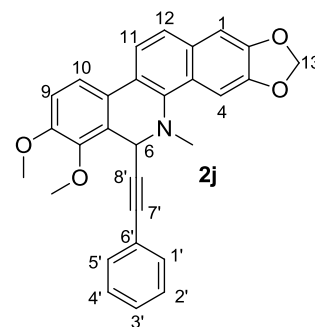


5'), 1.01 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, H_{3-7'}). **RMN ¹³C** (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 168.1 (C1'), 167.1 (C3'), 152.0 (C8), 148.1 (C2), 147.5 (C3), 146.9 (C6a), 138.7 (C5a), 131.1 (C12a), 127.2 (C4a), 125.2 (C6a), 124.6 (C10a), 124.0 (C12), 123.4 (C11a), 119.9 (C11), 118.9 (C10), 112.2 (C9), 104.4 (C4), 101.1 (C13), 100.8 (C1), 61.3 (C6'), 61.1 (C4'), 57.4 (C6), 55.9 (OCH₃-C8), 55.4 (OCH₃-C7), 42.2 (C-N5), 14.0 (C7'), 13.7 (C5'). **EMAR (ESI), [M+1]⁺** calculado para C₂₈H₃₀NO₈: 508.19714, observado: 508.19704.

6-(2'-Feniletinil)-5,6-dihidroqueleritrina (**2j**). Este compuesto fue obtenido como

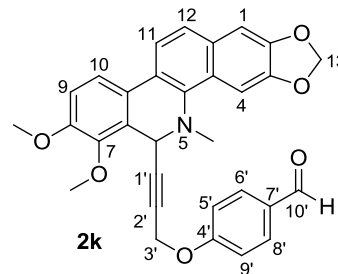
un sólido gris claro que funde a 119-120 °C. **RMN ¹H**

(300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.79 (s, 1H, H-4), 7.75 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-12), 7.57 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-11), 7.51 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-10), 7.11 (s, 1H, H-1), 7.07-7.10 (m, 5H, H_{5-1'-5'}), 6.99 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-9), 6.04 (s,

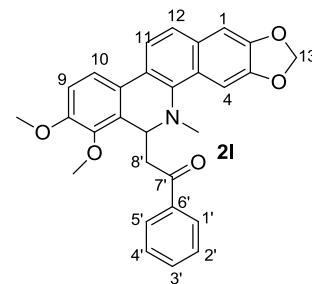


2H, OCH₂O), 5.66 (s, 1H, H-6), 4.01 (s, 3H, CH₃O-C8), 3.94 (s, 3H, CH₃O-C7), 2.64 (s, 3H, CH₃-N). **RMN ¹³C** (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 151.9 (C8), 147.8 (C2), 147.1 (C3), 147.0 (C7), 131.1 (C1', C5'), 130.4 (C5a), 127.5 (C2'-4'), 127.1 (C12), 126.7 (C12a), 126.0 (C4a), 124.4 (C6a), 123.6 (C11a), 123.0 (C10a), 122.6 (C6'), 119.4 (C11), 118.7 (C10), 111.7 (C9), 103.7 (C4), 100.5 (C13), 100.4 (C1), 88.5 (C8'), 81.4 (C7'), 60.7 (CH₃O-C8), 55.5 (CH₃O-C7), 49.1 (C6), 41.0 (C-N5). **EMAR (ESI), [M+1]⁺** calculado para C₂₉H₂₄NO₄: 450.17053, observado: 450.17060.

6-[3'-(*p*-formilfenoxi)propinil]-5,6-dihidroqueleritrina (**2k**). El alquino utilizado en esta reacción fue sintetizado en base a lo reportado por Chávez y Miranda [95]. Este derivado se obtuvo como un sólido amarillo tenue que funde a 169-170°C. **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 9.79 (s, 1H, HC=O-10'), 7.68 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-6'), 7.58 (s, 1H, H-4), 7.54 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-8'), 7.49 (d, *J* = 8.4 Hz, H-12), 7.42 (d, *J* = 8.4, 2H, H-10, H-11), 7.12 (s, 1H, H-1), 6.99 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-9), 6.65 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-9', H-5'), 6.09 (s.a., 1H, OCH₂O-13), 6.04 (s.a., 1H, OCH₂O-13), 5.42 (s, 1H, H-6), 4.47 (d, *J* = 9.6 Hz, 2H, H₂-3'), 3.93 (s, 3H, CH₃O-C8), 3.89 (s, 3H, CH₃O-C7), 2.53 (s, 3H, CH₃-N). **RMN ¹³C** (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm) 191.2 (C10'), 152.2 (C4'), 148.2 (C7), 147.4 (C2) 147.3 (C3), 141.9 (C8), 139.0 (C5a), 132.2 (C7') 131.3 (C8'), 130.7 (C6'), 129.8 (C12a), 127.0 (C4a), 124.6 (C11a), 124.1 (C12), 123.5 (10a), 119.9 (C11, C9'), 119.3 (C6a), 118.8 (10), 115.5 (C5'), 111.3 (C9), 104.3 (C4), 100.9 (C13), 100.7 (C1), 79.3 (C1'), 77.2 (C2'), 67.9 (C6), 61.4 (C3') 60.8 (CH₃O-8), 55.5 (CH₃O-7), 42.7 (C-N5). **EMAR (ESI), [M+1]⁺** calculado para C₃₁H₂₆NO₆: 508.17601, observado: 508.17513.



6-(Feniletanonil)-5,6-dihidroqueleritrina (**21**). Este compuesto se obtuvo como un polvo amarillo pálido. P.f.: 204-205, **RMN** ^1H (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7.74 (d, $J = 8.4$ Hz, 3H, H-12, H-1', H-5'), 7.58 (d, $J = 9.0$, 1H, H-11), 7.52-7.37 (m, 2H, H-3', H-10), 7.27-7.23 (m, 2H, H-2', H-4'), 7.20 (s, 1H, H-4), 7.04 (s, 1H, H-1), 6.98 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, H-9), 5.98 (s. a., 1H, OCH_2O), 5.95 (s. a., 1H, OCH_2O), 5.22 (dd, $J = 11.1, 3.6$ Hz, 1H, H-6), 3.98 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{O-C8}$) 3.94 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{O-C7}$), 3.14 (dd, $J = 14.4, 10.8$ Hz, 1H, H-8'), 2.75 (dd, $J = 14.7, 3.9$ Hz, 1H, H-8'), 2.58 (s, 3H, CH_3N). **RMN** ^{13}C (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 199.03 (C7'), 152.23 (C8), 147.82 (C2), 147.51 (C3), 145.62 (C7), 139.6, 137.3 (C6'), 132.5 (C5a), 131.0 (C12a), 128.6 (C4a), 128.4 (C4',C2'), 128.30 (C5',C1',C3'), 127.6 (C6a), 125.1 (C10a), 123.8 (C12), 123.2 (C11a), 119.8 (C11), 118.9 (C10), 111.6 (C9), 104.1 (C4), 101.1 (C13), 101.0 (C1), 61.1 (C8'), 55.9 ($\text{CH}_3\text{O-C8}$), 55.8 ($\text{CH}_3\text{O-C7}$), 42.9 (C6), 42.2 (C-N5).



4.8 Síntesis de *N*-metil-5,6-dihidrobenzo[*c*]fenantridina (DHB, **3**)

4.8.1 Procedimiento para la síntesis de *N*-(2-bromobencil)naftilamina.

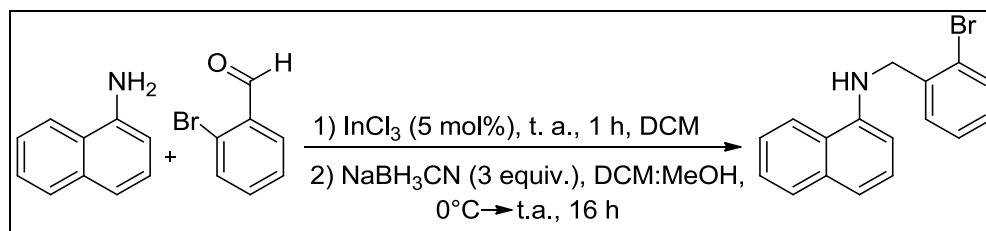


Figura 17. Esquema de síntesis de *N*-(2-bromobencil)naftilamina.

En un matraz bola seco de 50 mL se disolvieron *orto*-bromobenzaldehído (5.436 mmol, 1 equiv.) y 1-naftilamina (5.979 mmol, 1.1 equiv.) en 15 mL de DCM anhidro. La solución se mantuvo en agitación bajo atmósfera de nitrógeno por 15 min a temperatura ambiente. Después se agregaron 0.05 mol de InCl_3 (0.2718 mmol) y la solución se agitó a temperatura ambiente por una hora. La mezcla resultante se enfrió a 0°C en un baño de hielo y se adicionaron 3 equivalentes de cianoborohidruro de sodio (NaBH_3CN) en 4 mL de MeOH. La suspensión se agitó por 16 h a temperatura ambiente. La reacción fue monitoreada por CCF. Finalmente, se realizaron tres extracciones de la mezcla con DCM y agua. Las fases orgánicas resultantes fueron reunidas y concentradas en un evaporador rotativo a presión reducida y el producto puro fue aislado por cromatografía en columna usando como fase estacionaria gel de sílice y como fase móvil Hexano/AcOEt (9:1), obteniéndose el producto deseado como un aceite amarillo (1.6 g, 94%). **RMN ^1H** (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.89–7.81 (m, 2H), 7.62 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.49-7.46 (dd, $J = 10.4, 6.2$ Hz, 2H), 7.43 (s, 1H), 7.35-7.29 (m, 3H), 7.16 (m, 1H), 6.55 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 4.90 (s, 1H), 4.60 (s, 2H). **RMN ^{13}C** (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 142.8, 137.9, 134.4, 133.0, 129.4, 128.9, 128.9, 127.7, 126.7, 125.9, 125.0, 123.6, 123.5, 119.9, 117.9, 105.1, 48.7. **IR** (KBr), ν (cm^{-1}): 3446, 3046, 2918, 2881, 2843, 1579, 1525, 1478, 1463, 1404, 1251, 1158, 1127, 1022, 984, 963, 863, 848, 772, 755, 672, 646, 568, 533, 489, 423. **EMAR (ESI), $[\text{M}+1]^+$** calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{BrN}$: 312.0387; observado: 312.0386.

4.8.2 Procedimiento para la preparación de *N*-(2-bromobencil)-*N*-metilnaftilamina

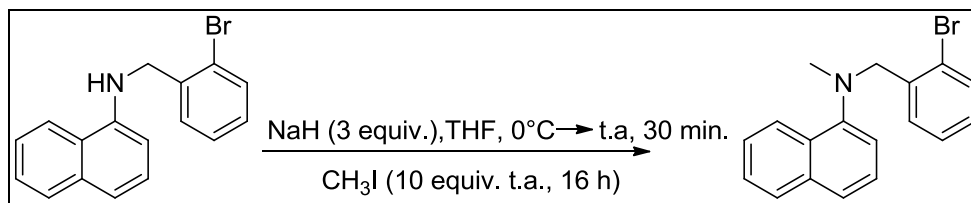


Figura 18. Esquema de síntesis de *N*-(2-bromobencil)-*N*-metilnaftilamina

En un matraz de 50 mL se disolvió *N*-(2-bromobencil)naftilamina (5.110 mmol, 1 equiv.) en 20 mL de THF anhidro (0.2 M). La mezcla en agitación constante fue enfriada a 0 °C y posteriormente se agregó NaH al 90% (15.33 mmol, 3 equiv.), manteniéndose la agitación por 30 min a 0 °C y luego a temperatura ambiente. Enseguida se agregó, gota a gota, el CH₃I (51.1 mmol) y se dejó en agitación por 16 h. La mezcla de reacción fue extraída con una solución saturada de NaHCO₃ y AcOEt y la fase orgánica se secó con NaSO₄ y fue concentrada a presión reducida. El residuo fue purificado por cromatografía en columna usando como fase estacionaria gel de sílice y como fase móvil hexano/DCM (9:1 v/v), obteniéndose el producto deseado como un sólido blanco (1.45 g, 87%) que funde a 45-47 °C. **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8.42–8.36 (m, 1H), 7.88–7.84 (m, 1H), 7.60–7.55 (m, 1H), 7.53–7.27 (m, 7H), 7.13 (dd, J = 7.4, 1.2 Hz, 1H), 4.31 (s, 1H), 2.81 (s, 3H). **RMN ¹³C** (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 150.31, 138.91, 134.96, 129.27, 128.49, 127.17, 125.90, 125.47, 123.90, 123.31, 115.70, 61.58, 41.76. **IR** (KBr), ν (cm⁻¹): 3050, 2950, 2924, 2852, 2794,

1592, 1577, 1581, 1464, 1440, 1397, 1315, 1234, 1175, 1124, 1042, 1024, 926, 863, 790, 773, 751, 670, 626, 582, 564. **EMAR (ESI), [M+1]⁺** calculado para C₁₈H₁₇BrN: 326.0544; observado: 326.0539.

4.8.3 Procedimiento para la síntesis de *N*-metil-5,6-dihidrobenzo[*c*]fenantridina (**3**).

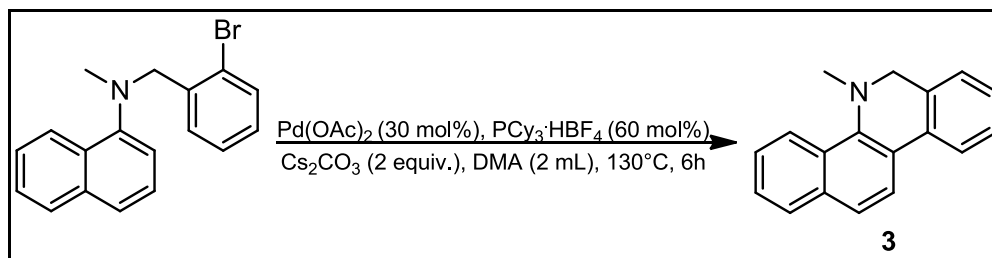


Figura 19. Esquema de síntesis para la obtención de *N*-metil-5,6-dihidrobenzo[*c*]fenantridina (**3**).

En un matraz de 10 mL se agregó *N*-(2-bromobencil)-*N*-metilnaftilamina, (100 mg, 0.3076 mmol), Pd(OAc)₂ (20.7 mg, 0.09228 mmol), PCy₃·HBF₄ (68 mg, 0.18456 mmol) y Cs₂CO₃ (0.6152 mmol) en DMA (2 mL) y se dejó en agitación a 130 °C en una atmósfera de nitrógeno por 6 h. Después de terminar la reacción (monitoreada por CCF), el solvente fue removido a presión reducida y se agregó una solución de NaHCO₃ (15 mL) y se extrajo con AcOEt (3 x 10 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ y se concentró a presión reducida. El crudo de la reacción fue purificado por cromatografía en columna relámpago (gel de sílice y hexano:DCM 9:1), obteniéndose **3** como un sólido blanco (760 mg, 79% de rendimiento) que funde a 118-120 °C. **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8.40 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 7.95 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.86 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.71 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.60–7.31 (m, 5H), 4.29 (s, 2H), 2.73 (s, 3H).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 144.33, 134.36, 132.32, 132.12, 129.46, 128.35, 127.81, 127.66, 127.01, 126.23, 126.13, 125.45, 124.80, 124.26, 122.95, 121.95, 55.23, 41.58. **IR** (KBr), ν (cm⁻¹): 3051, 2923, 2850, 1719, 1578, 1526, 1510, 1480, 1462, 1434, 1376, 1340, 1286, 1269, 1195, 1116, 1074, 1041, 976, 921, 867, 816, 795, 759, 703, 642, 586, 570, 455, 440, 419 cm⁻¹. **EMAR (ESI), [M+1]⁺** calculado para C₁₈H₁₆N 246.12827; observado: 246.12787.

4.8.4 Procedimiento general para la síntesis de los derivados de *N*-metil-5,6-dihidrobenczo[*c*]fenantridina (**3**, **DHB**)

Método A. En un matraz bola de 25 mL se agregó DHB (25 mg, 0.1 mmol), CuBr (2.9 mg, 0.02 mmol), nucleófilo (0.12 mmol), DDQ (27.24 mg, 0.12 mmol) y 2 mL de CH₃CN:tolueno (50:50 v/v), dejándose en agitación a 80°C por 24h. Posteriormente, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con AcOEt. Después, se filtró a través de celita y el filtrado se concentró en un evaporador rotativo dando un residuo café oscuro, el cual fue fraccionado por cromatografía en columna con DCM/hexano (2:8 v/v) hasta la obtención del derivado puro.

Método B. Procedimiento experimental usando malonatos. En un matraz bola de 25 mL se agregó DHB (25 mg, 0.1 mmol), CuBr (2.9 mg, 0.02 mmol), malonato (0.12 mmol), DDQ (27.24 mg, 0.12 mmol), Cs₂CO₃ (43.8 mg, 0.12

mmol) y 2 mL de CH₃CN:tolueno (50:50 v/v), dejándose en agitación a 80°C por 24 h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con AcOEt y se filtró a través de celita. El filtrado fue concentrado en un evaporador rotativo dando un residuo oscuro, el cual fue fraccionado por cromatografía en columna con DCM/hexano (1:9 v/v) hasta la obtención del derivado puro.

Método C. Procedimiento experimental usando nitroalcanos. En un matraz bola de 25 mL se agregó DHB (25 mg, 0.1 mmol), CuBr (2.9 mg, 0.02 mmol), nitroalcano (0.2 mmol), DDQ (27.24 mg, 0.12 mmol) y 2 mL de CH₃CN:tolueno (50:50 v/v) dejándose en agitación a 80°C por 24 h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con AcOEt y se filtró a través de celita. El filtrado fue concentrado en un evaporador rotativo dando un residuo oscuro, el cual fue fraccionado por cromatografía en columna con DCM/hexano (1:9 v/v) hasta la obtención del derivado puro.

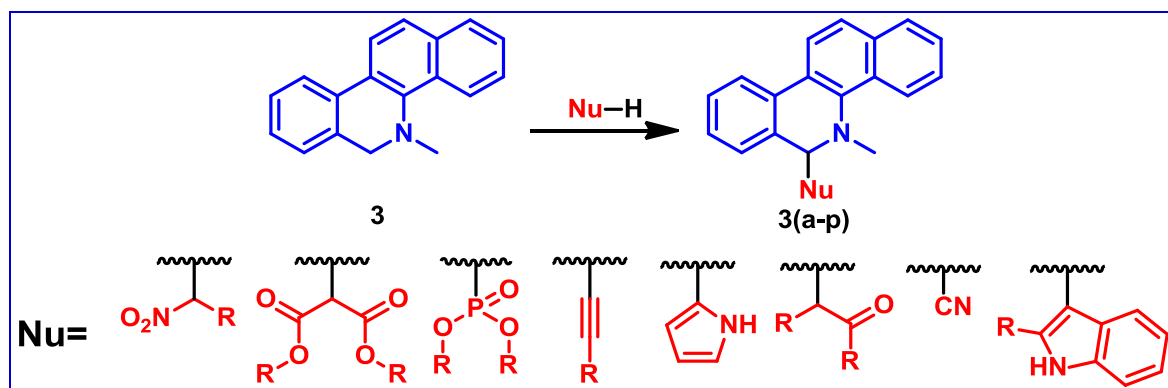
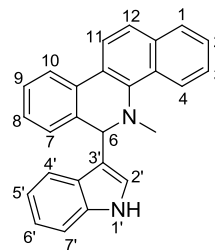


Figura 20. Reacción de ACD entre *N*-metil-5,6-dihidrobenzo[*c*]fenantridina y diversos nucleófilos

4.8.5 Datos espectroscópicos de las *N*-metil-5,6-dihidrobenzo[*c*]fenantridinas C(6)-funcionalizadas.

6-(3'-indolil)-5-metil-5,6-dihidrobenzo[*c*]fenantridina (**3a**). Este compuesto se obtuvo como una resina naranja usando el método A. **RMN**

¹H (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8.38 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-4), 8.12 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-1), 7.91 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, H-12), 7.89 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-10), 7.70 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H,



H-11), 7.52-7.33 (m, 8H, H-2, 3, 7, 8, 9, 4', 7' y 5'), (m, 2H, H-2', H-6'), 6.16 (s, 1H, H-1'), 5.64 (s, 1H, H-6), 2.99 (s, 3H, CH₃-N). **RMN ¹³C** (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 142.64 (C5a), 136.53 (C7'a), 134.41 (C6a), 133.77 (C12a), 131.69 (C10a), 130.34 (C4a), 128.32 (C1), 128.23 (C7), 128.02 (C9), 127.86 (C8), 127.52 (C2), 126.79 (C3a'), 125.90 (C3), 125.77 (C10), 124.73 (C11a), 124.46 (C4), 124.20 (C12), 123.26 (C2'), 121.80 (C11), 121.42(C6'), 120.30 (C5'), 119.31 (C4'), 118.11 (C3'), 111.05 (C7'), 60.80 (C6), 42.82 (CH₃-N5). **IR** (película), ν (cm⁻¹): 3549, 3425, 3310, 3056, 2929, 2871, 2785, 1731, 1450, 1219, 1099, 816, 762, 742, 700, 663. **EMAR (ESI)**, [M+1]⁺ calculado para C₂₆H₂₁N₂: 361.17047; observado: 361.17056.

5-Metil-6-(2'-Metil-3'-indolil)-5,6-dihidrobenzo[c]fenantridina **(3b)**. Este

compuesto se obtuvo como una película color shedrón

usando el método A. **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

8.30 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-4), 7.93 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H, H-

12), 7.91 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-1) 7.70 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H,

H-11), 7.57 (s, 1H, NH), 7.54-7.46 (m, 2H, H-10, H-4'), 7.39-7.28 (m, 5H, H-2,

H-3, H-7, H-9, H-7'), 7.10–7.06 (m, 1H, H-8), 6.99–6.95 (m, 2H, H-6', H5'), 5.65

(s, 1H, H-6), 2.93 (s, 3H, CH₃-N), 1.85 (s, 3H, C2'-CH₃). **RMN ¹³C** (75 MHz,

CDCl₃), δ (ppm): 143.63 (C5a), 134.68 (C6a), 134.35 (C7'a), 133.81 (C2'),

133.00 (C12a), 132.95 (C10a), 130.50 (C4a), 128.97 (C1), 128.68 (C7), 128.05

(C9), 127.95 (C8), 127.76 (C2), 125.79 (C3), 125.75 (C3'a), 125.31(C11a),

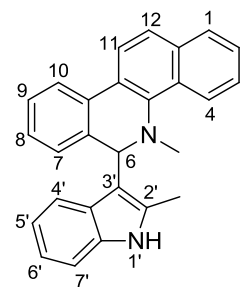
124.68 (C10), 124.31 (C4), 122.86 (C12), 121.54 (C11), 120.58 (C6'), 119.51

(C5'), 119.19 (C4'), 111.34 (C3'), 109.92 (C7'), 60.76 (C6), 42.18 (CH₃-N5),

12.39 (CH₃-C2'). **IR** (película), ν (cm⁻¹): 3396, 3250, 3056, 3031, 2925, 2852,

1616, 1487, 1459, 1218, 818, 761, 665. **EMAR** (ESI), [M+1]⁺ calculado para

C₂₇H₂₃N₂: 375.18612, observado: 375.18624.



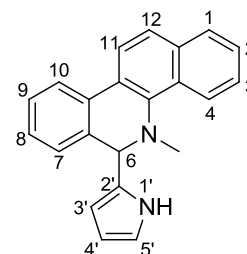
5-Metil-6-(2'-pirrolil)-5,6-dihidrobenzo[c]fenantridina **(3c)**. Este compuesto se

obtuvo como una resina amarilla usando el método A. **RMN**

¹H (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8.48 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-4),

7.89 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-1), 7.87 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H-11),

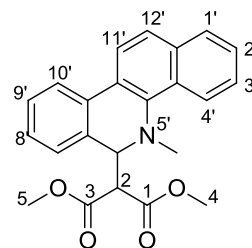
7.81 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, 12), 7.60 (m, 2H, H-10, H-3), 7.48-



7.42 (m, 4H, H-2, H-9, H-7, H8), 6.45 (s.a. 1H, H-3'), 5.85 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H, H-4), 5.50–5.49 (s.a., 1H, H-5'), 5.34 (s, 1H, H-6), 3.65 (s, 1H, NH), 2.84 (s, 3H, CH₃N). **RMN** ¹³C (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 141.49 (C5a), 134.43 (C6a), 132.95 (C12a), 132.87 (C10a), 131.21 (C2'), 129.92 (C4a), 128.55 (C1), 128.27 (C7), 128.18 (C9), 127.63 (C8), 126.46 (C2), 125.98 (C3), 125.00 (C10), 123.54 (C4), 123.45 (C11a), 123.43 (C12), 121.83 (C11), 116.81 (C5'), 107.98 (C4'), 106.31 (C3'), 61.68 (C6), 42.50 (CH₃-N5). **IR** (película) ν (cm⁻¹): 3448, 3056, 2924, 2870, 2852, 1728, 1598, 1582, 1560, 1506, 1464, 1446, 1377, 1313, 1258, 1192, 1145, 1094, 1028, 957, 858, 815, 789, 762, 716, 659, 597, 558. **EMAR** (ESI), [M+1]⁺ calculado para C₂₂H₁₉N₂ 311.15482; observado: 311.15507.

2-(5'-Metil-5',6'-dihidrobenzo[c]fenanthridin-6'-il)malonato de dimetilo (**3d**). Este

compuesto se sintetizó usando el método B y el producto se obtuvo como una resina amarilla. **RMN** ¹H (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8.12 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, H-4'), 7.94 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-1'), 7.88 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-11'), 7.86–7.81



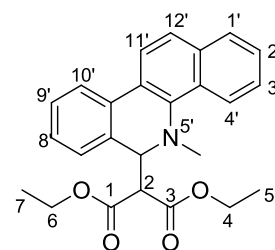
(m, 1H, H-10'), 7.70 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-12'), 7.50–7.40 (m, 4H, H-2', H-3', H-9', H-7'), 7.33 (ddd, $J = 7.2, 6.9, 1.8$ Hz, 1H, H-8'), 4.95 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H, H-6'), 3.62 (s, 3H, H₃-5), 3.53 (s, 3H, H₃-4), 3.45 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H, H-2), 2.76 (s, 3H, CH₃N). **RMN** ¹³C (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 168.20 (C3), 167.68 (C1), 140.35 (C5'a), 134.54 (C6'a), 130.99 (C12'a), 130.64 (C10'a), 129.97 (C4'a), 128.87 (C1'), 128.66 (C7'), 128.34 (C9'), 127.57 (C8'), 126.20 (C2'), 126.01

(C3'), 125.00 (C10'), 124.25 (C4'), 124.04 (C11'a), 123.48 (C12'), 121.41 (C11'), 100.00 (C2), 62.94 (C5), 56.04 (C4), 52.29 (C6'), 42.84 (CH₃-N5'). **IR** (película), ν (cm⁻¹): 3057, 2995, 2950, 2922, 2852, 1756, 1600, 1512, 1484, 1434, 1257, 1175, 1142, 1106, 1039, 977, 944, 820, 764, 712, 627, 591, 573. **EMAR** (ESI), [M+1]⁺ calculado para C₂₃H₂₂NO₄: 376.15488; observado: 376.15459.

2-(5'-metil-5',6'-dihidrobenczo[c]fenantridin-6'-il)malonato de dietilo (**3e**). Este

compuesto se sintetizó usando el método B y el producto se obtuvo como una resina amarilla. **RMN** ¹H (300 MHz, CDCl₃),

δ (ppm): 8.15 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-4'), 7.94 (d, J = 8.7 Hz, 1H, H-1'), 7.85 (m, 2H, H-10, H-12'), 7.69 (d, J = 8.7 Hz, 1H, H-11'), 7.49–7.45 (m, 3H, H-3', H-2', H-9'), 7.42 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-8'), 7.32 (dd, J = 7.2, 7.5 Hz, 1H, H-7'), 4.95 (d, J = 11.1 Hz, 1H, H-6'), 4.21 (q, J = 7.2 Hz, 4H, H₂-6, H₂-4), 3.41 (d, J = 11.4 Hz, 1H, H-2), 2.76 (s, 3H, CH₃-N), 1.04 (t, J = 7.2 Hz, 3H, H₃-7), 0.99 (t, J = 6.9 Hz, 3H, H₃-5).



RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 167.80 (C1), 167.36 (C3), 140.50 (C5'a), 134.54 (C6'a), 131.05 (C12'a), 130.77 (C10'a), 130.02 (C4'a), 128.99 (C1'), 128.55 (C7'), 128.27 (C9'), 127.47 (C8'), 126.14 (C2'), 126.00 (C3'), 124.89 (C10'), 124.28 (C4'), 124.10 (C11'a), 123.39 (C12'), 121.44 (C11'), 62.85 (C2), 61.39 (C6), 61.36 (C4), 56.33 (C6'), 42.78 (CH₃-N5'), 13.93 (C7), 13.90 (C5). **IR** (película), ν (cm⁻¹): 3056, 2980, 2928, 2851, 1752, 1733, 1650, 1556, 1538, 1506, 1485, 1466, 1447, 1368, 1335, 1305, 1254, 1179, 1141, 1106, 1039, 950, 873, 818, 796, 764, 623.

EMAR (ESI), $[M+1]^+$ calculado para $C_{25}H_{26}NO_4$: 404.18618; observado: 404.18573.

2,2-Dimetil-5-(5'-metil-5',6'-dihidrobenzo[c]fenantridin-6'-il)-1,3-dioxan-4,6-diona

(**3f**). Este compuesto se sintetizó usando el método A y el

producto se obtuvo como una resina ámbar. **RMN 1H** (300

MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 8.15 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-4'), 7.97 (d,

$J = 8.7$ Hz, 1H, H-1'), 7.90 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, H-10', H-12'),

7.83 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-11'), 7.63 (dd, $J = 7.5, 7.2$ Hz, 1H, H-3'), 7.60-7.47 (m,

2H, H-2', H-9'), 7.42 (dd, $J = 7.2, 7.2$ Hz, 1H, H-8'), 7.31 (d, $J = 7.2$ Hz, H-7') 4.52

(dd, $J = 3.9, 12.0$ Hz, 1H, H-6'), 4.12 (c, $J = 7.2$ Hz, 1H, H-5), 2.85 (s, 3H,

CH_3N), 1.25 (s, 6H, $C(CH_3)_2$). **RMN ^{13}C** (75 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 172.48 (C4',

C6'), 140.72 (C5'a), 134.62 (C6'a), 133.60 (C12'a), 131.95 (C10'a), 129.82

(C4'a), 129.03 (C1'), 128.92 (C7', C9'), 127.61 (C8'), 127.47 (C2'), 127.22 (C3'),

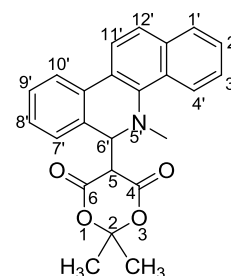
126.72 (C10'), 125.1 (C11'a), 123.94 (C4'), 122.48 (C12'), 121.52 (C11'), 106.35

(C5), 60.84 (C6'), 42.64 (C2), 37.6 (C-N5'), 27.71 (C- H_3 -2). **IR** (película), ν (cm^{-1}

): 3058, 2920, 2851, 1728, 1710, 1580, 1511, 1484, 1446, 1378, 1350, 1281,

1246, 1199, 1161, 1106, 1050, 1018, 920, 869, 796, 764, 719, 674, 661. **EMAR**

(ESI), $[M+1]^+$ calculado para $C_{26}H_{20}N$ 385.15957; observado: 385.15913.



2-(5'-Metil-5',6'-dihidrobenczo[c]fenantridin-6'-il)-3-oxobutanoato de etilo (**3g**).

Este compuesto se sintetizó usando el método A y el producto se obtuvo como una resina amarilla. Isómero A:

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8.16-8.08 (m, 1H, H-4'),

7.96 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-1'), 7.86 (dd, *J* = 9.9, 8.7, 2H, H-

10', H-12'), 7.72 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-11'), 7.50-7.37 (m, 4H, H-2', H-3', H-7', H-

9'), 7.34-7.28 (m, 1H, H-8'), 5.00 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H, H-6'), 3.98 (c, 7.2 Hz, 2H,

H₂-5), 3.64 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H, H-2), 2.72 (s, 3H, CH₃-N), 2.06 (s, 3H, H₃-4),

1.05 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, H₃-6). Isómero B: **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

8.16-8.08 (m, 1H, H-4'), 7.95 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-1'), 7.86 (dd, *J* = 7.5, 8.7, 2H,

H-10', H-12'), 7.71 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-11'), 7.50-7.37 (m, 4H, H-2', H-3', H-7',

H-9'), 7.34-7.28 (m, 1H, H-8'), 4.95 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H, H-6'), 4.21-4.07 (m, 2H,

OCH₂-5), 3.69 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H, H-2), 2.75 (s, 3H, CH₃-N), 2.13 (s, 3H, H₃-4),

1.03 (t, *J* = 6.9 Hz, H₃-6). **RMN ¹³C** (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 201.85 (C1),

166.99 (C3), 134.53 (C5'a), 133.90 (C6'a), 130.65 (C12'a), 130.16 (C10'a),

129.27 (C1'), 128.92 (C7'), 128.54 (C9'), 128.42 (C4'a), 127.61 (C8'), 126.45

(C2'), 125.09 (C3'), 124.42 (C10'), 123.99 (C4'), 123.43 (C12'), 121.53 (C11'),

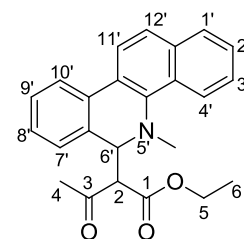
61.24 (C6'), 60.27 (C2), 61.3 (C5), 43.10 (CH₃-N5), 29.80 (C4), 14.08 (C6). **IR**

(película) *v* (cm⁻¹): 3056, 2919, 2850, 1742, 1716, 1649, 1600, 1557, 1511,

1484, 1463, 1378, 1313, 1235, 1189, 1148, 1104, 1076, 1033, 945, 852, 818,

763, 650, 591, 558. **EMAR** (ESI), [M+1]⁺ calculado para C₂₄H₂₄NO₃: 374.17562;

observado: 374.17533.



2-(5'-Metil-5',6'-dihidrobenczo[c]fenantridin-6'-il)-1-feniletanona **(3h)**. Este

compuesto se sintetizó usando el método A y el producto se

obtuvo como una resina ámbar. **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃), δ

(ppm): 8.03 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-4'), 7.97 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H,

H-1'), 7.88 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-10'), 7.80 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H,

H-12'), 7.70 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-11'), 7.61 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H,

H-3', H-2'), 7.44–7.33 (m, 6H, H-7', H-8', H-9', H-5, H-3, H-7), 7.18 (dd, *J* = 7.5,

7.5 Hz, 2H, H-6, H-4), 4.94 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, H-6'), 3.37 (dd, *J* = 16.2, 8.4 Hz,

1H, H^b-2), 2.82 (dd, *J* = 15.9, 5.7 Hz, 1H, H^a-2), 2.75 (s, 3H, CH₃-N). **RMN ¹³C**

(75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 208.41 (C1), 146.61 (C5'a), 137.97 (C8), 134.7

(C6'a), 134.42 (C8), 132.85 (C12'a, C10'a), 130.75 (C4'a), 128.30 (C3, C7, C5),

128.17 (C4, C6), 128.05 (C1'), 127.93 (C7'), 127.87 (C9'), 127.76 (C8'), 126.4

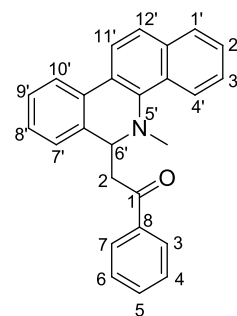
(C11'a), 126.03 (C2'), 126.02 (C3'), 124.65 (C10'), 124.48 (C4'), 123.25 (C12'),

121.50 (C11'), 60.45 (C2), 43.04 (C6'), 29.79 (CH₃-N5). **IR** (película), ν (cm⁻¹):

3300, 2917, 2849, 1738, 1608, 1577, 1515, 1470, 1383, 1326, 1296, 1225,

1177, 1043, 1023, 967, 811, 759, 730, 680, 591. **EMAR** (ESI), [M+1]⁺ calculado

para C₂₆H₂₂NO: 364.17014; observado: 364.16916.

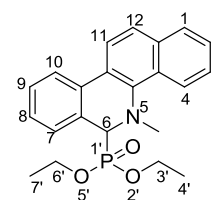


5-Metil-5,6-dihidrobenczo[c]fenantridin-6-ilfosfonato de dietilo **(3i)**. Este

compuesto se sintetizó usando el método A y el producto se

obtuvo como una resina amarilla. **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃),

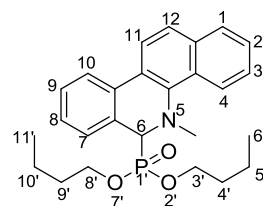
δ (ppm): 8.38 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-4), 7.88 (dd, *J* = 8.4, 7.5



Hz, 2H, H-10, H-12), 7.81 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-1), 7.66 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-11), 7.55–7.34 (m, 5H, H-2, H-3, H-9, H-7, H-8), 4.61 (d, $J = 24.6$ Hz, 1H, H-6), 3.80–3.70 (m, 4H, H-6', H-3'), 2.89 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-N}$), 0.96 (t, $J = 6.9$ Hz, 6H, H-7', H-4'). **RMN ^{13}C** (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 142.11 (C5a), 134.49 (C6a), 132.04 (C12a), 129.31 (C10a), 129.23 (C4a), 128.64 (C1), 128.60 (C7), 128.29 (C9), 128.25 (C8), 127.74 (C2), 126.22 (C3), 126.09 (C10), 124.86 (C11a), 124.29 (C4), 123.00 (C12), 121.39 (C11), 63.1 (d, $J = 161.3$ Hz, C6), 62.6 (d, $J = 7.5$ Hz, C3'), 62.5 (d, $J = 8.3$ Hz, C6'), 45.0 (d, $J = 19.5$ Hz, $\text{C}\text{H}_3\text{-N5}$), 16.2 (d, $J = 5.3$ Hz, C4', C7'). **IR** (película), ν (cm^{-1}): 3055, 2979, 2907, 2854, 2814, 1730, 1647, 1599, 1557, 1444, 1376, 1246, 1093, 1020, 962, 827, 761, 595, 559, 507, 480, 434. **EMAR** (ESI), $[\text{M}+1]^+$ calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{NO}_3\text{P}$: 382.15720; observado: 382.15711.

5-metil-5,6-dihidrobenzo[c]fenantridin-6-ilfosfonato de dibutilo (**3j**). Este compuesto se sintetizó usando el método A y el producto

se obtuvo como una resina amarilla. **RMN ^1H** (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 8.37 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-4), 7.87 (dd, $J = 8.7, 7.5$ Hz, 2H, H-12, H-10), 7.80 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-1)



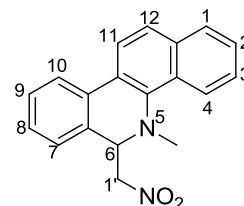
7.65 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-11), 7.56–7.34 (m, 5H, H-2, H-3, H-9, H-7, H-8), 4.62 (d, $J = 24.9$ Hz, 1H, H-6), 3.84 – 3.46 (m, 4H, H-3', H-8'), 2.89 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-N}$), 1.25 (m, 4H, H-4', H-9'), 1.13–1.01 (m, 4H, H-5', H-10'), 0.73 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, H-11'), 0.71 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, H-6'). **RMN ^{13}C** (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 139.04

(C5a), 134.54 (C6a), 129.52 (C12a), 129.33 (C10a), 129.25 (C4a), 128.59 (C1), 128.28 (C7, C9), 127.71 (C8), 126.17 (C2), 126.07 (C3), 124.97 (C11a), 124.79 (C10), 124.36 (C4), 122.98 (C12), 121.40 (C11), 66.3 (d, $J = 7.5$ Hz, C3', C8'), 63.2 (d, $J = 162.8$ Hz, C6), 45.1 (d, $J = 21.0$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{-N5}$), 32.4 (d, $J = 6.0$ Hz, C9', C4'), 18.55 (d, $J = 3.8$ Hz, C5', C10'), 13.58 (C6', C11'). **IR** (película), ν (cm^{-1}): 3056, 2956, 2929, 2868, 1730, 1648, 1600, 1482, 1462, 1376, 1247, 1061, 1018, 978, 900, 820, 760, 595, 560, 434. **EMAR** (ESI), $[\text{M}+1]^+$ calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{NO}_3\text{P}$: 438.21980; observado: 438.22038.

5-Metil-6-(nitrometil)-5,6-dihidrobenzo[*c*]fenantridina (**3k**). Este compuesto se sintetizó usando el método C y el producto se obtuvo como

una resina amarilla. **RMN ^1H** (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm):

8.22 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-4), 7.93 (dd, $J = 7.8, 8.7$ Hz, 2H,



H-10, H-12), 7.85 (dd, $J = 7.5, 2.4$ Hz, 1H, H-1), 7.73 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-11),

7.55–7.48 (m, 3H, H-2, H-3, H-9), 7.41–7.39 (m, 2H, H-7, H-8), 5.03 (t, $J = 7.8$

Hz, 1H, H-6), 4.30 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-NO}_2$), 2.78 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-N}$). **RMN ^{13}C**

(75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 139.8 (C5a), 134.68 (C6a), 132.2 (C12a), 131.41

(C10a), 130.11 (C4a), 129.3 (C1), 129.13 (C11a), 128.27 (C7), 128.22 (C9),

127.82 (C8), 126.65 (C2), 126.62 (C3), 125.49 (C10), 124.37 (C4), 123.64

(C12), 121.14 (C11), 77.26 (C1'), 62.03 (C6), 43.18 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{-N5}$). **IR** (película), ν

(cm^{-1}): 2921, 2854, 1731, 1641, 1597, 1547, 1378, 1181, 116, 1080, 1047, 876,

820, 765, 641, 590, 553, 459, 418. **EMAR** (ESI), $[M+1]^+$ calculado para $C_{19}H_{17}N_2O_2$: 305.12900; observado: 305.12877.

5-Metil-6-(1'-nitroetil)-5,6-dihidrobenzo[*c*]fenantridina (**31**). Este compuesto se sintetizó usando el método C y el producto se obtuvo como

una resina amarilla. **RMN 1H** (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm):

8.15 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-4), 7.91 (dd, $J = 8.7, 7.8$ Hz, 2H, H-

10, H12), 7.83 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-1), 7.71 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-11), 7.56-7.48

(m, 3H, H-2, H-3, H-9), 7.43-7.33 (m, 2H, H-7, H-8), 4.58 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H, H-

6), 4.40-4.33 (m, $J = 6.6, 10.5$ Hz, 1H, H-1'), 2.72 (s, 3H, CH_3N), 1.39 (d, $J = 6.9$

Hz, 3H). **RMN ^{13}C** (75 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 140.32 (C5a), 134.66 (C6a),

131.48 (C12a), 130.02 (C10a), 129.44 (C1), 129.22 (C7), 128.41 (C4a), 128.13

(C9), 127.67 (C8), 126.60 (C2), 126.59 (C3), 125.32 (C10), 124.47 (C), 123.73

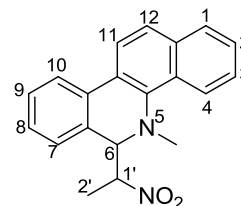
(C12), 123.36 (C11a), 121.02 (C11), 83.67 (C1'), 67.11 (C6), 42.90 (CH_3-N5),

17.11 (C2'). **IR** (película), ν (cm^{-1}): 3296, 2401, 1714, 1643, 1597, 1547, 1446,

1382, 1355, 1276, 1250, 1073, 1046, 966, 868, 821, 763, 644, 582, 460, 443,

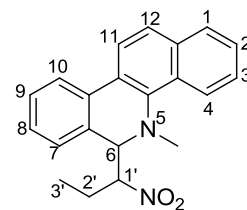
406. **EMAR** (ESI), $[M+1]^+$ calculado para $C_{20}H_{19}N_2O_2$: 319.14465; observado:

319.14424.



5-Metil-6-(1'-nitropropil)-5,6-dihidrobenzo[c]fenantridina (**3m**). Este compuesto se sintetizó usando el método C y el producto se obtuvo

como una resina amarilla. **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8.15 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-4), 7.92 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-10, H-12), 7.83 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-1), 7.72 (d, $J = 8.7$

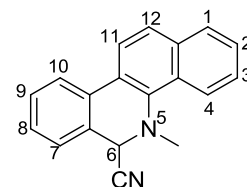


Hz, 1H, H-11), 7.57-7.48 (m, 3H, H-2, H-3, H-9), 7.4 (dd, 1H, $J = 7.5, 7.2$ Hz, H-7), 7.2 (d, $J = 7.2$ Hz, H-8), 4.60 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, H-6), 4.20 (td, $J = 10.8, 8.1$, 1H, H-1'), 3.65 (m, 2H, H-2'), 2.71 (s, 3H, CH₃-N), 0.74 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, H₃-3').

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 140.38 (C5a), 136.74 (C6a), 134.66 (C12a), 131.48 (C10a), 129.42 (C1), 129.19 (C7), 128.70 (C4a), 128.13 (C9), 127.65 (C8), 126.60 (C2, C3), 125.65 (C11a), 125.34 (C10), 124.48 (C4), 123.76 (C12), 121.02 (C11), 90.64 (C1'), 66.54 (C6), 42.83 (CH₃-N5), 24.51 (C2'), 10.35 (C3'). **IR** (película), ν (cm⁻¹): 2920, 2851, 1729, 1549, 1482, 1463, 1375, 1349, 1235, 1175, 1084, 1019, 965, 892, 817, 763, 649, 591, 469, 434. **EMAR** (ESI), [M+1]⁺ calculado para C₂₁H₂₁N₂O₂: 333.16030; observado: 333.16029.

5-Metil-5,6-dihidrobenzo[c]fenantridina-6-carbonitrilo (**3n**). Este compuesto se sintetizó usando el método A y el producto se obtuvo como

una resina café. **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8.36 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-4), 7.92 (dd, $J = 8.4, 6.9$ Hz, 2H, H-10, H-

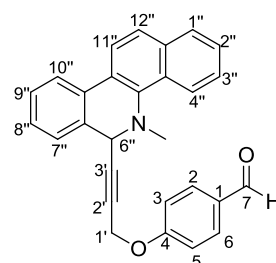


12), 7.87 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-1), 7.78 (d, $J = 7.78$ Hz, H-11), 7.59–7.46 (m, 5H, H-2, H-3, H-9, H-7, H-8), 5.24 (s, 1H, H-6), 2.71 (s, 3H, CH₃-N). **RMN ¹³C** (75

MHz, CDCl₃), δ (ppm): 141.9 (C5a), 141.0 (C6a), 135.50 (C12a), 132.76 (C1), 132.69 (10a), 129.56 (C4a), 128.67 (C7), 128.59 (C9), 128.06 (C8), 126.62 (C2), 125.62 (C3), 125.49 (11a), 125.14 (C10), 124.20 (C4), 122.16 (C12), 120.03 (C11), 95.17 (CN), 61.47 (C6), 41.26 (CH₃-N5). **IR** (película), ν (cm⁻¹): 3059, 3015, 2921, 2852, 1724, 1645, 1614, 1486, 1376, 1332, 1251, 1218, 1099, 1043, 818, 760, 694, 665, 567. **EMAR** (ESI), [M+1]⁺ calculado para C₁₉H₁₅N₂: 271.12352; observado: 271.12360.

4-(3'-(5''-Metil-5'',6''-dihidrobencoc[*c*]fenantridin-6''-il)-2'-propiniloxi)benzaldehído

(3o). El alquino usado en esta reacción se sintetizó en base a lo reportado por Chávez y Miranda [95]. Este compuesto se sintetizó usando el método A y el producto se obtuvo como una resina amarilla. **RMN** ¹H (300 MHz,



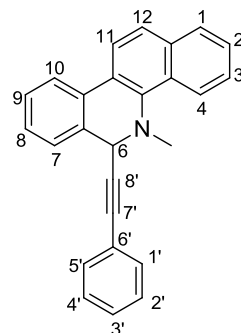
CDCl₃), δ (ppm): 9.83 (s, 1H, HC=O), 8.35–8.30 (d, J = 8.7 Hz, 1H, H-4''), 7.92 (d, J = 8.7 Hz, 1H, H-1''), 7.82–7.88 (m, 2H, H-10'', H-12''), 7.70 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-11''), 7.60 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-3, H-5) 7.53–7.47 (m, 2H, H-2'', H-3''), 7.44 (dd, J = 7.5, 1.8 Hz, 2H, H-9'', H-7''), 7.37 (d, J = 7.2 Hz, 1H, H-8''), 6.87 (d, J = 8.8 Hz, 2H, H-2, H-6), 5.07 (s, 1H, H-6''), 4.72 (s, 2H, H-1'), 2.60 (s, 3H, CH₃N). **RMN** ¹³C (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 190.94 (C=O), 162.37 (C4), 142.66 (C5''a), 134.35 (C6''a), 131.74 (C2, C6), 131.42 (C12''a), 130.77 (C10''a), 130.28 (C1), 129.58 (C4''a), 128.61 (C1''), 128.27 (C7''), 128.02 (C9''), 126.74 (C8''), 126.41 (C2''), 126.37 (C3''), 125.36 (C10''), 124.79 (C11''a), 124.21 (C4''), 123.50 (C12''), 121.70 (C11''), 115.24 (C3, C5), 86.53 (C3'), 77.31 (C2'),

56.43 (C6''), 55.16 (C1'), 39.14 (CH₃-N5''). **IR** (película), ν (cm⁻¹): 3058, 2923, 2851, 2738, 1690, 1650, 1599, 1579, 1508, 1482, 1447, 1426, 1374, 1332, 1311, 1252, 1223, 1161, 1112, 1067, 1004, 830, 923, 830, 764, 736, 695, 647, 605. **EMAR** (ESI), [M+1]⁺ calculado para C₂₈H₂₂NO₂: 404.16505; observado: 404.16426.

6-(Feniletinil)-5-metil-5,6-dihidrobenzo[c]fenantridina (**3p**). Este compuesto se sintetizó usando el método C y el producto se obtuvo como

una resina amarilla. **RMN** ¹H (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm):

8.47 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-4), 7.96 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-1), 7.87 (d, $J = 7.5$, 1H, H-10, H-12), 7.74 (d, $J = 8.1$, 2H, H-11, H-2), 7.60–7.44 (m, 6H, H-3, H1'-H5'), 7.34–7.31 (m, 3H, H-



9, H-8, H-7), 5.30 (s, 1H, H-6), 2.71 (s, 3H, CH₃N). **RMN** ¹³C (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 143.71 (C5a), 134.32 (C6a), 132.0 (C2', C4'), 131.85 (C12a), 131.38 (C10a), 129.50 (C4a), 128.44 (C1), 128.35 (C1', C3', C5'), 128.22 (C7), 128.01 (C9), 126.87 (C8), 126.36 (C2), 126.30 (C3), 125.32 (C10), 125.02 (c11a), 124.39 (C4), 123.26 (C12), 123.04 (C6'), 121.85 (C11), 87.10 (C8'), 86.38 (C7'), 55.52 (C6), 37.59 (CH₃-N5). **IR** (película), ν (cm⁻¹): 3055, 2922, 2852, 2808, 1735, 1656, 1598, 1483, 1445, 1372, 1334, 1285, 1256, 1099, 1068, 1041, 915, 816, 757, 690, 654, 558, 433. **EMAR** (ESI), [M+1]⁺ calculado para C₂₆H₂₀N 346.15957; observado: 346.15913.

CAPITULO 5

RESULTADOS y DISCUSIONES

5.1 Obtención de los alcaloides naturales

A partir de 38 gramos de los sólidos insolubles en metanol, obtenidos durante la preparación del extracto metanólico de las semillas de *B. latisepala*, se purificaron dos alcaloides que fueron caracterizados como dihidrosanguinarina (**1**, DHS) y dihidroqueleritrina (**2**, DHQ) de acuerdo con sus datos espectroscópicos.

5.1.1 Elucidación estructural del alcaloide dihidrosanguinarina (**1**, DHS)

A partir de la fracción C se purificaron 1.1 g de sólidos blancos que funden a 193-194 °C. El espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, Figura **10**) de DHS muestra una señal simple en δ 2.62 ppm que integra para tres hidrógenos y que corresponde al grupo metilo unido a nitrógeno. En δ 4.2 ppm se observa un singulete que integra para dos hidrógenos y que corresponde a los protones

bencílicos contiguos a nitrógeno (H₂-6); mientras que, en δ 6.04 y 6.05 ppm se observan dos señales simples que integran para dos hidrógenos cada una y que corresponden a los dos grupos dioximetilenos (H₂-13, H₂-14). En la región de protones aromáticos se observan cuatro señales dobles en δ 6.86 ($J = 8.1$ Hz), 7.30 ($J = 8.4$ Hz), 7.48 ($J = 8.7$ Hz) y 7.69 ($J = 9.0$ Hz), las cuales corresponden a los protones en posición *orto* H-9, H-10, H-12 y H-11, respectivamente. Además, se observan dos señales simples que integran para un hidrógeno cada una y que resuenan en δ 7.11 ppm y 7.67 ppm, las cuales corresponden a los grupos metinos en posición *para* H-1 y H-4, respectivamente. La comparación de los datos experimentales con los reportados en la literatura permitió establecer que la estructura corresponde al alcaloide dihidrosanguinarina (**1**).

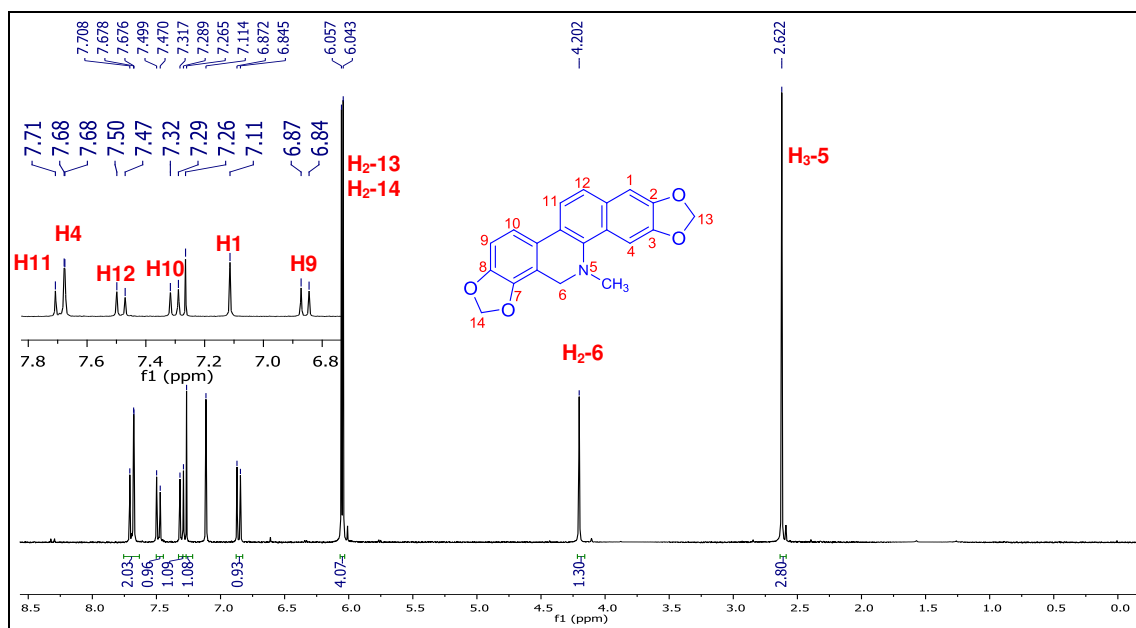


Figura 21. Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) de dihidrosanguinarina (DHS, **1**)

5.1.2 Elucidación estructural del alcaloide dihidroqueleritrina (**2**, DHQ)

A partir de la fracción D se obtuvieron 1.5 g de cristales amarillos que funden a 163-164 °C. El espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , Figura **11**) de DHQ muestra una señal simple en δ 2.59 ppm que integra para tres hidrógenos y que corresponde al grupo metilo unido a nitrógeno. En la región de protones geminales a heteroátomo se observan dos señales simples que integran para tres hidrógenos cada una y que resuenan en δ 3.87 y δ 3.93 ppm, las cuales corresponden a los grupos metoxilos (CH_3O) unidos a C8 y C7, respectivamente. Además, se observa un singulete que integra para dos hidrógenos en δ 4.29 ppm, el cual corresponde a los protones bencílicos contiguos a nitrógeno (CH_2 -6); aunado a una señal simple en δ 6.05 ppm que integra para dos hidrógenos, los cuales corresponden al grupo dioximetileno (OCH_2O -13). En la región de aromáticos se observan cuatro dobletes que resuenan en δ 6.95 ($J = 7.8$ Hz), 7.49 ($J = 9.0$ Hz), 7.52 ($J = 8.7$ Hz) y 7.71 ($J = 8.7$ Hz), los cuales integran para un hidrógeno cada uno y corresponden a los grupos metinos H-9, H-10, H-12 y H-11, respectivamente. También se observan dos singuletes en δ 7.11 y 7.68 ppm, los cuales integran para un hidrógeno y corresponden a los grupos metinos H-1 y H-4. La comparación de los datos experimentales con los reportados en la literatura permitió establecer que la estructura corresponde al alcaloide denominado dihidroqueleritrina (**2**).

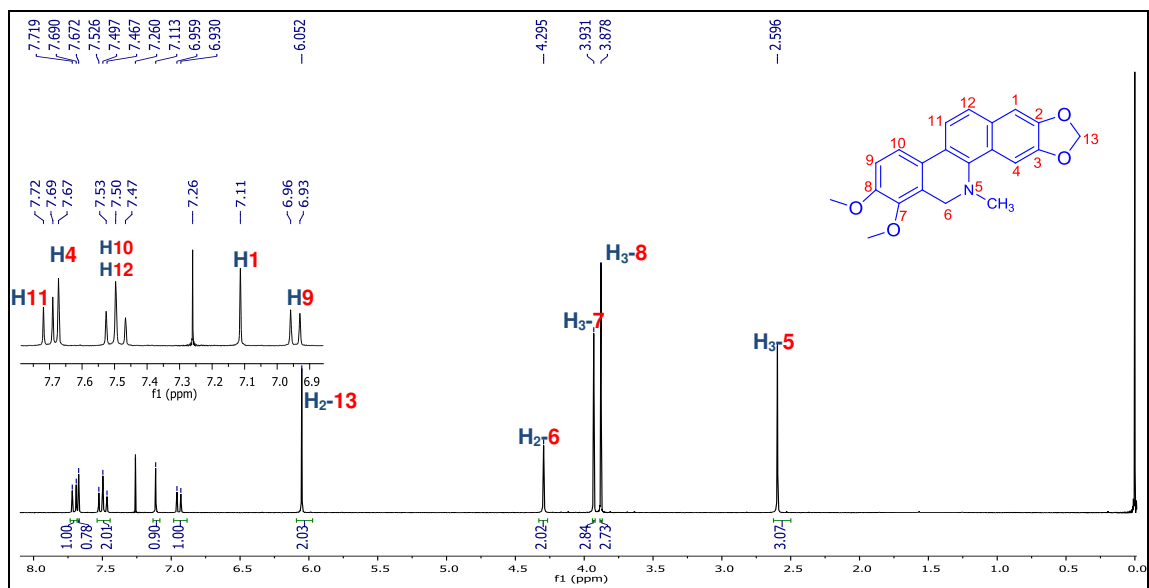


Figura 22. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de dihidroqueleritina (DHQ, 2)

5.2 Síntesis de los derivados de DHS

Después de la obtención del alcaloide DHS a partir de las semillas de *B. latispala*, se realizó el acoplamiento cruzado deshidrogenativo entre DHS (1) y malonato de dimetilo (DMM), siendo considerada la reacción modelo para optimizar las condiciones de reacción.

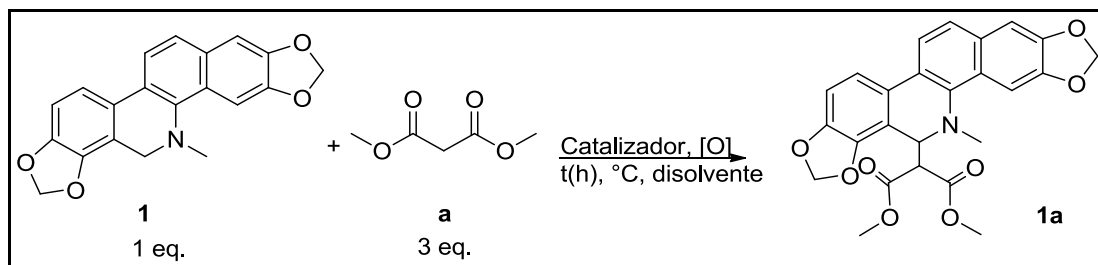


Figura 23. Esquema de optimización de la reacción de ACD entre DHS y malonato de dimetilo.

Considerando las condiciones de reacción reportadas por Li y cols. [96], se exploró el uso de CuBr (10 mol%) como catalizador en condiciones aérobicas a 50 °C, pero el producto **1a** sólo se obtuvo en 33% de rendimiento (Tabla 1, experimento 1). Por lo anterior, se decidió aumentar la cantidad de catalizador de 20 mol% hasta cantidades equimolares, pero la formación de **1a** se incrementó hasta rendimientos moderados de 55 y 57% (Tabla 1, experimentos 2-4). El uso de CuBr en cantidades equimolares no es adecuado para reacciones catalizadas por metales, por lo cual se decidió explorar la incorporación de aditivos y oxidantes para disminuir el CuBr a cantidades catalíticas (5 o 10 mol%). Al usar NBS (*N*-bromosuccinimida) como aditivo no se obtuvo el producto deseado (Tabla 1, experimento 5); en tanto que, el uso de DDQ o H₂O₂ como oxidantes que favorecen la formación del ion iminio, sólo promovieron la formación de **1a** en muy bajos rendimientos (Tabla 1, experimentos 6, 7 y 16). El uso de otro oxidante como el hidroperóxido de *t*-butilo (*t*-BuOOH) en presencia de 10 mol% de CuBr sólo condujo a la formación de **1a** en 15%; mientras que, la misma cantidad de oxidante (1.2 eq.) en presencia de menor cantidad de CuBr (5 mol%) sólo incrementó el rendimiento hasta 20% (Tabla 1, experimentos 8 y 9). Al disminuir la cantidad de oxidante a 1 eq., se observó que el rendimiento de **1a** aumentó hasta 43% (Tabla 1, experimento 10). Después se probaron diferentes disolventes, conservando cantidades catalíticas de CuBr y equimolares de *t*-BuOOH. La mezcla de reacción en tolueno produjo 20% de **1a** (experimento 11); mientras que, en

Tabla 1. Optimización de reacción de ACD entre DHS y malonato de dimetilo.

Exp	Catalizador (mol%)	Oxidante (Eq.)	Tiempo (h)	Temperatura °C	Disolvente	Rendimiento (%)
1	CuBr (10)	-	12	50	THF	33
2	CuBr (20)	-	6	50	THF	38
3	CuBr (25)	-	6	50	THF	55
4	CuBr (1 eq.)	-	3	50	THF	57
5	CuBr (10)	NBS (1.1)	6	70	Tolueno	-
6	CuBr (10)	DDQ (0.5)	24	80	THF	7
7	CuBr (10)	DDQ (1.1)	6	100	THF	10
8	CuBr (10)	<i>t</i> -BuOOH (1.2)	6	50	THF	15
9	CuBr (5)	<i>t</i> -BuOOH (1.2)	6	50	THF	20
10	CuBr (5)	<i>t</i> -BuOOH (1)	6	30	THF	43
11	CuBr (5)	<i>t</i> -BuOOH (1)	8	60	Tolueno	20
12	CuBr (5)	<i>t</i> -BuOOH (1)	6	30	CH ₃ CN	40
13	CuBr (5)	<i>t</i> -BuOOH (1)	4	30	DMF	49
14	CuBr (5)	<i>t</i> -BuOOH (1)	5	30	-	28
15	CuBr (5)	-	24	30	CH₃CN	77
16	CuBr (5)	H ₂ O ₂ (2)	3	30	CH ₃ CN	24
17	FeCl ₂ (10)	-	24	80	THF	-
18	I ₂ (10)	-	24	60	MeOH	13.38
19	I ₂ (10)	-	12	30	MeOH	4.5
20	I ₂ (10)	H ₂ O ₂ (2)	6	50	THF	12

CH₃CN y DMF produjo 40 y 49%, respectivamente (experimentos 12 y 13). Además de evaluar el efecto del disolvente en la producción de **1a**, la reacción se realizó sin disolvente, pero el rendimiento fue muy bajo (experimento 14). A pesar de que el rendimiento de **1a** fue menor en CH₃CN que en DMF (Tabla 1, experimentos 12 y 13), los siguientes experimentos se realizaron en CH₃CN, pero en presencia de aire y peróxido de hidrógeno (Tabla 1, experimentos 15 y 16). El mejor resultado ocurrió en presencia de oxígeno ambiental, obteniéndose **1a** en 77% de rendimiento (Tabla 1, experimento 15). Adicionalmente, se realizaron otros experimentos en presencia de diferentes catalizadores (FeCl₂ y I₂), bajo aire ambiental y desde temperatura ambiente

hasta 80 °C; sin embargo, los rendimientos fueron muy bajos (experimentos 17-20). Considerando los rendimientos obtenidos para **1a**, las mejores condiciones de reacción resultaron: DHS (1 eq.), Nucleófilo (3 eq.), CuBr (5 mol%), CH₃CN (0.5 mL), 30 °C y 24 horas. Estas condiciones de reacción fueron extrapoladas para el ACD de DHS con otros nucleófilos, obteniéndose los derivados correspondientes en rendimientos moderados y buenos (Tabla 2).

Tabla 2. Derivados de DHS (**1**) obtenidos mediante reacciones de ACD.

Exp	1	Nucleófilo	Producto	Rend. (%) ^a	Exp.	1	Nucleófilo	Producto	Rend. (%) ^a
1				77.1	5				55.0
2	1			45.1	6	1	H ₃ C-NO ₂ f		63.0 ^b
3	1			51.3	7	1			39.7
4	1			43.0	8	1			47.8

Condiciones de reacción: DHS (1 eq.), Nucleófilo (3 eq.), CuBr (5 mol%), en CH₃CN a 30°C por 24 horas. ^aRendimientos en base a DHS. ^b Se agregó 5 eq. de nucleófilo.

5.2.1 Elucidación estructural de los derivados de DHS

5.2.1.1 Elucidación estructural de **1a**.

El producto **1a** fue obtenido en 77 % de rendimiento como un sólido blanco que fundió a 228 °C. En el espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , Figura **24**) del compuesto **1a** se observa una señal simple en δ 2.7 ppm con una integración para tres hidrógenos, la cual fue atribuida al grupo metilo unido a nitrógeno $\text{CH}_3\text{-N5}$. Además, se observan dos singuletes en δ 3.58 y 3.68 ppm, los cuales integran para tres hidrógenos cada uno y corresponden a los protones $\text{H}_3\text{-4'}$ y $\text{H}_3\text{-5'}$ presentes en el fragmento del éster malónico. Esto se puede corroborar en el espectro de RMN ^{13}C donde se observan dos señales que resuenan en δ 52.4 y 52.5 ppm, correspondientes a los grupos metoxilo y dos señales en δ 167.0 y 168.0 ppm, correspondientes a los carbonilos C1' y C3' . En el espectro de RMN ^1H se observan dos señales dobles en δ 3.44 y 5.08 ppm, las cuales integran para un hidrógeno cada una. La primera señal doble ($J = 10.8$ Hz) corresponde al protón ácido del éster malónico (H-2'), mientras que la señal doble resonante en δ 5.8 ($J = 11.1$ Hz) corresponde a H-6 . Además, en δ 6.02 y 6.05 se observan dos singuletes anchos que integran para un hidrógeno cada uno y que corresponden a los hidrógenos de los grupos dioximetilenos ($\text{H}_2\text{-14}$), y en δ 6.03 resuena un singulete ancho que integra para dos hidrógenos correspondientes al los hidrógenos de la posición 13 ($\text{H}_2\text{-13}$). En la región de protones aromáticos se observan cuatro señales dobles en δ 6.89 ($J = 8.1$ Hz),

7.34 ($J = 8.1$ Hz), 7.49 ($J = 8.7$ Hz) y 7.70 ppm ($J = 8.7$ Hz), las cuales corresponden a los protones H-9, H-10, H-12 y H-11, respectivamente. Adicionalmente, se observan dos señales simples en δ 7.1 y 7.4 ppm, las cuales integran para un hidrógeno cada una y corresponden a H-1 y H-4, respectivamente. La presencia de carbonos aromáticos se puede corroborar en el espectro de RMN ^{13}C donde se observan 16 señales en la región de 100-148 ppm, excluyendo las dos señales resonantes en δ 101.2 y 101.6 que corresponden a los carbonos C13 y C14 de los grupos dioximetileno.

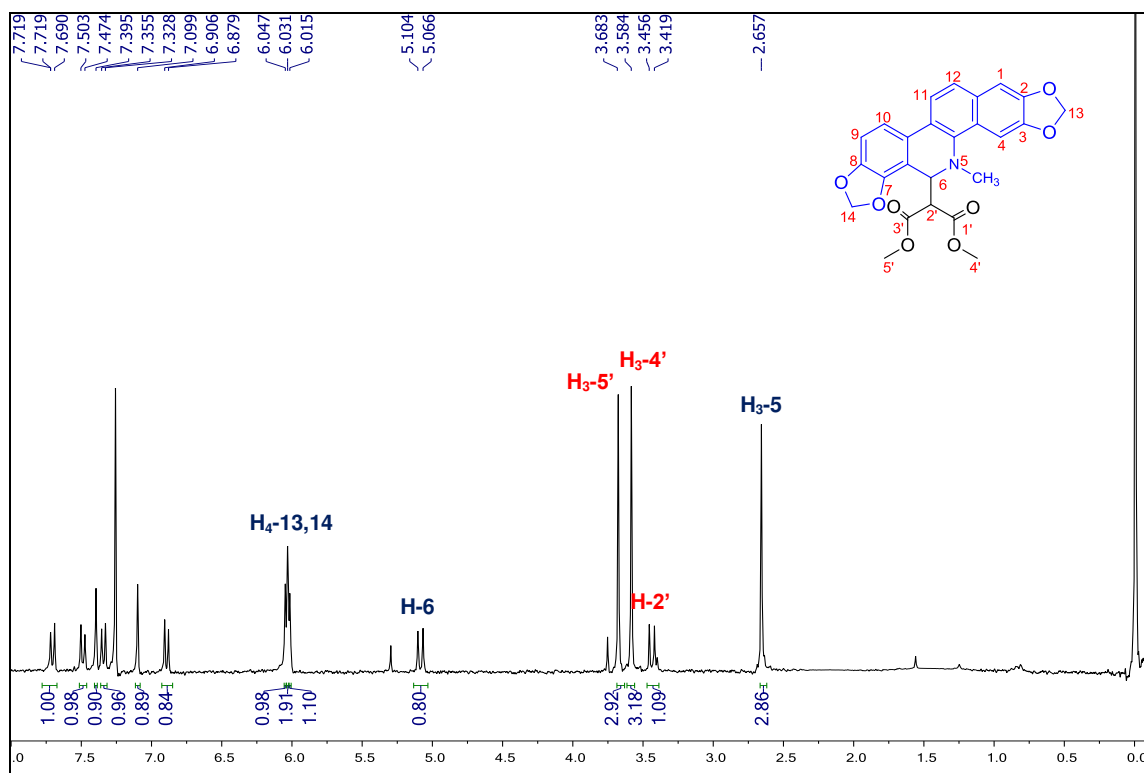


Figura 24. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del compuesto **1a**

5.2.1.2 Elucidación estructural de **1c**.

El producto **1c** fue obtenido en 48% de rendimiento como un sólido beige que fundió a 205 °C. El espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , Figura **25**) del compuesto **1c** muestra una señal simple en δ 2.67 ppm que integra para tres hidrógenos y que corresponde al grupo metilo unido a nitrógeno. Además, se observa una señal simple en δ 5.36 ppm que integra para un hidrógeno y que corresponde a H-6. En δ 6.07 y 6.12 ppm resuenan dos dobletes ($J = 1.2$ y 1.5 Hz respectivamente), los cuales integran para un hidrógenos cada uno y corresponden a los protones de los grupos dioximetilenos (H_2 -13) y, en δ 6.05 se observa un señal simple que integra para dos hidrógenos que corresponden a los protones del dioximetileno de la posición 14. Esto se puede corroborar en el espectro de ^{13}C donde se observan las señales en δ 101.1 y 101.7 que corresponden a los carbonos C13 y C14, respectivamente. En la región de protones aromáticos se observa el patrón de señales característicos de DHS; es decir, se observan cuatro dobletes en δ 6.90, 7.35, 7.51 y 7.73 ppm (H-9, H-10, H-12 y H-11) y dos singuletes en δ 7.11 y 7.77 ppm (H-1 y H-4). En esta misma región se observa un multiplete en el rango de δ 7.17-7.12 que integra para cinco hidrógenos, los cuales corresponden al grupo fenilo del fragmento de fenilacetileno (H1'-H-5'). El fragmento de fenilacetileno también quedó confirmado por las señales de ^{13}C resonantes en δ 77.31 (C7'), 87.68 (C8'), 122.99 (C6'), 127.95 (C2' y C4'), 131.92 (C1', C3' y C5').

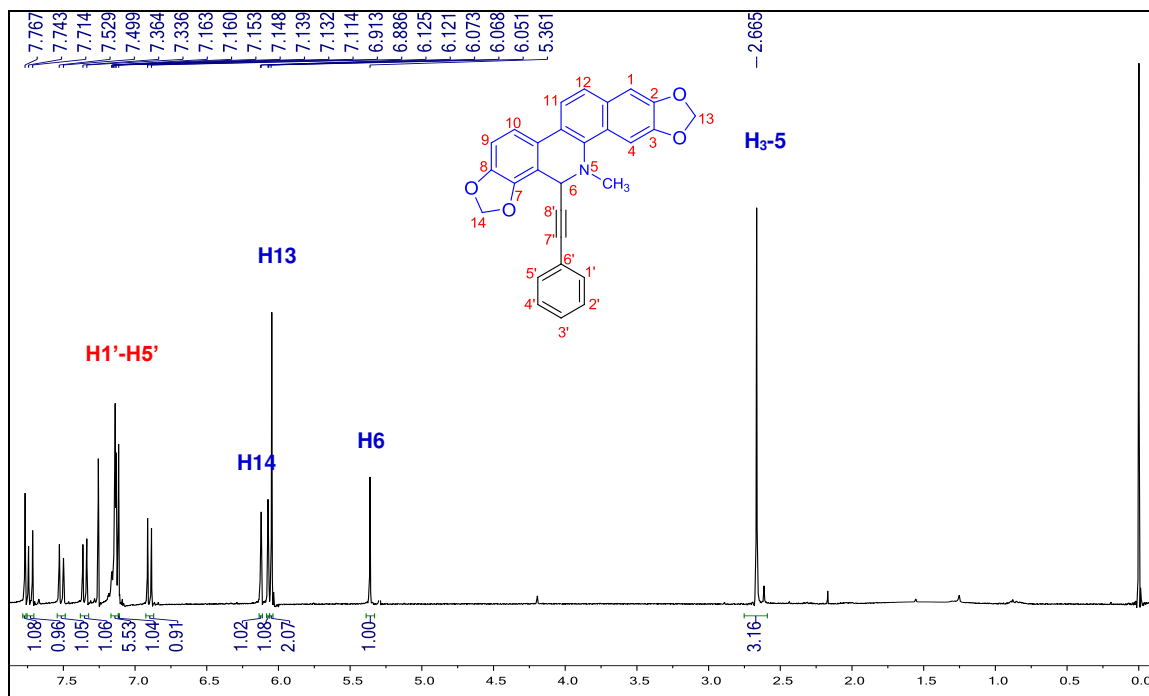


Figura 25. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del compuesto **1c**.

5.2.1.3 Elucidación estructural de **1d**.

El producto **1d** fue obtenido en 43% de rendimiento como un sólido beige que funde a 175-177 °C. En el espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , Figura **26**) del compuesto **1d** se observan dos tripletes en δ 0.95 y 0.99, los cuales integran para tres hidrógenos cada uno y corresponden a los grupos metilos ($\text{H}_3\text{-4}'$ y $\text{H}_3\text{-7}'$) del fragmento de dietilfosfito incorporado a DHS. Dos multipletes resonantes en las regiones comprendidas entre δ 3.50-3.84 y 3.91-4.13 ppm integran para dos hidrógenos cada uno y corresponden a los grupos metilenos ($\text{H}_2\text{-6}'$ y $\text{H}_2\text{-3}'$) del fragmento de fosfito. La unión del grupo fosfito a la posición 6 de DHS quedó confirmada por la señal doble que resuena en δ 4.76 ppm, cuya

constante de acoplamiento de 24.3 Hz se debe al acoplamiento de H-6 con el átomo de fósforo y, en el espectro de RMN ^{13}C (ver anexo) se observa una señal doble que resuena en δ 57.1 ppm la cual presenta una constante de acoplamiento de 166.5 Hz y corresponde al carbono unido a fósforo (C(6)-P). Las señales que resuenan en la región de campo más bajo en el espectro de ^1H corresponden al resto de los protones de DHS. El singlete ancho y doblete ($J = 1.5$ Hz) que se observan en δ 6.06 y 6.10 ppm, respectivamente, corresponden a los grupos dioximetilenos (H₂-13 y H₂-14). Los cuatro dobletes resonantes en δ 6.88 ($J = 8.1$ Hz), 7.31 ($J = 8.1$ Hz), 7.45 ($J = 8.4$ Hz) y 7.65 ppm ($J = 8.7$ Hz) corresponden a los grupos metinos en posición *orto* (H-9, H-10, H-12 y H-11); mientras que, los dos singletes en δ 7.08 y 7.71 ppm corresponden a los grupos metinos en posición *para* (H-1 y H-4).

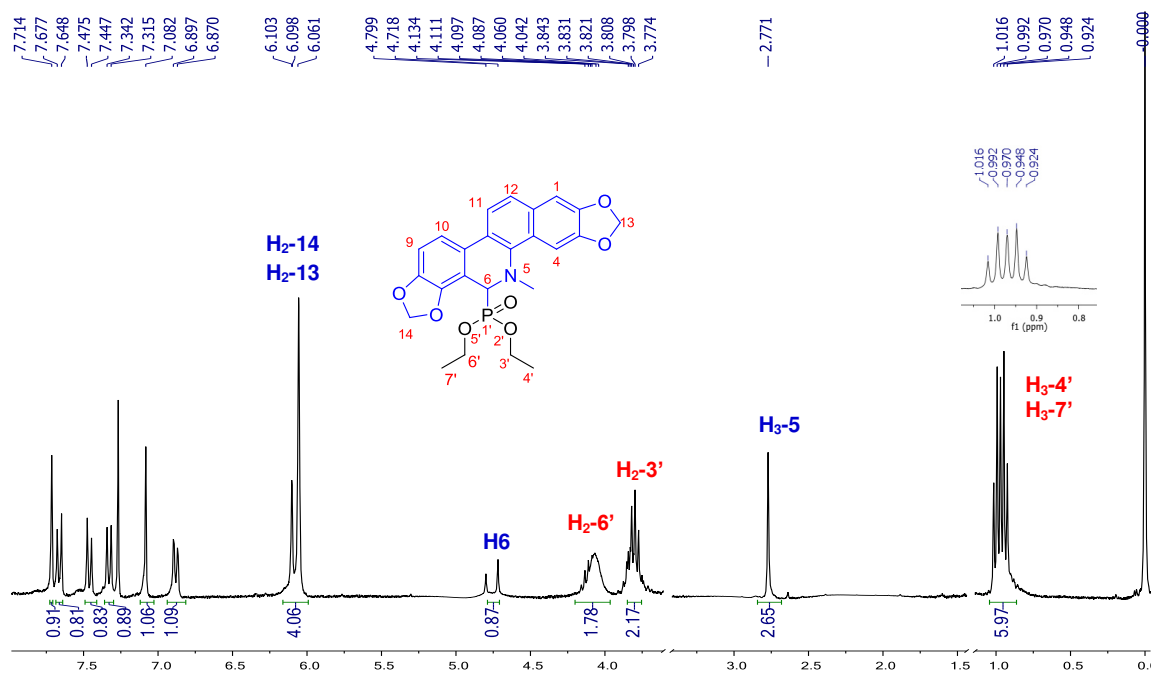


Figura 26. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del compuesto **1d**

5.2.1.4. Elucidación estructural de **1f**.

El producto **1f** fue obtenido en 43% de rendimiento como un sólido blanco que funde a 238-240 °C. En el espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , Figura **27**) del compuesto **1f** se observan las señales que corresponden a DHS: a) en δ 2.69 ppm resuena el singulete atribuido a los hidrógenos del grupo metilo unido a nitrógeno ($\text{CH}_3\text{-N5}$), b) en δ 6.06, 6.09 y 6.10 ppm se observan un singulete y dos dobletes ($J = 1.2$ Hz), respectivamente, correspondientes a los dos grupos dioximetilenos ($\text{H}_2\text{-13}$ y $\text{H}_2\text{-14}$), c) en δ 6.92, 7.38, 7.52 y 7.67 ppm resuenan cuatro dobletes que corresponden a los protones *orto* H-9, H-10, H-12 y H-11, d) y en δ 7.10 y 7.50 ppm se observan dos singuletes atribuidos a los protones *para* H-1 y H-4. La incorporación del fragmento de nitrometano en la posición 6 de DHS quedó confirmada por el doblete de dobletes que resuena en δ 5.17 ($J = 10.8$ y 4.5 Hz) y que corresponde al protón H-6 acoplado a los hidrógenos que se encuentran geminales al grupo nitro ($\text{H}_2\text{-1'}$), los cuales a su vez resuenan como dobletes de dobletes en δ 4.24 ($J = 12.0$, 4.5 Hz) y 4.31 ppm ($J = 11.4$, 11.1 Hz).

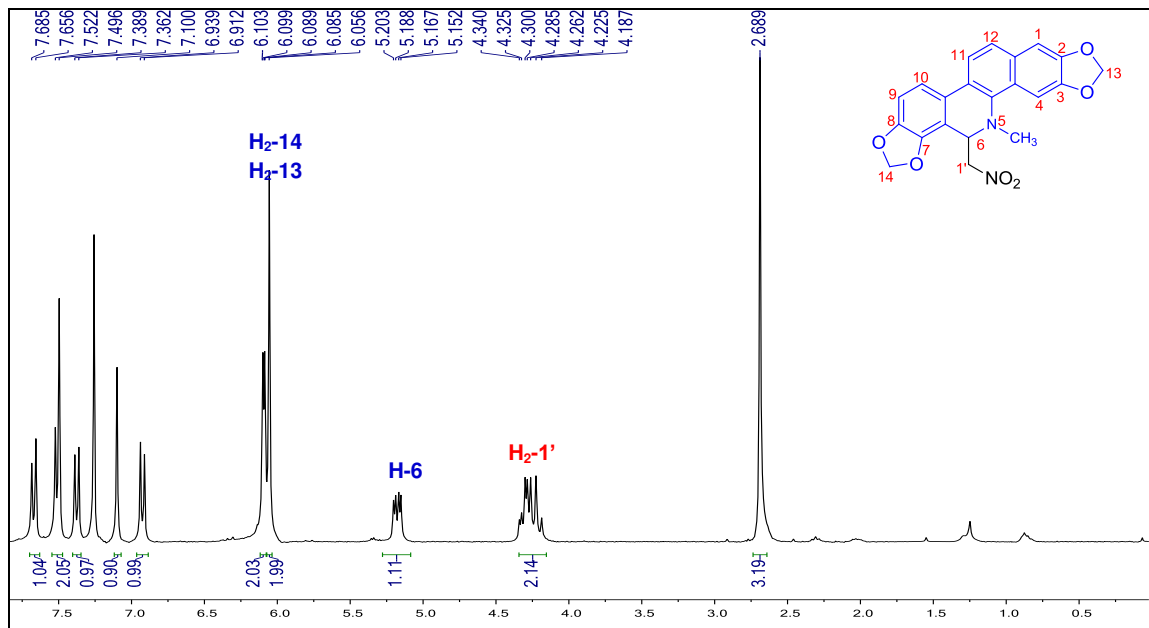


Figura 27. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del compuesto **1f**

5.3 Síntesis de los derivados de DHQ

Después de la obtención del alcaloide DHQ a partir de las semillas de *B. latispala*, se iniciaron una serie de experimentos para optimizar las condiciones de reacción para el acoplamiento cruzado deshidrogenativo (ACD) entre DHQ (**2**) y nitrometano (CH_3NO_2), considerada la reacción modelo.

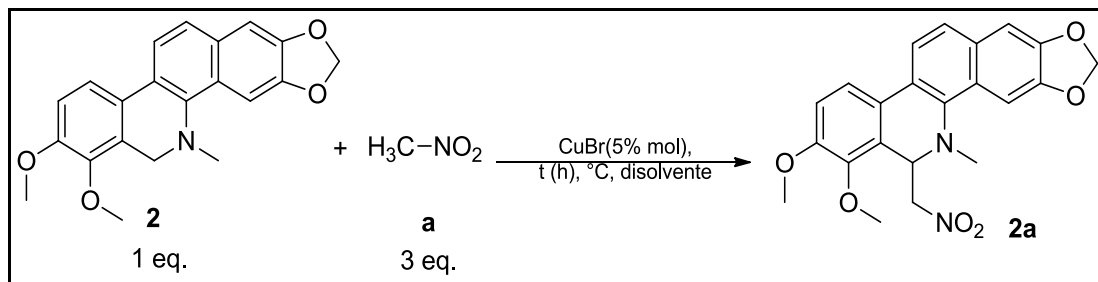


Figura 28. Esquema de reacción de ACD entre DHQ y nitrometano.

Tabla 3. Optimización de reacción de ACD entre DHQ y nitrometano.

Exp.	Tiempo (h)	Temperatura (°C)	Disolvente	Rendimiento (%) ^a
1	6	30	CH₃CN	68
2	6	30	DMF	31
3	12	60	Tolueno	20
4	6	30	Tol:CH ₃ CN	28
5	5	30	THF	49
6	6	30	-	33 ^b
7	24	30→120	H ₂ O	NR
8	6	30	CH ₃ CN	54 ^c

^a Rendimientos aislados en base a DHQ. ^b El nitrometano se usó como disolvente. ^c Se agregó 1 equivalente de *t*BuOOH.

Tomando en cuenta las condiciones de reacción óptimas para el ACD de DHS con dimetilmalonato (Tabla 3), el primer experimento de ACD del alcaloide DHQ con nitrometano fue realizado con 5 mol% de CuBr en presencia de aire ambiental a temperatura ambiente, obteniéndose 68% de rendimiento del producto deseado **2a** (Tabla 3, experimento 1). A pesar de haber obtenido un buen rendimiento, se exploró el efecto del disolvente para incrementar el rendimiento de **2a**. Al utilizar DMF como disolvente, el rendimiento de **2a** disminuyó drásticamente hasta 31% (experimento 2); mientras que, la reacción en tolueno condujo a la obtención de **2a** en 20% (experimento 3). Usando la mezcla de tolueno:CH₃CN (1:1) el rendimiento aumentó a 28% (experimento 4), pero al cambiar el disolvente por THF se incrementó al rendimiento moderado de 49% (experimento 5). Por otro lado, se exploró el uso del nucleófilo CH₃NO₂ como disolvente, pero **2a** se obtuvo en 33% de rendimiento (experimento 6). Con la finalidad de proponer una reacción amigable con el medio ambiente, se exploró la reacción usando agua como disolvente; sin embargo, el producto **2a** no se obtiene a pesar del incremento gradual de temperatura hasta 110 °C

(Tabla **3**, experimento 7). Finalmente, se exploró el uso del agente oxidante *t*-BuOOH en las condiciones del experimento 1; sin embargo, no se logra mejorar el rendimiento (Tabla **3**, experimento 8). Por lo anterior, las condiciones óptimas para la obtención del producto **2a** fueron: DHQ (1 eq.), NO₂CH₃ (3 eq.), CuBr (5 mol%), en CH₃CN a 30°C por 24 horas.

Después de haber obtenido las mejores condiciones de reacción, se exploraron diversos nucleófilos para el ACD con DHQ, obteniéndose los productos deseados en rendimientos bajos, moderados y buenos (Tabla **4**).

Tabla 4. Derivados de DHQ obtenidos por reacción de ACD con diversos nucleófilos^a

Exp	Nucleófilo	Derivado	Rendimiento (%) ^b	Exp	Nucleófilo	Derivado	Rendimiento (%) ^b
1			68	7			45
2			48 ^c	8			47
3			33 ^c	9			43
4			60	10			55
5			43	11			29
6			48	12			39 ^d

^a Condiciones de reacción: DHQ (1 eq.), NO₂CH₃ (3 eq.), CuBr (5 mol%), en CH₃CN a 30°C por 24 horas.

^b Los rendimientos son reportados en base a DHQ.

^c Se agregó 5 equivalentes de nucleófilo

^d La temperatura se aumentó a 70°C

5.3.1 Elucidación estructural de los derivados de DHQ (2).

5.3.1.1 Elucidación estructural del derivado **2a**.

El producto **2a** fue obtenido en 68 % de rendimiento como un sólido blanco que presentó un punto de fusión de 196-197 °C. El espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , Figura **29**) del compuesto **2a** exhibe las señales típicas debidas a los protones de DHQ; es decir, en δ 2.7 ppm se observa el singlete que integra para tres hidrógenos y que corresponde al grupo metilo unido al nitrógeno ($\text{H}_3\text{C-N5}$). A campo más bajo, se observan dos singletes en δ 3.96 y 4.04 ppm que integran para tres hidrógenos cada uno y que corresponden a los grupos metoxilos ($\text{CH}_3\text{O-C7}$ y $\text{CH}_3\text{O-C8}$); mientras que, en δ 6.07 ppm resuena una señal simple que integra para dos hidrógenos y que corresponde al grupo dioximetileno ($\text{H}_2\text{-13}$). Aunado a lo anterior, en el espectro de ^1H se observan cuatro señales dobles en δ 7.05 ($J = 8.7$ Hz), 7.53 ($J = 8.4$ Hz), 7.60 ($J = 8.7$ Hz) y 7.70 ppm ($J = 8.7$ Hz), atribuidas a los protones en posición *orto* H-9, H-10, H-12 y H-11, respectivamente; así como, dos señales simples δ 7.12 y 7.52 ppm que corresponde a los protones en posición *para* H-1 y H-4, respectivamente. La incorporación del nucleófilo CH_3NO_2 a la posición 6 de DHQ quedó confirmada por la señal doble de doble centrada en δ 5.35 ppm ($J = 11.1, 4.2$ Hz), la cual integra para un hidrógeno y corresponde a H-6. La multiplicidad de H-6 es congruente con su acoplamiento a los protones geminales al grupo nitro,

los cuales a su vez resuenan como dobletes de dobletes centrados en δ 4.16 ($J = 11.7, 11.1$ Hz) y 4.30 ppm ($J = 11.7, 4.2$ Hz) (Figura 30).

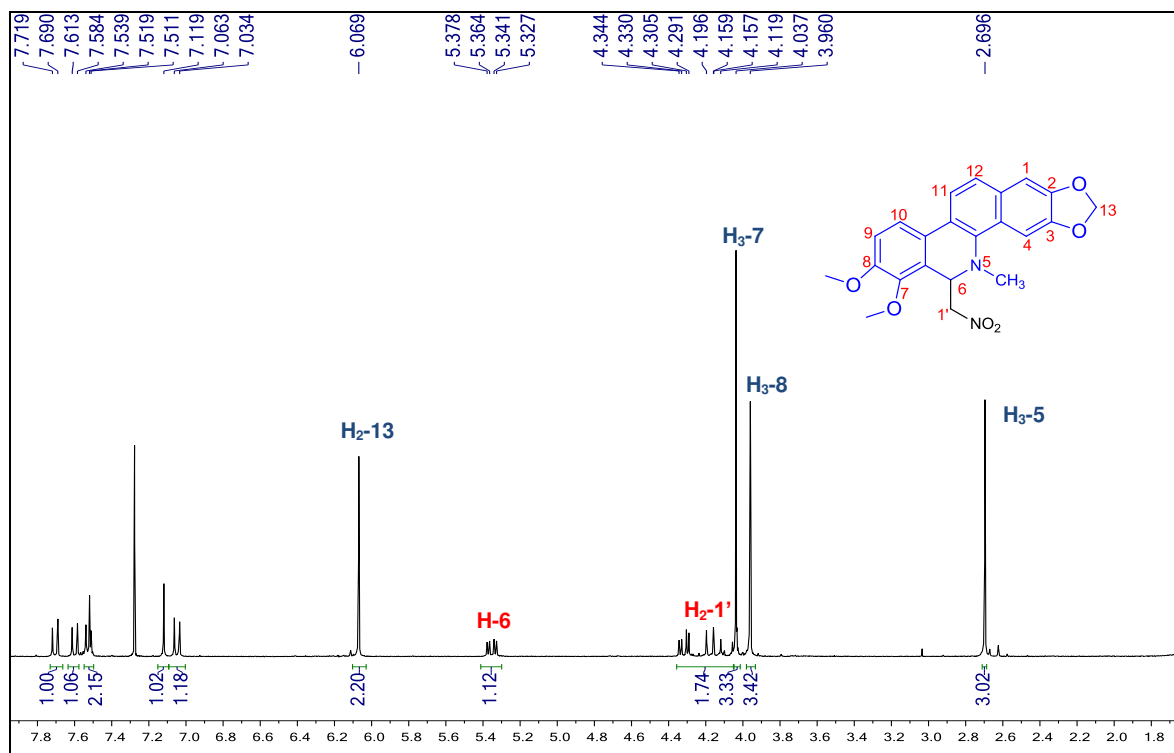


Figura 29. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del compuesto **2a**

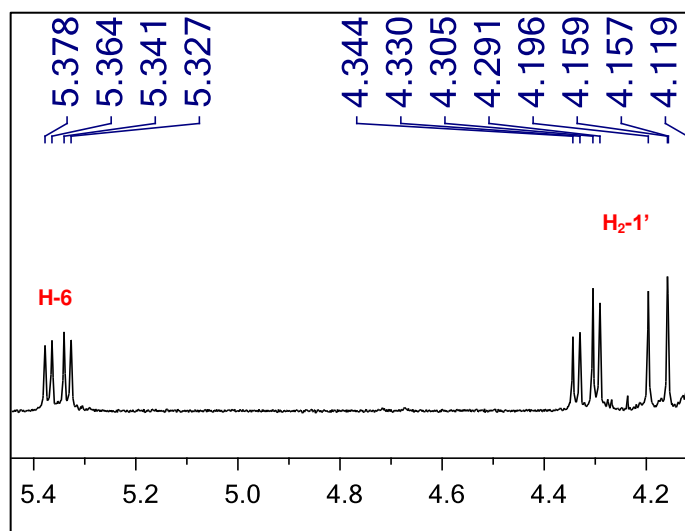


Figura 30. Ampliación del espectro de RMN ^1H del compuesto **2a**

5.3.1.2 Elucidación estructural de **2e**.

El producto **2e** fue obtenido en 43% de rendimiento como un sólido rojo que presentó un punto de fusión de 227-228 °C. El espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , Figura **31**) exhibe las señales que confirman la incorporación del fragmento de 2-metilindol a DHQ; es decir, en δ 1.88 ppm se observa un singulete que integra para tres hidrógenos y que corresponde al grupo metilo unido a un carbono de hibridación sp^2 ($\text{H}_3\text{-C}2'$), en δ 7.41 ppm se observa un singulete ancho que integra para un hidrógeno y que corresponde al hidrógeno unido directamente al nitrógeno del indol ($\text{H-1}'$), en δ 7.02 y 6.94 ppm resuenan dos señales múltiples que corresponden a los protones $\text{H}5'$, $\text{H}6'$ y $\text{H}7'$ y en δ 7.32 ppm se observa una señal doble de doble ($J = 9.0, 4.2$ Hz) que corresponde al protón $\text{H}4'$ del indol. La unión del 2-metilindol a DHQ también quedó evidenciada por la señal simple que resuena en δ 5.89 ppm, la cual integra para un hidrógeno y corresponde a H-6. Las señales remanentes en el espectro de ^1H son congruentes con los protones típicos de DHQ. Los tres singuletes que resuenan en δ 2.83, 3.65 y 3.95 ppm integran para tres hidrógenos cada uno y corresponden a los grupos metilos unidos a nitrógeno ($\text{CH}_3\text{-N}5$) y oxígeno ($\text{CH}_3\text{O-C}7$ y $\text{CH}_3\text{O-C}8$); así como, los singuletes anchos resonantes en δ 5.94 y 6.00, que integra para un hidrógeno cada uno y se atribuyen al grupo dioximetileno ($\text{H}_2\text{-13}$). Adicionalmente, se observan las señales dobles en δ 7.07 ($J = 8.4$ Hz), 7.34 ($J = 8.4$ Hz), 7.61 ($J = 8.7$ Hz) y 7.69 ppm ($J = 8.7$ Hz) de los protones *orto* H-9, H-10, H-12 y H-11, respectivamente;

aunado a, las señales simples resonantes en δ 6.94 y 7.56 ppm de los protones para H-4 y H1, respectivamente.

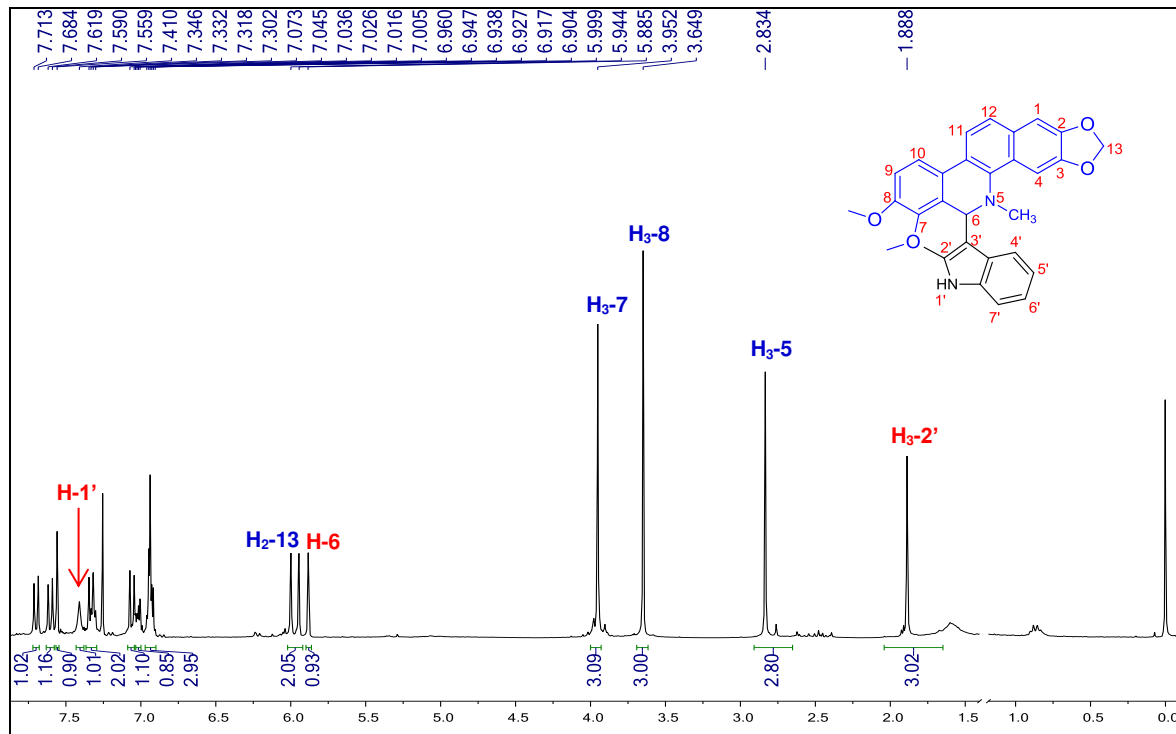


Figura 31. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del compuesto **2e**

5.3.1.3 Elucidación estructural de **2f**.

El producto **2f** fue obtenido en un 48% de rendimiento como un sólido blanco con un punto de fusión de 177-178 $^\circ\text{C}$. En el espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , Figura **32**) del producto **2f** se observa un doblete en δ 5.09 ppm (H-6) con una constante de acoplamiento de 25 Hz que confirma el acoplamiento de H-6 con el átomo de fósforo del fragmento de dietilfosfito incorporado a DHQ.

Las otras señales de los protones del fragmento de dietilfosfito resuenan como dos tripletes centrados en δ 0.93 y 0.97 ppm ($J = 6.9$ Hz, $H_{3-7'}$ y $H_{3-4'}$) y un multiplete en δ 3.87-3.38 ($H_{2-3'}$ y $H_{2-6'}$), los cuales corresponden a los dos grupos etilos. Las señales remanentes corresponden a los protones de DHQ. En el espectro de 1H se observan los cuatro dobletes atribuidos a los protones *orto* H-9, H-10, H-12 y H-11 (δ 6.97, 7.45, 7.47 y 7.68 ppm) y los dos singuletes correspondientes a los protones *para* H-1 y H-4 (δ 7.08 y 7.7 ppm). En la región de protones geminales a heteroátomo se observan tres señales simples en δ 2.72, 3.92 y 4.01 ppm, las cuales integran para tres hidrógenos cada uno y corresponden a los grupos metilos unidos a nitrógeno (CH_3-N5) y oxígeno (CH_3O-C7 y CH_3O-C8); mientras que, en δ 6.05 y 6.04 resuenan dos dobletes ($J = 1.2$ Hz), que integra para dos hidrógenos y se atribuye al grupo dioximetileno (H_{2-13}).

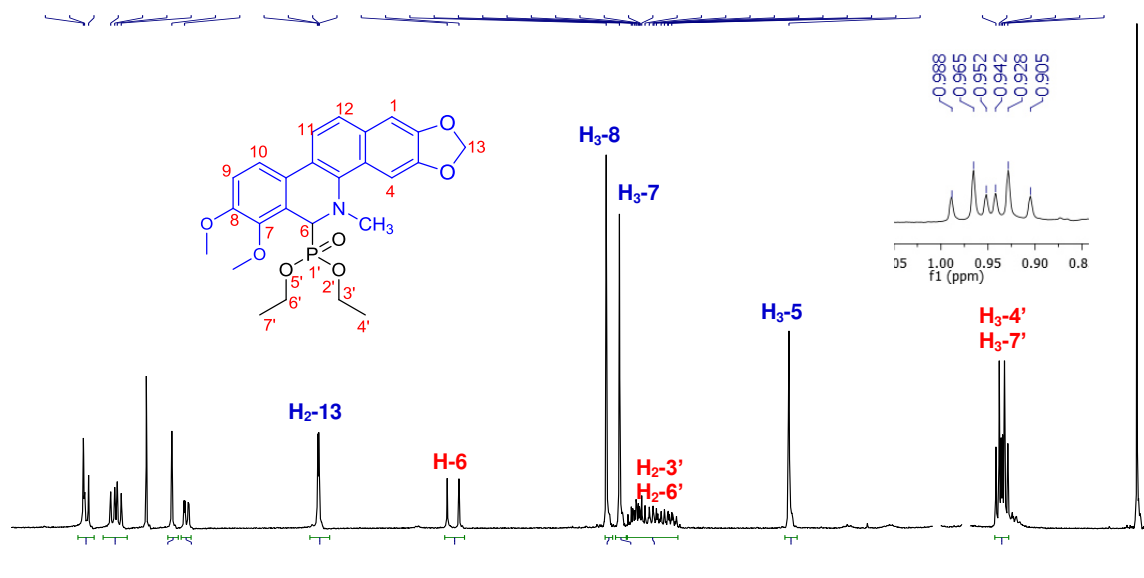


Figura 32. Espectro de RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) del compuesto **2f**

5.3.1.4 Elucidación estructural de **2i**

El producto **2i** fue obtenido en 47 % de rendimiento como una resina amarilla. En el espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , Figura **33**) del compuesto **2i** se observan a campo alto dos señales triples (δ 1.01 y 1.09 ppm) que integran para tres hidrógenos cada una y pertenecen a los protones $\text{H}_{3-5'}$ ($J = 6.9$ Hz) y $\text{H}_{3-7'}$ ($J = 7.2$ Hz) presentes en el fragmento de dietilmalonato. En la región de protones geminales a oxígeno de éster se observan dos señales quintuples centradas en δ 3.97 ($J = 7.5$ Hz) y 4.13 ppm ($J = 7.2$ Hz), las cuales integran para dos hidrógenos cada una y corresponden a los grupos metilenos ($\text{H}_{2-6'}$ y $\text{H}_{2-4'}$) del dietilmalonato. Las señales diagnósticas de que el dietilmalonato quedó incorporado a la posición 6 de DHQ se observan como dos dobletes centrados en δ 3.34 ($J = 11.1$ Hz) y 5.21 ppm ($J = 10.8$ Hz), las cuales corresponden al protón ácido del éster malónico ($\text{H}_{2-2'}$) y a H_{-6} , respectivamente. Por otro lado, en δ 2.69 y en 3.91 ppm se observan dos singuletes con integrales para tres y seis hidrógenos, los cuales son característicos del grupo metilo unido a nitrógeno ($\text{CH}_3\text{-N5}$) y los dos grupos metilos unidos a oxígeno ($\text{CH}_3\text{O-C7}$ y $\text{CH}_3\text{O-C8}$), respectivamente. Asimismo, en δ 6.02 ppm se observa el singulete ancho del grupo dioximetileno (H_{2-13}) y a campo más bajo las señales atribuidas a los protones aromáticos del núcleo de benzo[c]fenantridina. La presencia de cuatro dobletes en δ 6.98, 7.47, 7.53 y 7.73 ppm se atribuyó a los protones aromáticos H_{-9} , H_{-10} , H_{-12} y H_{-11} ,

respectivamente; mientras que, los dos singuletes en δ 7.10 y 7.43 ppm se atribuyeron a los protones H-1 y H-4, respectivamente.

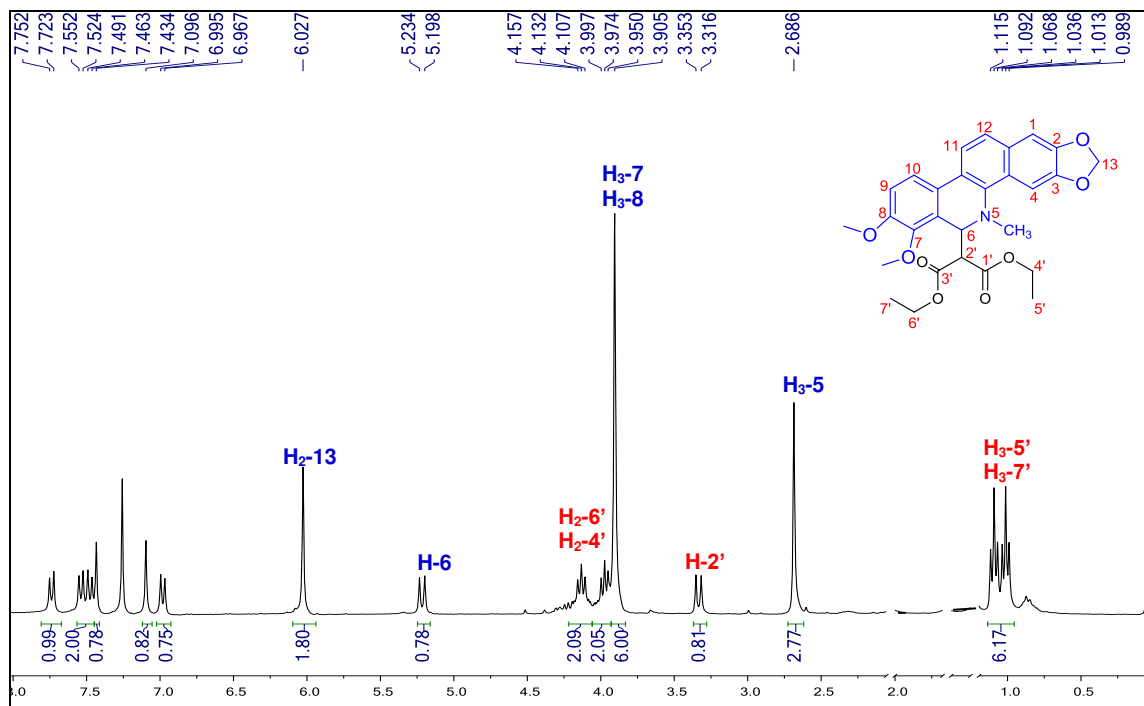


Figura 33. Espectro de RMN ^1H (300 MHz CDCl_3) del compuesto **2i**

5.3.1.5 Elucidación estructural de **2j**.

El producto **2j** fue obtenido en 55 % de rendimiento como un sólido gris que funde a 119-120 °C. El espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , Figura **34**) del compuesto **2j** muestra las señales características de los protones geminales a heteroátomos de DHQ, las cuales resuenan como señales simples en δ 2.64, 3.94, 4.01 y 6.04 ppm y corresponden al grupo metilo unido a nitrógeno (CH_3 -

N5), los dos grupos metoxilos ($\text{CH}_3\text{O-C7}$ y $\text{CH}_3\text{O-C8}$) y el grupo dioximetileno ($\text{H}_2\text{-13}$). Próximo a la señal del dioximetileno resuena un singulete en δ 5.66 ppm, el cual integra para un hidrógeno y corresponde a H-6, confirmándose la unión del fenilacetileno a la posición 6 de DHQ. En la región de campo más bajo del espectro de ^1H se observan los cuatro dobletes atribuidos a los protones *orto* H-9, H-10, H-12 y H-11 (δ 6.99, 7.51, 7.57 y 7.75 ppm) y los dos singuletes correspondientes a los protones *para* H-1 y H-4 (δ 7.11 y 7.79 ppm) del núcleo de benzo[*c*]fenantridina. El multiplete remanente, que resuena entre δ 7.07 y 7.10 ppm, corresponde a los protones aromáticos del fenilacetileno (H-1'–H5'). Dicho fragmento se puede confirmar en el espectro de ^{13}C por las señales resonantes en δ 81 (C7'), 88 (C8'), 123.56 (C6'), 127.14 (C3'), 127.25 (C2' y C4') y 131.1 ppm (C1' y C5').

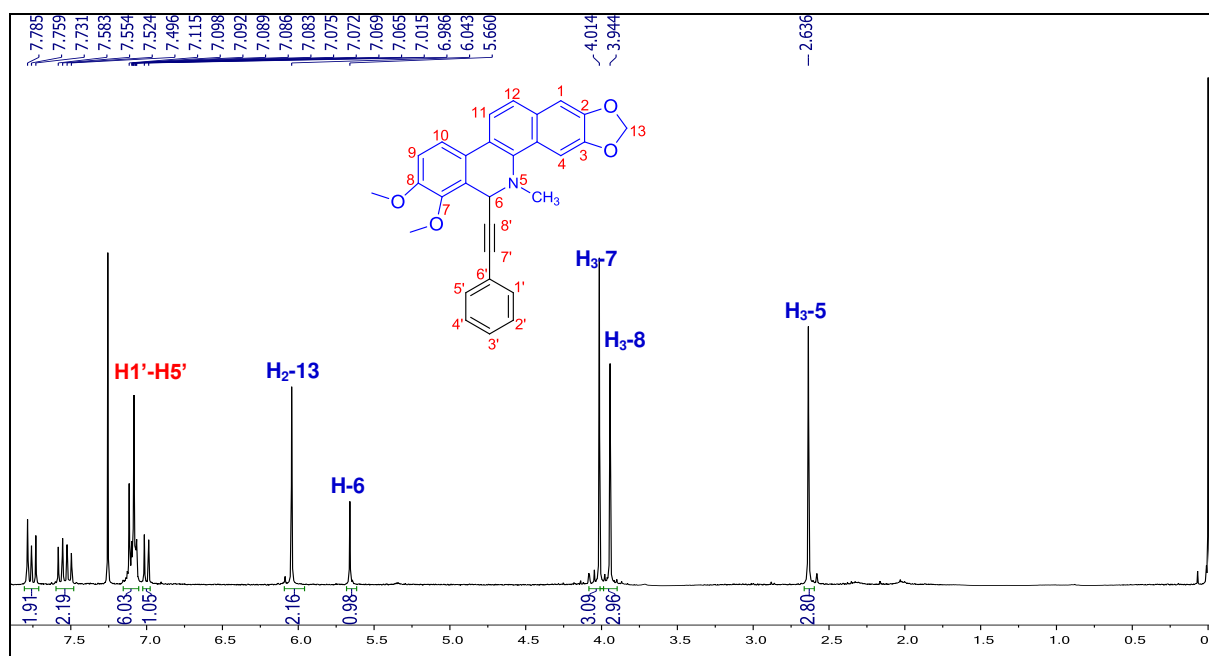


Figura 34. Espectro de RMN ^1H (300 MHz CDCl_3) del compuesto 2j

5.4 Síntesis de la plataforma *N*-metil-5,6-dihidrobenzo[*c*]fenantridina (DHB).

La síntesis de la *N*-metil-5,6-dihidrobenzo[*c*]fenantridina (**3**) se inició con la preparación de *N*-(2-bromobencil)naftilamina (**6**). A partir del 2-bromobenzaldehído (**4**) y de 1-naftilamina (**5**) se preparó el compuesto **6** por aminación reductiva utilizando InCl_3 como catalizador y NaBH_3CN como agente reductor, obteniéndose un rendimiento de 94% (Figura 35). Posteriormente, se realizó una metilación con NaH y CH_3I a temperatura ambiente para la obtención de *N*-metil-(2-bromobencil)naftilamina (**7**), obteniéndose un rendimiento de 89% (Figura 35). Finalmente, se procedió a ciclar el compuesto **7** para la formación de la dihidrobenzofenantridina **3** (Figura 35), la cual se logró por un acoplamiento intramolecular catalizada por paladio y los resultados de los experimentos de optimización se resumen en la Tabla 5.

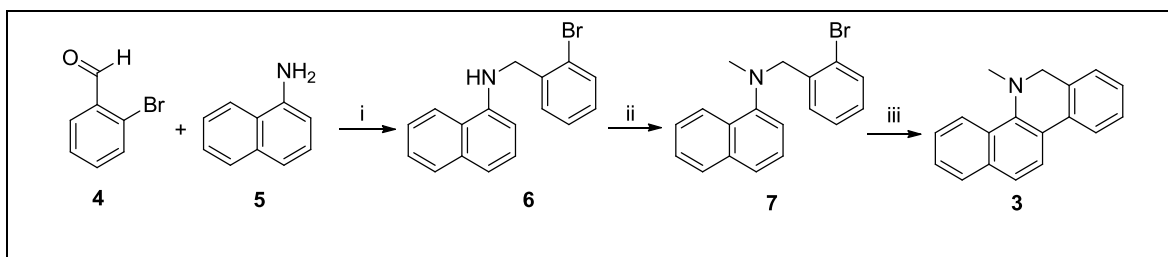


Figura 35. Ruta sintética para la obtención de la *N*-metil-5,6-dihidrobenzo[*c*]fenantridina. Condiciones de reacción: i) a) InCl_3 (0.1 eq), t.a., 2h, CH_2Cl_2 ; b) NaBH_3CN (3.0 eq.), 16h 0°C-t.a. ii) a) NaH (2 eq.) 1h 0-t.a.; b) CH_3I (10 eq.), t.a, 16 h. iii) Compuesto **7** (1 eq.), Cs_2CO_3 (2.0 eq.), $\text{Pd}(\text{AcO})_2$ (30 mol%), tetrafluoroborato de triciclohexilfosfonio (60 mol%), 130°C, 6 h, DMA (20 mL).

Se iniciaron los experimentos usando los catalizadores PdCl₂/PPh₃ o Pd(PPh₃)₄ en presencia de K₂CO₃ a 140°C en *N,N*-dimetilacetamida (DMA), pero no se obtuvo el producto deseado (Tabla 5, experimentos 1-3). Sin embargo, con la combinación de Pd(OAc)₂ y Cy₃P·HBF₄ en presencia de K₂CO₃ se obtuvo el producto deseado en bajos rendimientos (experimentos 4-5), incluso cuando el ligante Cy₃P·HBF₄ se reemplazó por el P(*o*-tol)₃ (experimento 6). La sustitución de K₂CO₃ por otras bases débiles tales como Na₂CO₃, K₃PO₄ y AcONa resultaron ineficaces para favorecer el proceso de acoplamiento (experimentos 7-9), pero el uso de una base fuerte como el *t*-BuOK mejoró ligeramente el rendimiento del producto **3**. La reacción resultó más eficiente cuando se disminuye la temperatura a 130°C y cuando la DMA se reemplaza por tolueno (experimentos 10-12). Curiosamente, el compuesto **3** se obtiene en mejores rendimientos (42 y 45%) cuando se usa como base el Cs₂CO₃ (2 o 2.5 equiv.) en DMA a 140 °C (experimentos 13-14). Cuando la reacción de acoplamiento se realizó a 130 °C por 12 h, el rendimiento disminuye ligeramente de 45% a 40% (experimento 15). Por otro lado, los experimentos revelaron que un tiempo corto de reacción (6 h) y mayor cantidad de catalizador (30 mol%) y ligante (60 mol%) son factores críticos para incrementar el rendimiento del producto **3** de 40% a 79% (experimento 16).

Por lo tanto, las condiciones óptimas para la reacción de acoplamiento intramolecular biarilo del compuesto **7** se lograron con 1 equivalente de **7**, 30 mol% de Pd(OAc)₂, 60 mol% de Cy₃P·HBF₄ en DMA a 130 °C por 6 h.

Tabla 5. Optimización de la reacción de Heck para la preparación de DHB (**3**).^a

Experimento	Catalizador	Ligante	Base	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Rendimiento (%)
1	PdCl ₂	PPh ₃	K ₂ CO ₃	140	24	NR
2	PdCl ₂	PPh ₃	K ₂ CO ₃	140	24	NR ^b
3	Pd(PPh ₃) ₄	-	K ₂ CO ₃	140	24	NR
4	Pd(AOc) ₂	Cy ₃ P·HBF ₄	K ₂ CO ₃	140	24	9 ^c
5	Pd(AOc) ₂	Cy ₃ P·HBF ₄	K ₂ CO ₃	140	24	16 ^d
6	Pd(AOc) ₂	P(<i>o</i> -tol) ₃	K ₂ CO ₃	140	24	8 ^d
7	Pd(AOc) ₂	Cy ₃ P·HBF ₄	Na ₂ CO ₃	140	24	NR
8	Pd(AOc) ₂	Cy ₃ P·HBF ₄	K ₃ PO ₄	140	24	NR
9	Pd(AOc) ₂	Cy ₃ P·HBF ₄	AcONa	140	24	NR
10	Pd(AOc) ₂	Cy ₃ P·HBF ₄	<i>t</i> -BuOk	140	12	18
11	Pd(AOc) ₂	Cy ₃ P·HBF ₄	<i>t</i> -BuOk	130	12	25
12	Pd(AOc) ₂	Cy ₃ P·HBF ₄	<i>t</i> -BuOk	110	12	36 ^{d,e}
13	Pd(AOc) ₂	Cy ₃ P·HBF ₄	Cs ₂ CO ₃	140	24	42
14	Pd(AOc) ₂	Cy ₃ P·HBF ₄	Cs ₂ CO ₃	140	24	45 ^d
15	Pd(AOc) ₂	Cy ₃ P·HBF ₄	Cs ₂ CO ₃	130	12	40
16	Pd(AOc) ₂	Cy ₃ P·HBF ₄	Cs ₂ CO ₃	130	6	79 ^{d,f}

^aCondiciones de reacción: Compuesto **7** (1 equiv), catalizador (20 mol%), ligante (40 mol%), base (2 equiv), DMA (0.2 M). ^bLa reacción fue llevado a cabo en dimetilformamida. ^cCatalizador (10 mol%). ^dBase (2.5 equiv). ^eSe usó tolueno como disolvente. ^fCatalizador (30 mol%) y ligante (60 mol%).

Así, se optimizaron las condiciones de reacción para la preparación de la plataforma *N*-metil-5,6-dihidrobenzo[*c*]fenantridina (DHB) **3**, obteniéndose un 65 % de rendimiento total. Cabe destacar que, la síntesis de la plataforma **3** se logró en sólo 3 pasos de reacción; mientras que, Ichiya y Padwa reportan metodologías que involucran mayor número de pasos (5 pasos de reacción) [96, 97]. Aunado a lo anterior, en la presente investigación se obtuvo la plataforma **3** en mayor rendimiento que lo reportado por Ichiva y Padwa (47 y 15%, respectivamente). Por ello, la metodología desarrollada en este proyecto es una opción viable y eficiente para la preparación de la plataforma sintética **3**.

5.5 Síntesis de los derivados de *N*-metil-5,6-dihidrobenzo[*c*]fenantridina

Después de haber obtenido la plataforma **3**, se iniciaron una serie de experimentos para optimizar las condiciones de reacción para el acoplamiento cruzado deshidrogenativo (ACD) entre **3** e indol, la cual sirvió como la reacción modelo (Figura **36**).

Basándonos en las condiciones de reacción reportadas por Prabhu y cols., se iniciaron los experimentos usando I₂ como catalizador en disolventes polares (MeOH y DCM/MeOH) bajo condiciones aeróbicas a 60 °C, pero no se obtuvo el producto deseado (Tabla **6**, experimentos 1 y 2). Por lo anterior, se exploraron catalizadores de Fe y Ru (FeCl₂, FeCl₃ o RuCl₃) en combinación con el oxidante hidroperóxido de *tert*-butilo o peróxido de hidrógeno, pero el producto **3a** se obtuvo en bajos rendimientos (experimentos 3-5).

Considerando que la DDQ (2,3-Dichloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona) ha sido reportada por ser un eficiente reactivo que promueve reacciones de ACD, se optó por usarlo en nuestros siguientes experimentos. Primero, la quinona DDQ se utilizó sin catalizador usando tolueno como disolvente, pero el compuesto **3a** se obtuvo en un 30% de rendimiento (experimento 6). No obstante, la combinación de DDQ con 20 mol% de CuBr mejoró el rendimiento a 45%

(experimento 7). Para evitar la baja disolución de DDQ bajo las condiciones ensayadas se usó una mezcla de CH₃CN/tolueno (1/1) como disolvente.

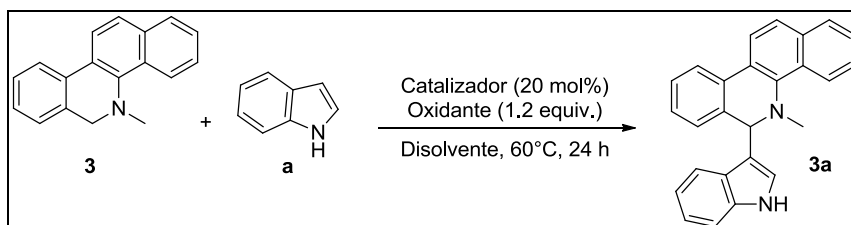


Figura 36. Esquema de reacción de ACD entre DHB e indol.

Tabla 6. Optimización de condiciones de reacción para la síntesis del producto **3a**.

Experimento	Catalizador	Oxidante	Disolvente	Rendimiento (%)
1	I ₂	O ₂	DCM/MeOH	-
2	I ₂	O ₂	MeOH	-
3	RuCl ₃	O ₂	MeOH	20
4	FeCl ₃	<i>t</i> -BuOOH	DCE	13 ^b
5	FeCl ₂	H ₂ O ₂	MeOH	7
6	-----	DDQ	PhCH ₃	30
7	CuBr	DDQ	PhCH ₃	45
8	CuBr	DDQ	CH ₃ CN/PhCH ₃	60 ^c
9	CuBr	-----	CH ₃ CN/PhCH ₃	31
10	CuBr	DDQ	CH ₃ CN/PhCH ₃	31 ^d
11	CuBr	DDQ	CH ₃ CN/PhCH ₃	8 ^e

^a Condiciones de reacción: Compuesto **3** (1 eq), nucleófilo **a** (1.2 eq.), oxidante (1.2 eq.), catalizador (20 mol%), disolvente (0.2 M), 60 °C, 24 h. ^b Se agregó 2 eq. de *t*-BuOOH. ^c La reacción se llevó a cabo a 80 °C. ^d Catalizador (10 mol %). ^e Catalizador (3 mol %).

Para nuestra sorpresa, la reacción de ACD entre la plataforma **3** e indol procedió en buen rendimiento (60%) al mejorar la solubilidad de la DDQ y al aumentar la temperatura (experimento 8). Finalmente, se realizaron experimentos para examinar el uso de CuBr en la ausencia de DDQ y para determinar la cantidad mínima de catalizador de CuBr requerida para obtener la reacción de ACD deseada. En la ausencia de DDQ, el catalizador de cobre moderadamente promueve el acoplamiento entre la plataforma **3** e indol (experimento 9). Cuando la cantidad de CuBr disminuye a 10 y 3 mol%, los rendimientos de la reacción decrecen drásticamente (experimentos 10 y 11). Por lo anterior, las condiciones óptimas para iniciar la obtención de los derivados sintéticos resultaron: 1 equiv. del compuesto **3**, 20 mol% de CuBr, 1.2 equiv. de DDQ en CH₃CN/tolueno (1/1) a 60°C por 24 horas.

Para explorar el alcance de esta metodología, se incorporaron varios tipos de nucleófilos en la plataforma **3**, tal como se muestra en la tabla **7**.

Tabla 7. Reacción de ACD entre DHB y diversos nucleófilos.

Exp.	3	Nucleófilo	Producto	Rend. (%) ^b	Exp.	3	Nucleófilo	Producto	Rend. (%) ^b
1				60	9	3			30
2	3			56	10	3			41
3	3			39	11	3	$\text{H}_3\text{C-NO}_2$ k		55 ^d
4	3			40 ^c	12	3			32 ^d
5	3			40 ^c	13	3			25 ^d
6	3			22	14	3			42
7	3			20	15	3			60
8	3			18	16	3			70

Condiciones de reacción: 1 equiv. del compuesto **3**, 20 mol% de CuBr, 1.2 equiv. de DDQ en CH₃CN/tolueno (1/1) a 60°C por 24 horas. ^bLos rendimientos están basados en DHB. ^cSe agregaron 1.2 equiv. de Cs₂CO₃. ^dSe agregaron 2 equiv. de nucleófilo.

5.5.1 Elucidación estructural de los derivados de DHB.

5.5.1.1 Elucidación estructural del derivado **3a**.

El producto **3a** fue obtenido en 60% de rendimiento como una resina naranja. El espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , Figura **37**) del compuesto **3a** exhibe un singlete en δ 2.99 ppm que integra para tres hidrógenos y corresponde al grupo metilo unido a nitrógeno ($\text{CH}_3\text{-N5}$). A campo más bajo se encuentra otro singlete en δ 5.64 ppm, el cual integra para un hidrógeno y corresponde a H-6, cuyo desplazamiento químico se justifica por el efecto desprotector que induce el fragmento de indol incorporado a la posición 6. Muy próximo a la señal de H-6 se encuentra un singlete ancho que resuena en δ 6.16 ppm y se atribuye al hidrógeno unido a nitrógeno en el fragmento de indol. En la región de campo más bajo del espectro de ^1H se observan cinco dobletes en δ 7.70, 7.90, 7.93, 8.12 y 8.38 ppm, los cuales integran para un hidrógeno y corresponden a H-12, H-1, H-11, H-4' y H-4, respectivamente. En la misma región aromática se observa un multiplete comprendido entre δ 7.09 y 7.14 ppm, el cual integra para dos hidrógenos y se atribuye a H-5' y H-2'. Adicionalmente, se observa otro multiplete en la región de δ 7.33 a 7.56 ppm, la cual integra para ocho hidrógenos correspondientes a H-6', H-7', H-2, H-3, H-7, H-8, H-9 y H-10.

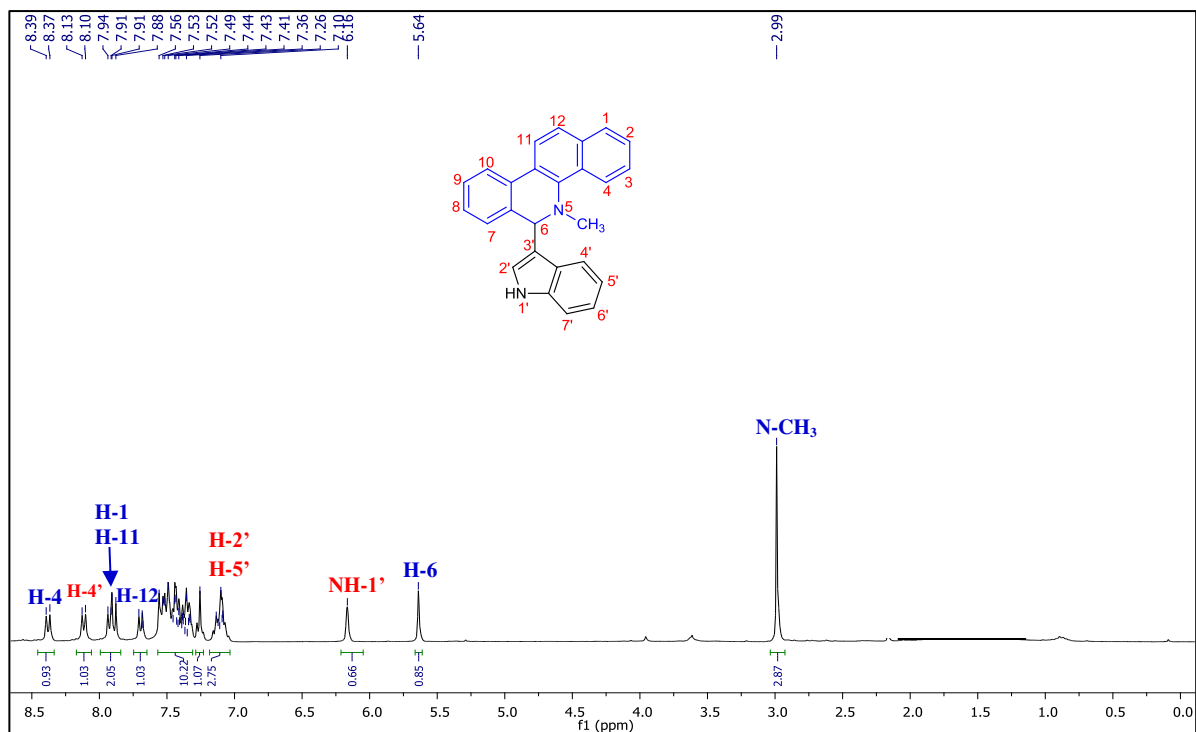


Figura 37. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del compuesto **3a**

5.5.1.2 Elucidación estructural del derivado **3c**.

El producto **3c** fue obtenido en 39% de rendimiento como una resina amarilla. En el espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , Figura **38**) del compuesto **3c** se observan las señales correspondientes al fragmento de pirrol incorporado en la posición 6 de DHB; es decir, se observan tres singuletes anchos en δ 3.65, 5.49 y 6.45 ppm, los cuales integran para un hidrógeno y corresponden al protón unido a nitrógeno (NH), H-3' y H-1', respectivamente. Aunado a lo anterior, en δ 5.85 ppm se observa un doblete ancho ($J = 2.7$ Hz) que integra para un hidrógeno y corresponde a H-4' del fragmento de pirrol. En lo que respecta al núcleo de benzo[c]fenantridina, el singulete resonante en δ 5.33 ppm confirma

que el pirrol fue incorporado a la posición 6 de DHB. Por otro lado, a campo más bajo se observan cuatro dobletes centrados en δ 8.47 ($J = 8.4$ Hz), 7.89 ($J = 8.1$ Hz), 7.86 ($J = 9.0$ Hz), y 7.80 ppm ($J = 8.1$ Hz), los cuales corresponden a los protones aromáticos H-4, H-11, H-1 y H-12, respectivamente. Asimismo, en el espectro de ^1H se observan dos multipletes en los rangos comprendidos entre δ 7.50-7.62 y 7.40-7.49 ppm, de los cuales el primero integra para dos hidrógenos (H-7 y H-10) y el segundo para cuatro hidrógenos (H-3, H-8, H-2 y H-9).

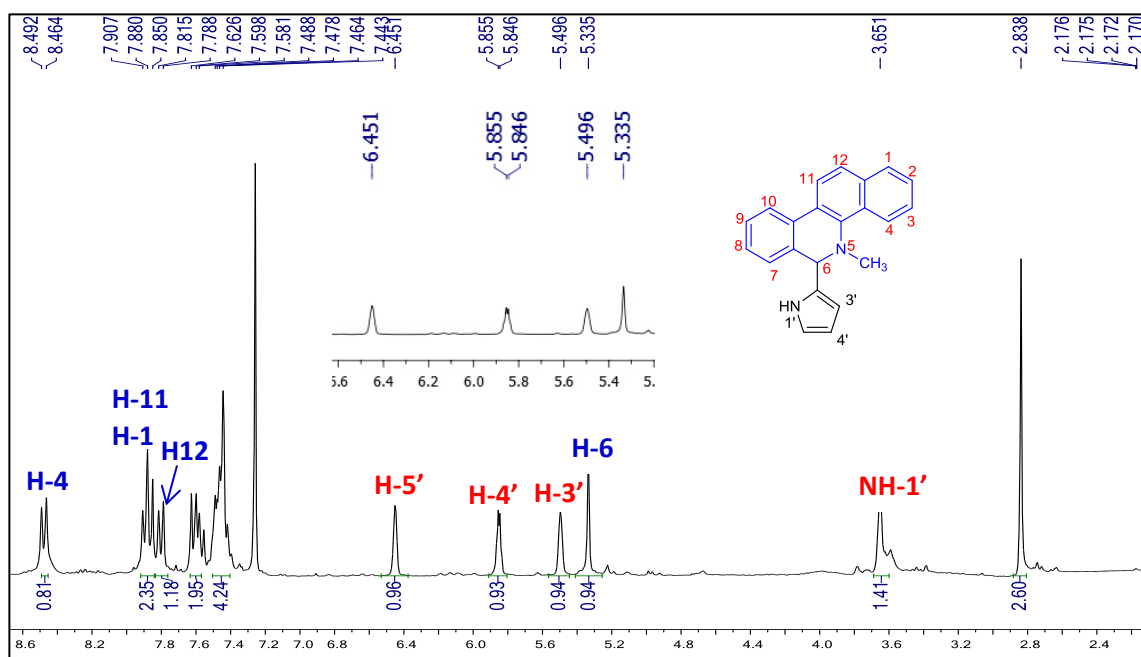


Figura 38. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del compuesto **3c**

5.5.1.3 Elucidación estructural de **3d**.

El producto **3d** fue obtenido en 40% de rendimiento como una película amarilla. La incorporación del malonato de dimetilo a DHB se confirmó, en el espectro de RMN ^1H de **3d** (Figura **39**), por las dos señales dobles que resuenan en δ 3.44 (H-2) y 4.94 ppm (H-6'), las cuales presentan una $J = 11.4$ Hz que es típica de la conformación antiperiplanar que adoptan H-2 con respecto de H-6'. Además del doblete asignado a H-2', en el espectro de ^1H se observan los dos singuletes que corresponden a los grupos metoxilos del malonato de dimetilo en δ 3.53 y 3.62 ppm (H₃-4 y H₃-5). Las señales remanentes del espectro de ^1H corresponden al núcleo de benzo[c]fenantridina. En δ 2.75 ppm resuenan los protones del grupo metilo unido a nitrógeno (CH₃-N5') como un singulete que integra para tres hidrógenos; mientras que, a campos muy bajos resuenan los protones aromáticos de DHB como tres grupos de señales dobles en δ 7.70 ($J = 8.7$ Hz, H-12'), 7.88 ($J = 7.8$ Hz, H-1') y 7.94 ($J = 8.7$ Hz, H-11') y dos dobletes de dobletes en δ 7.83 ($J = 2.1, 7.2$ Hz, H-10') y 8.11 ppm ($J = 2.4, 8.1$ Hz, H-4').

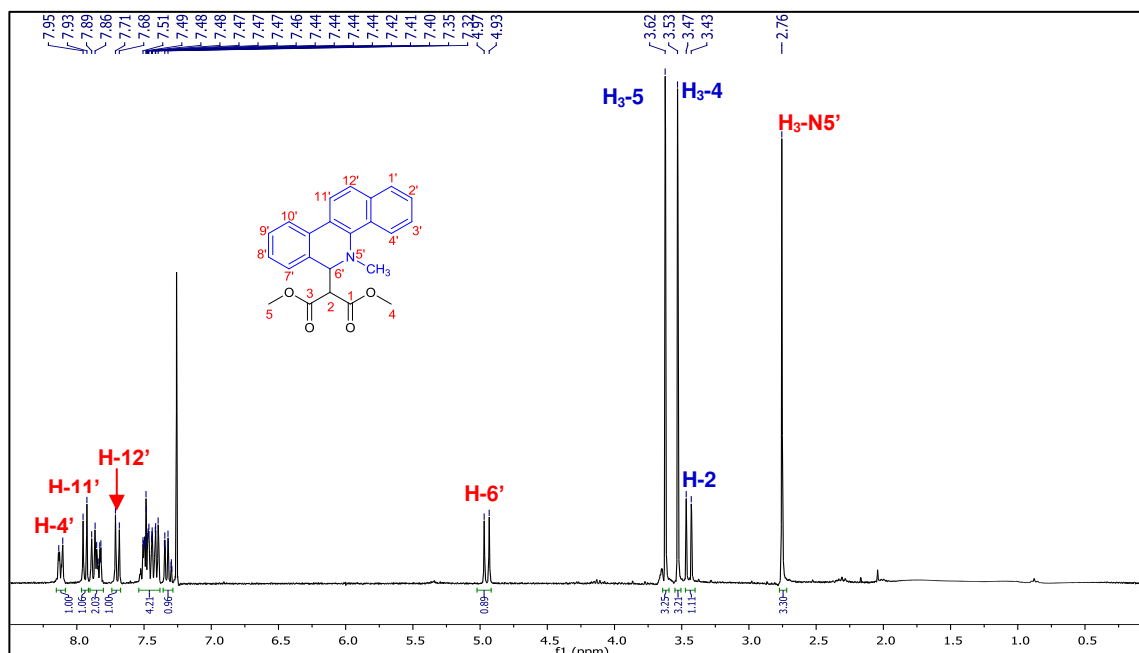


Figura 39. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del compuesto **3d**

5.5.1.4 Elucidación estructural de **3i**.

El producto **3i** fue obtenido en 41% de rendimiento como una resina amarilla. En el espectro de RMN ^1H , (Figura **40**) del compuesto **3i** se observa un doblete centrado en δ 4.61 ppm que integra para un hidrógeno y que muestra una $J = 24.6$ Hz, por lo cual se comprueba que H-6 se encuentra geminal al átomo de fósforo del grupo fosfito incorporado a la posición 6 de DHB. Además, se observa un triplete centrado en δ 0.95 ppm que integra para seis hidrógenos y que corresponde a los dos grupos metilos ($\text{H}_3\text{-7}'$ y $\text{H}_3\text{-4}'$) del fragmento de dietilfosfito, aunado al multiplete (δ 3.70-3.80 ppm) que integra para cuatro hidrógenos y que se atribuye a los grupos metilenos ($\text{H}_2\text{-3}'$ y $\text{H}_2\text{-6}'$) del mismo fragmento. En el espectro de ^1H se observan cinco dobletes en δ 7.66 ($J = 8.7$

Hz), 7.81 ($J = 7.8$ Hz), 7.83 ($J = 8.1$ Hz), 7.89 ($J = 8.4$ Hz) y 8.38 ($J = 8.4$ Hz), los cuales integran para un hidrógeno y corresponden a H-12, H-10, H-1, H-11 y H-4, respectivamente. Los otros protones aromáticos del núcleo de benzo[*c*]fenantridina resuenan como un multiplete en la región δ 7.34-7.52 ppm, el cual integra para cinco protones atribuidos a H-2, H-3, H-7, H-8 y H-9. Finalmente, en la región de campo alto se observa un singulete (δ 2.75 ppm) que integra para los tres protones del grupo metilo unido a nitrógeno ($\text{CH}_3\text{-N5}$).

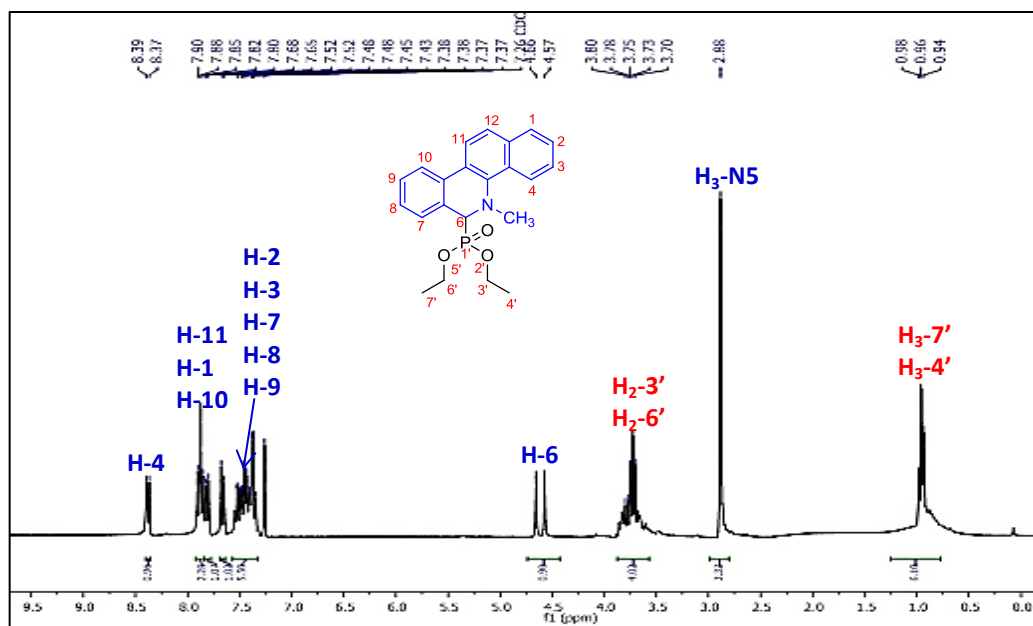


Figura 40. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del compuesto **3i**

5.5.1.5 Elucidación estructural de **3k**

El producto **3k** fue obtenido en 55% de como una película amarilla tenue. Con el espectro de RMN ^1H (Figura 41) del producto **3k** se confirmó la incorporación

del fragmento de nitrometano a la posición 6 de DHB con la presencia de la señal triple (δ 5.03 ppm, $J = 7.8$ Hz) que integra para un hidrógeno y la señal doble (δ 4.30 ppm, $J = 7.8$ Hz) que integra para dos hidrógenos, las cuales corresponden a H-6 y H₂-1', respectivamente. Las señales remanentes en el espectro de ¹H corresponden a los protones del núcleo de *N*-metilbenzo[*c*]fenantridina. El grupo metilo unido a nitrógeno resuena como un singulete en δ 2.77 ppm; mientras que, los protones aromáticos aparecen como cinco dobletes en δ 7.73 ($J = 8.7$ Hz, H-12), 7.85 ($J = 7.5$ Hz, H-10), 7.92 ($J = 8.7$ Hz, H-11), 7.94 ($J = 7.8$ Hz, H-1) y 8.22 ppm ($J = 7.5$ Hz, H-4) y como dos señales múltiples en las regiones δ 7.48-7.53 (H-2, H-3 y H-9) y 7.39-7.41 ppm (H-7 y H-8).

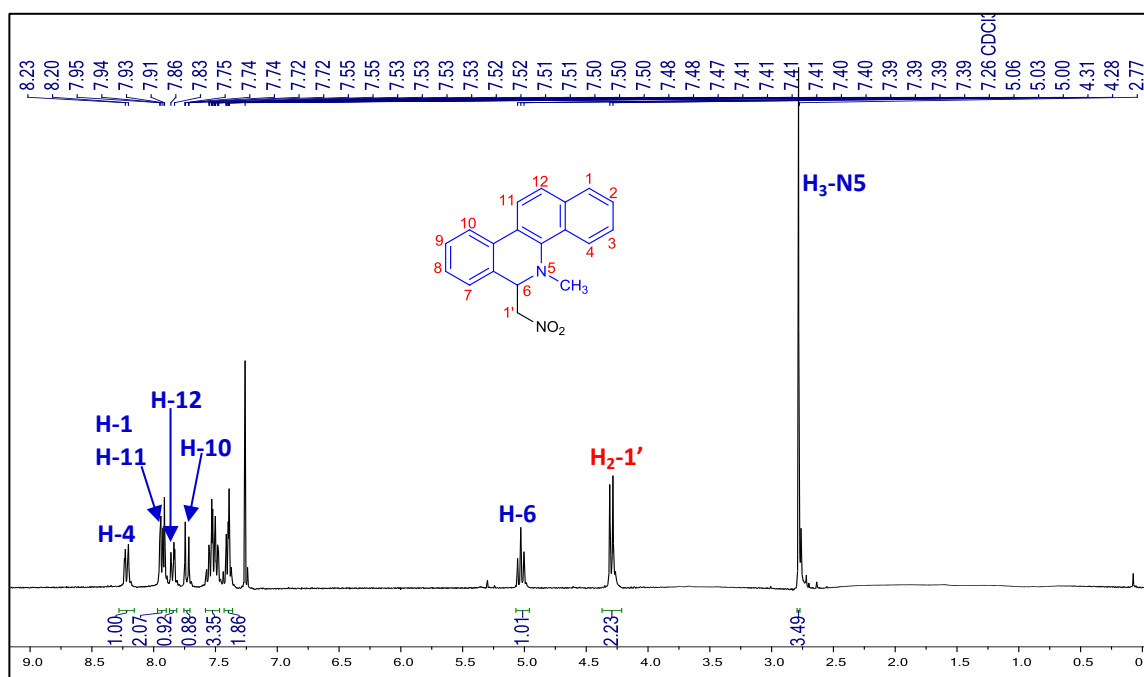


Figura 41. Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) del compuesto 3k

5.5.1.7 Elucidación estructural de **3p**.

El producto **3p** fue obtenido en 60 % de rendimiento como una resina beige. El espectro de RMN ^1H (Figura 42) del compuesto **3p** exhibe la señal singulete de H-6 en δ 5.30 ppm debido al efecto desprotector que ejerce el fragmento de fenilacetileno incorporado a la posición 6 de DHB. En la región de campo bajo del espectro de ^1H se observan cuatro dobletes en δ 7.74 ($J = 8.1$ Hz, H-2 y H-12), 7.86 ($J = 7.5$ Hz, H-1 y H-10), 7.96 ($J = 8.4$ Hz, H-11) y 8.47 ppm ($J = 8.1$ Hz, H-4); aunado a, dos multipletes en las regiones δ 7.31-7.34 (H-2', H-3' y H-4') y 7.44-7.60 ppm (H-3, H-7, H-8, H-9, H-1' y H-5'). Finalmente, en la región de campo alto del espectro de ^1H se observa el singulete (δ 2.71 ppm) típico del grupo metilo unido a nitrógeno.

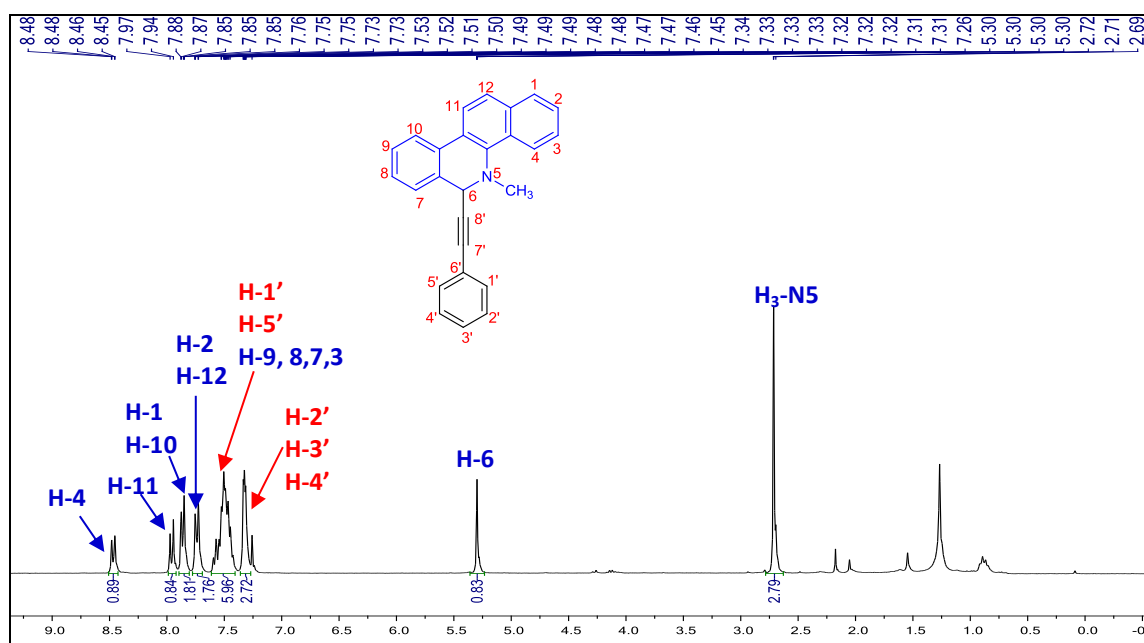


Figura 42. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del compuesto **3p**.

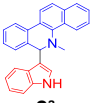
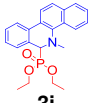
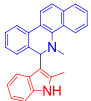
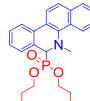
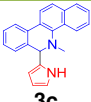

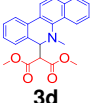

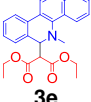

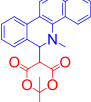

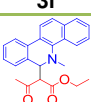
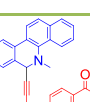
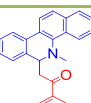
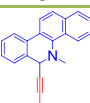

5.6 Determinación de la actividad biológica de los derivados de alcaloides dihidrobenzo[*c*]fenantridínicos

5.6.1 Rastreo de actividad citotóxica de los derivados de DHB

Los 16 derivados de DHB fueron sometidos a un rastreo de actividad citotóxica a 10 μ M en tres líneas de células de cáncer: cáncer de mama (MCF-7), cáncer de colon (HCT-15) y cáncer de próstata (PC-3). Además, se determinó la citotoxicidad de estos derivados en una línea de células normales: fibroblastos gingivales humanos (FGH). Los resultados se muestran en la tabla **8**.

Este cribado de actividad permitió observar que la incorporación de anillos heterocíclicos (pirrol o indol) en la plataforma DHB confiere baja o nula citotoxicidad a los derivados **3a**, **3b** y **3c**, un comportamiento muy similar al observado en la plataforma no funcionalizada (Tabla 8). Por otro lado, la incorporación de ésteres malónicos a DHB confirió mayor actividad citotóxica (> 95%) a los derivados **3d** y **3e** frente a las tres líneas celulares cancerosas en comparación con la plataforma sin funcionalizar; mientras que, la incorporación de un diéster cíclico confiere baja o nula actividad en el derivado **3f**. Al comparar los resultados de citotoxicidad del derivado **3g** con los obtenidos para **3d**, **3e** y **3f**, se puede apreciar que los ésteres lineales confieren mayor actividad que el éster cíclico.

Tabla 8. Determinación de citotoxicidad de los derivados de DHB a 10 μ M.

DERIVADO	PC3	HCT15	MCF7	FGH	DERIVADO	PC3	HCT15	MCF7	FGH
 3a	25.9	NC	10.1	45.5	 3i	100	100	100	30.5
 3b	NC	NC	NC	39.3	 3j	100	68.7	92.59	NC
 3c	NC	NC	56.2	4.5	 3k	85.4	100	76.12	100
 3d	98.6	100	95.6	100	 3l	50.0	NC	23.61	100
 3e	100	100	100	97.4	 3m	47.3	NC	38.29	100
 3f	NC	9.2	31.6	50.4	 3n	10.5	NC	9.78	100
 3g	61	NC	100	91.4	 3o	30.9	3.0	75.4	39.3
 3h	NC	NC	27.6	21.7	 3p	100	100	100	39.6
 DHB	NC	49.07	NC	NC					

Líneas celulares PC-3 (cáncer de próstata), HCT-15 (cáncer de colon), MCF-7 (cáncer de mama) y FGH (Fibroblastos gingivales humanos).

Con estos resultados se puede deducir que los ésteres malónicos lineales incrementan la capacidad citotóxica de los derivados **3d** y **3e**, a expensas de una menor selectividad; en tanto que, el cetoéster confiere mayor selectividad al

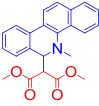
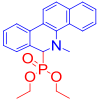
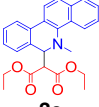
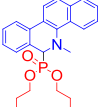
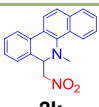
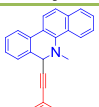
derivado **3f** por la línea MCF-7. A pesar de que los derivados **3d** y **3e** resultaron muy promisorios frente a las tres líneas celulares cancerosas, éstos exhibieron alta toxicidad (> 97.4%) frente a la línea normal FGH. Aunado a lo antes descrito, la incorporación de una cetona aromática a DHB no confirió citotoxicidad al derivado **3h**, o resultó muy baja frente a MCF-7. Los compuestos carbonílicos **3f** y **3h** presentaron un porcentaje de inhibición menor a 50% en las células normales y no presentaron inhibición de crecimiento en las células cancerosas. Con respecto de los α -aminofosfonatos **3i** y **3j** se puede deducir que los sustituyentes de dos carbonos en el fragmento de fosfito (**3i**) confieren mayor citotoxicidad (100%) frente a las tres líneas cancerosas en comparación con su análogo que posee sustituyentes de cuatro carbonos (**3j**) y que exhibió menor citotoxicidad frente a HCT-15 y MCF-7 (68 y 92%). A pesar de que **3j** resultó ligeramente menos citotóxico que **3i** frente a las líneas cancerosas, **3j** no mostró toxicidad frente a la línea normal de FGH a diferencia de **3i** que exhibió baja toxicidad (30%), razón por la cual ambos son moléculas promisorias para estudios posteriores. Para la serie de nitroderivados **3k-3m** se observó una correlación entre la actividad citotóxica y el número de carbonos del fragmento de nitroalcano. El efecto más notorio ocurrió frente a la línea HCT-15, en la cual los derivados con nitroetano (**3l**) y nitropropano (**3m**) no mostraron citotoxicidad, a diferencia del derivado con nitrometano (**3k**) que mostró 100% de inhibición del crecimiento celular. Con tendencia similar en las líneas PC-3 y MCF-7, los nitroderivados **3l** y **3m** presentaron porcentajes de inhibición celular menores a 51%, en tanto que el nitroderivado **3k** mostró porcentajes mayores a 76%. A pesar de haber una tendencia evidente en los

porcentajes de inhibición exhibidos por los nitroderivados **3k-3m** frente a las tres líneas celulares cancerosas, dichos derivados mostraron 100% de inhibición de la línea normal FGH. El compuesto que contiene como sustituyente un grupo nitrilo (**3n**) presentó una baja inhibición en las líneas de células cancerosas pero una alta toxicidad en la línea FGH. Por otra parte, el derivado **3o** presentó una moderada citotoxicidad al inhibir el 39.3% del crecimiento celular en la línea FGH y un 75.4 % de inhibición en la línea MCF-7; mientras que, **3o** no presentó actividad frente a las líneas PC-3 y HCT-15. Sin embargo, el compuesto **3p** mostró el 100 % de inhibición frente a las tres líneas cancerosas y una moderada toxicidad en la línea FGH.

5.6.2 Determinación de las CI_{50} de los derivados de DHB.

Considerando los resultados mostrados en la tabla **8**, se seleccionaron los derivados más activos (**3d**, **3e**, **3k**, **3i**, **3j** y **3p**) para determinar sus concentraciones inhibitorias medias (CI_{50}) frente a las tres líneas celulares cancerosas (Tabla **9**).

Tabla 9. Determinación de la CI_{50} (μM) de los derivados de DHB.^a

DERIVADO	PC-3	HCT-15	MCF-7	DERIVADO	PC-3	HCT-15	MCF-7
 3d	3.07±0.3	2.7±0.1	3.12±0.4	 3i	28.92±2.1	23.62±1.2	28.92±2.1
 3e	8.20±0.3	1.92±0.7	1.84±0.7	 3j	7.87±0.6	11.66±0.63	9.71±0.8
 3k	9.49±1.0	2.3±0.6	14.7±0.3	 3p	53.60±3.3	79.95±4.0	22.36±3.4

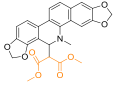
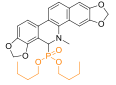
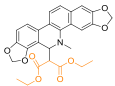
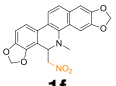
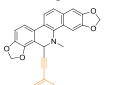
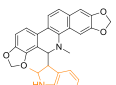
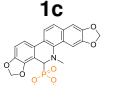
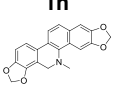
^a Doxorubicina fue usado como control positivo: PC-3 (0.43±0.03 μM), HCT-15 (0.16±0.02 μM), MCF-7 (0.22±0.02 μM), FGH (35.95% inhibición de crecimiento a 0.5 μM).

De los seis derivados, el derivado malónico **3e** resultó con los valores más pequeños de CI_{50} frente a las líneas de carcinoma mamario (1.84 μM) y adenocarcinoma de colon (1.92 μM); mientras que, su análogo **3d** resultó ligeramente menos citotóxico frente a ambas líneas (CI_{50} = 2.7 y 3.12 μM). A pesar de esta pequeña diferencia de CI_{50} , **3d** resultó 2.7 veces más citotóxico (CI_{50} = 3 μM) frente a la línea de carcinoma pancreático que su análogo **3e** (CI_{50} = 8 μM). En cuanto al nitroderivado **3k** se observó mayor selectividad citotóxica frente a la línea HCT-15 (CI_{50} = 2 μM) que frente a las otras dos líneas (CI_{50} > 9 μM). Por otra parte, el α -aminofosfonato **3j** resultó tres veces más citotóxico frente a PC-3 (CI_{50} = 7 μM) y MCF-7 (CI_{50} = 9 μM) en comparación con su análogo **3i** (CI_{50} = 28 μM). Asimismo, el derivado alquínico **3p** presentó mayor selectividad frente a la línea MCF-7 (CI_{50} = 22 μM) que las otras dos líneas cancerosas (CI_{50} > 53 μM).

5.6.3 Rastreo de actividad citotóxica de los derivados de DHS

Tomando en cuenta los resultados obtenidos para los derivados **3d**, **3e**, **3i**, **3j**, **3k** y **3p** (Tabla 8), se sintetizaron sus análogos a partir de la plataforma DHS (**1a**, **1b**, **1c**, **1e**, **1f** y **1g**) y se determinaron los porcentajes de inhibición de crecimiento frente a tres líneas celulares de cáncer humano y una línea normal: cáncer de próstata (PC-3), cáncer de colon (HCT-15), cáncer de mama (MCF-7) y fibroblastos gingivales humanos (FGH). Adicionalmente, se decidió incorporar el 2-metilindol a DHS (**1d**) para evaluar el efecto citotóxico en esta plataforma y compararlo con su análogo **3b**. Los resultados obtenidos de la evaluación de los derivados de DHS a 50 μ M se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Por ciento de inhibición de crecimiento a 50 μ M de los derivados de DHS.

Derivado	PC-3	HCT-15	MCF-7	FGH	Derivado	PC-3	HCT-15	MCF-7	FGH
 1a	100	75.8	100	93.12 \pm 2.2 ^a	 1e	100	100	100	22.57 \pm 2.7 ^a
 1b	100	100	100	94.6 \pm 1.5	 1f	100	100	100	80.81 \pm 2.0 ^a
 1c	17	26.08	8.6	26.6 \pm 3.8	 1h	100	100	100	88.3 \pm 0.7
 1d	100	100	100	90.77 \pm 1.4	 DHS	50.4	55.3	NC	19.11 \pm 4.5

^aLas muestras se evaluaron a 25 μ M. Líneas celulares PC-3 (cáncer de próstata), HCT-15 (cáncer de colon), MCF-7 (cáncer de mama) y FGH (Fibroblastos gingivales humanos).

Es interesante observar que la plataforma heterocíclica DHS juega un rol más importante que la plataforma DHB en la manifestación de propiedades citotóxicas (Tablas **8** y **10**). Así por ejemplo, todos los derivados de DHS, a excepción de **1c**, presentaron 100% de inhibición del crecimiento celular frente a las líneas cancerosas, lo cual contrasta drásticamente con la plataforma DHS no funcionalizada que mostró moderada citotoxicidad frente a PC-3 y HCT-15 y nula citotoxicidad frente a MCF-7 (Tabla **10**). El efecto más relevante se observó con el derivado **1h**, el cual mostró 100% de inhibición frente a todas las líneas celulares cancerosas; mientras que, su análogo **3b** no presentó actividad citotóxica. Lo opuesto ocurrió con el derivado alquínico **1c**, el cual mostró baja citotoxicidad frente a las tres líneas celulares cancerosas en comparación con su correspondiente análogo **3p** que mostró 100% de inhibición.

5.6.4 Determinación de CI_{50} de los derivados de DHS

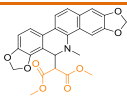
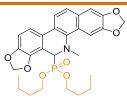
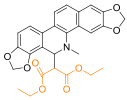
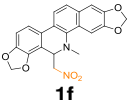
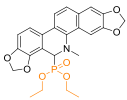
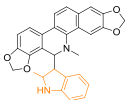
Para poder discurrir sobre el efecto del nucleófilo incorporado a la plataforma DHS, se determinaron los valores de CI_{50} de sus derivados (Tabla **11**).

El hallazgo más relevante se encontró con el derivado malónico **1b**, el cual mostró valores de CI_{50} muy similares a los observados para el control positivo doxorubicina. Este derivado **1b** resultó aproximadamente seis veces más

citotóxico que su análogo **1a**, denotando que la presencia de un carbono adicional en el éster malónico confiere mayor capacidad citotóxica. Un efecto opuesto se observó para la pareja de α -aminofosfonatos **1d** y **1e**, ya que la presencia de dos carbonos adicionales en el fragmento de fosfito del derivado **1e** disminuyó de tres a seis veces su capacidad citotóxica frente a las líneas cancerosas en comparación con **1d**. Al comparar los valores de CI_{50} de los derivados malónicos **1a** y **1b** y los α -aminofosfonatos **1d** y **1e** con sus correspondientes análogos de DHB (**3d**, **3e**, **3i** y **3j**), se puede inferir que los grupos dioximetilenos son importantes para conferir mayor capacidad citotóxica a la plataforma *N*-metil-5,6-dihidrobenzo[*c*]fenantridina. Esta inferencia es más sólida si se considera el incremento en las propiedades citotóxicas del nitroderivado **1f** con respecto de su análogo **3k**; así como, del derivado indólico **1h** con respecto de su análogo inactivo **3b**. Tal como se puede apreciar en la tabla **11**, los derivados **1a**, **1b**, **1d** y **1f** mostraron los mejores valores de CI_{50} , razón por la cual son moléculas muy promisorias para estudios posteriores sobre sus mecanismos de acción y sus propiedades anticancerígenas. Aunado a lo anterior, si se compara la citotoxicidad a 25 μ M, frente a la línea normal FGH, entre los derivados **1a**, **1e** y **1f**, el α -aminofosfonato **1e** tiene la ventaja de haber mostrado poca toxicidad a este tipo de células a pesar de haber presentado 15 veces menos citotoxicidad frente a las líneas celulares cancerosas. Al doble de concentración (50 μ M), los derivados **1b** y **1h** mostraron menor toxicidad frente a la línea FGH en comparación con los otros

derivados de DHS, por lo cual el derivado malónico **1b** resulta muy promisorio para estudios posteriores.

Tabla 11. Determinación de la CI_{50} (μM) de los derivados de DHS

DERIVADO	PC-3	HCT-15	MCF-7	DERIVADO	PC-3	HCT-15	MCF-7
 1a	4.05±0.1	3.51±0.28	6.7±1.0	 1e	11.89±1.1	14.67±1.0	18.81±2.0
 1b	0.73±0.02	0.62±0.02	1.03±0.03	 1f	1.59±0.07	1.31±0.1	1.46±0.1
 1d	3.38±1.1	5.42±1.0	2.90±0.5	 1h	14.42±1.4	14.6±2.1	16.3±1.6

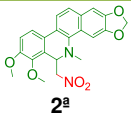
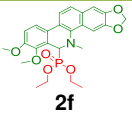
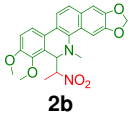
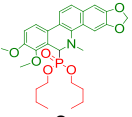
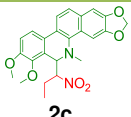
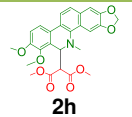
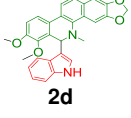
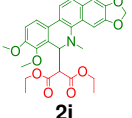
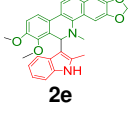
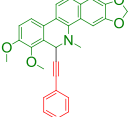
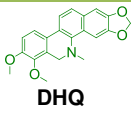
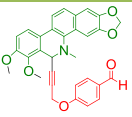
Líneas celulares: PC-3 (cáncer de próstata), HCT-15 (cáncer de colon), MCF-7 (cáncer de mama) y FGH (Fibroblastos gingivales humanos). Doxorubicina fue usado como control positivo: PC-3 (0.43±0.03 μM), HCT-15 (0.16±0.02 μM), MCF-7 (0.22±0.02 μM) y (FGH, 35.96% de inhibición de crecimiento a 0.5 μM).

5.6.5 Rastreo de actividad biológica de los derivados de DHQ

De acuerdo con los resultados observados para los derivados de DHB y DHS (Tablas **8-11**), es evidente que la presencia de grupos dioximetileno mejoró las propiedades citotóxicas de los derivados **1a**, **1b**, **1d**, **1e**, **1f** y **1h** en comparación con sus análogos carentes de grupo dioximetileno (**3d**, **3e**, **3i**, **3j**, **3k** y **3b**); es decir, la presencia de un grupo electrodonador *orto* a la posición bencílica en DHS confirió mayor actividad citotóxica a sus derivados. Para examinar el efecto de grupo electrodonador (CH_3O) aunado al factor estérico *orto* a la posición bencílica, se sintetizaron 11 derivados de la plataforma DHQ que posee grupo metoxilo en las posiciones *orto* y *meta* a la posición bencílica.

Además, todos los derivados de DHQ fueron evaluados a 50 μ M para determinar los porcentajes de inhibición de crecimiento frente a tres líneas celulares de cáncer humano y una línea normal: cáncer de próstata (PC-3), cáncer de colon (HCT-15), cáncer de mama (MCF-7) y fibroblastos gingivales humanos (FGH). Los resultados obtenidos de la evaluación citotóxica se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Porcentaje de inhibición de crecimiento de los derivados de DHQ a 50 μ M.

DERIVADO	PC-3	HCT-15	MCF-7	FGH	DERIVADO	PC-3	HCT-15	MCF-7	FGH
 2a	100	100	91.1	22.17 ^a	 2f	44.7	40.8	71.3	NC
 2b	100	100	100	96.45 ^a	 2g	100	100	100	83.46 ^a
 2c	78.6	82.5	71.25	16.39	 2h	100	100	100	88.74
 2d	87.9	70.6	90	13.3	 2i	100	100	100	98.92 ^a
 2e	100	100	100	35.7	 2j	38.1	30.0	60.3	NC
 DHQ	26.6	56.5	NC	16.04	 2k	78.6	82.51	71.25	7.90

^aSe determinó porcentaje de inhibición de crecimiento en FGH a 25 μ M. Líneas celulares PC-3 (cáncer de próstata), HCT-15 (cáncer de colon), MCF-7 (cáncer de mama) y FGH Fibroblastos gingivales humanos).

Al comparar los resultados de los derivados de DHS (**1a**, **1b**, **1d**, **1e**, **1f** y **1h**) con sus correspondientes análogos de DHQ (**2h**, **2i**, **2f**, **2g**, **2a** y **2e**), se

observan similares porcentajes de inhibición del crecimiento celular de las tres líneas cancerosas, lo cual confirma la importancia de grupos electrodonadores en las posiciones *orto* y *meta* a la posición bencílica en la plataforma *N*-metil-5,6-dihidrobenzo[*c*]fenantridina. Asimismo, los resultados muestran que la incorporación de otros nucleófilos en DHQ (**2b**, **2c**, **2d**, **2j** y **2k**) confirió mayor actividad citotóxica con respecto de la plataforma DHQ no funcionalizada.

Al examinar la serie de nitroderivados **2a-2c**, se observa que el nitroalcano de tres carbonos en **2c** le confiere menor actividad citotóxica (71-82% de inhibición) frente a las tres líneas cancerosas; aunque cabe destacar que, el derivado **2c** presentó menor actividad citotóxica frente a la línea normal FGH que sus análogos **2a** y **2b**. El efecto opuesto puede observarse con el par de α -aminofosfonatos, ya que el derivado con cuatro carbonos en el fragmento de fosfito (**2g**) resultó dos veces más citotóxico que su análogo con dos carbonos (**2f**), exhibiendo 100% de inhibición del crecimiento de las líneas celulares cancerosas. En cuanto a los derivados indólicos, la presencia de un grupo metilo en la posición 2 del indol confirió mayor actividad citotóxica al derivado **2e** que a su análogo **2d** carente del grupo metilo. Así, se observa que la incorporación del fragmento 2-metilindol en el alcaloide DHQ incrementó su toxicidad hasta exhibir 100% de inhibición del crecimiento de las líneas celulares cancerosas; aunque cabe destacar que, ambos derivados indólicos mostraron baja toxicidad frente a la línea normal FGH. Por otro lado, los derivados malónicos **2h** y **2i** presentaron 100% de inhibición del crecimiento de

las tres líneas celulares cancerosas, pero interesantemente el derivado **2h** resultó menos tóxico frente a la línea normal FGH. Finalmente, los resultados obtenidos para los derivados alquínicos **2j** y **2k**; mientras que, el fragmento alcoxialquino confirió mayor actividad citotóxica al derivado **2k** en comparación con su análogo **2j** con el fragmento alquínico conjugado a benceno.

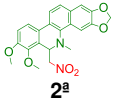
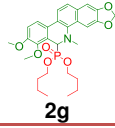
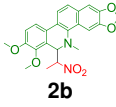
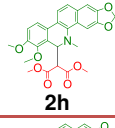
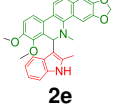
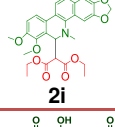
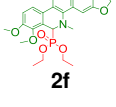
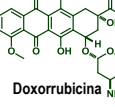
5.6.6 Determinación de CI_{50} de los derivados de DHQ

Tomando en consideración lo antes descrito para los derivados de DHQ, se seleccionaron las moléculas más activas para determinar sus concentraciones inhibitorias medias (CI_{50}) frente a las tres líneas celulares cancerosas y así poder discurrir sobre la influencia de los fragmentos estructurales incorporados (Tabla **13**).

Al comparar las CI_{50} de los nitroderivados que poseen un fragmento de nitrometano (**1f**, **2a** y **3k**), se observa que **1f** posee mayor actividad citotóxica frente a las tres líneas cancerosas ($CI_{50} < 1.6 \mu M$); mientras que, los análogos **2a** y **3k** presentaron valores similares de CI_{50} . Así, el nitroderivado **1f** resultó cinco veces más citotóxico contra PC-3, ocho veces más activo contra HCT-15 y trece veces más activo contra MCF-7 que su análogo **2a**. Analizando la relación entre la estructura y la actividad de **1f** y **2a**, se puede inferir que la

actividad de **2a** decreció a consecuencia de factores estéricos ocasionados por los grupos metoxilos *orto* y *meta* a la posición bencílica. Un efecto similar se puede deducir de la comparación entre los derivados **2e** y **1h**, ya que **2e** resultó aproximadamente dos veces menos citotóxico que **1h** a pesar de que ambos poseen el fragmento de 2-metilindol y que solo difieren estructuralmente por la presencia de grupos metoxilo (**2e**) y dioximetileno (**1d**). Lo anterior también se puede evidenciar con el nitroderivado **2b**, el cual resultó dos veces menos citotóxico que su análogo **2a** frente a las tres líneas cancerosas, probablemente debido al mayor tamaño del nitroalcano y al consecuente aumento del impedimento estérico.

Tabla 13. Determinación de la CI_{50} (μM) de los derivados de dihidroqueleritrina

Derivado	PC-3	HCT-15	MCF-7	Derivado	PC-3	HCT-15	MCF-7
 2a	5.53±0.9	8.97±0.9	17.28±1.8	 2g	12.42±0.8	11.71±1.6	9.33±0.9
 2b	10.59±1	17.93±0.5	37.17±0.9	 2h	5.69±0.7	8.4±0.6	8.15±1.3
 2e	27.42±2.9	34.26±3.2	28.36±2.1	 2i	3.76±0.6	2.73±0.2	3.99±0.4
 2f	12.94±0.8	37.07±0.5	10.42±0.01	 Doxorrubicina	0.43±0.03	0.16±0.02	0.22±0.02

Líneas celulares PC-3 (cáncer de próstata), HCT-15 (cáncer de colon), MCF-7 (cáncer de mama). Porcentaje de inhibición de crecimiento de la doxorubicina en FGh (35.96% evaluado a 0.5 μM).

Por otra parte, el α -aminofosfonato **2g** resultó tres veces más citotóxico ($CI_{50} = 11.71 \mu\text{M}$) frente a la línea HCT-15 que su análogo **2f** ($CI_{50} = 37.07 \mu\text{M}$); mientras que, ambos derivados mostraron valores muy similares de CI_{50} frente a las líneas PC-3 y MCF-7. Al comparar los resultados de los derivados de DHQ (**2f** y **2g**) con los obtenidos para sus análogos de DHS (**1d** y **1e**), se observa que la diferencia más notoria ocurre entre los derivados **1e** y **2f** ya que a pesar de poseer el mismo fragmento de dietilfosfito, **2f** resultó cuatro veces menos citotóxico frente a las líneas cancerosas (Tablas **11** y **13**). Estas diferencias en citotoxicidad también se pueden atribuir a los factores estéricos ocasionados por los grupos metoxilos *orto* y *meta* a la posición bencílica en **2f**. Asimismo, al comparar la actividad biológica de los α -aminofosfonatos **2g** y **1e**, se puede deducir que la presencia de un fragmento voluminoso como el dibutilfosfito ocasiona que ambos derivados exhiban valores de CI_{50} muy similares y que las diferencias en los sustituyentes *orto* y *meta* a la posición bencílica no influya de manera significativa en las propiedades citotóxicas de los derivados (Tablas **11** y **13**). Ahora bien, al comparar los α -aminofosfonatos **1d**, **2f** y **3i**, se puede deducir que los grupos electrodonadores *orto* y *meta* a la posición bencílica de **1d** y **2f** ocasionaron un incremento significativo en la actividad citotóxica frente a las líneas cancerosas en comparación con **3i** que resultó mucho menos activo (Tablas **9**, **11** y **13**).

Por otro lado, al comparar los α -aminofosfonatos **1e**, **2g** y **3j**, se puede deducir que la incorporación del fragmento dibutilfosfito confiere propiedades citotóxicas

significativas a los derivados y por consiguiente los grupos electrodonadores *orto* y *meta* a la posición bencílica no juegan un rol determinante en la modulación de las propiedades citotóxicas (Tablas **9**, **11** y **13**).

Los resultados más relevantes de citotoxicidad se observaron con los derivados malónicos **2h** y **2i**, de los cuales **2i** presentó los valores más pequeños de CI_{50} (Tabla **13**). Los resultados indican que el fragmento de dietilmalonato confirió mayor actividad citotóxica a **2i** (CI_{50} entre 3 y 4 μM), en contraste con su análogo **2h** que posee el fragmento de dimetilmalonato (CI_{50} entre 5 y 8 μM). Al comparar los resultados de los derivados de DHQ (**2h** y **2i**) con los observados para sus análogos de DHS (**1a** y **1b**), se observa una tendencia similar en citotoxicidad; es decir, el dietilmalonato confirió mayor actividad citotóxica frente a las líneas cancerosas tanto en el derivado **1b** como en el **2i** (Tablas **11** y **13**). Tal como fue discutido previamente, **2i** mostró menor actividad citotóxica que **1b**, muy probablemente debido a los factores estéricos ocasionados por los grupos metoxilos *orto* y *meta* a la posición bencílica en **2i**. La comparación de estos resultados con los observados para los análogos de DHB (**3d** y **3e**), permiten deducir que el fragmento dietilmalonato confiere mayor actividad citotóxica a las plataformas DHB, DHS y DHQ (derivados **1b**, **2i** y **3e**) y que tal efecto es exacerbado por el grupo dioximetileno *orto/meta* a la posición bencílica en **1b** (Tablas **9**, **11** y **13**). Por otro lado, la actividad citotóxica frente a las líneas cancerosas resultó muy similar entre los derivados **1a**, **2h** y **3d**, los cuales poseen el fragmento de dimetilmalonato. Cabe destacar que, el derivado

malónico **1b** presentó valores de CI_{50} muy próximos a los que presentó el control positivo doxorubicina frente a las tres líneas celulares cancerosas, razón por la cual se puede considerar para futuras investigaciones como agente anticancerígeno.

5.7 Actividad inhibitoria de la Topoisomerasas I de las dihidrobenzo[c]fenantridinas funcionalizadas

La actividad inhibitoria de la Topo I *in vitro* se determinó en función de la capacidad que presentan las dihidrobenzo[c]fenantridinas funcionalizadas para impedir el proceso de religación de ADN en el complejo de escisión Topo I-ADN. Para tal efecto, el fragmento de ADN previamente marcado y la Topo I se mezclaron permitiendo establecer un equilibrio de escisión-religación. Al adicionar los venenos de Topo I, se impide la religación generando fragmentos de ADN de bajo peso molecular, los cuales son extraídos y separados por medio de una electroforesis en gel de poliacrilamida. La potencia anti-Topo I fue evaluada mediante la inspección visual del número e intensidad de las bandas correspondientes a los fragmentos de ADN, siendo la camptotecina y la indenoisoquinolina MJ-III-6C los controles positivos. Los resultados obtenidos para las 15 dihidrobenzo[c]fenantridinas funcionalizadas se muestran en la figura **43**.

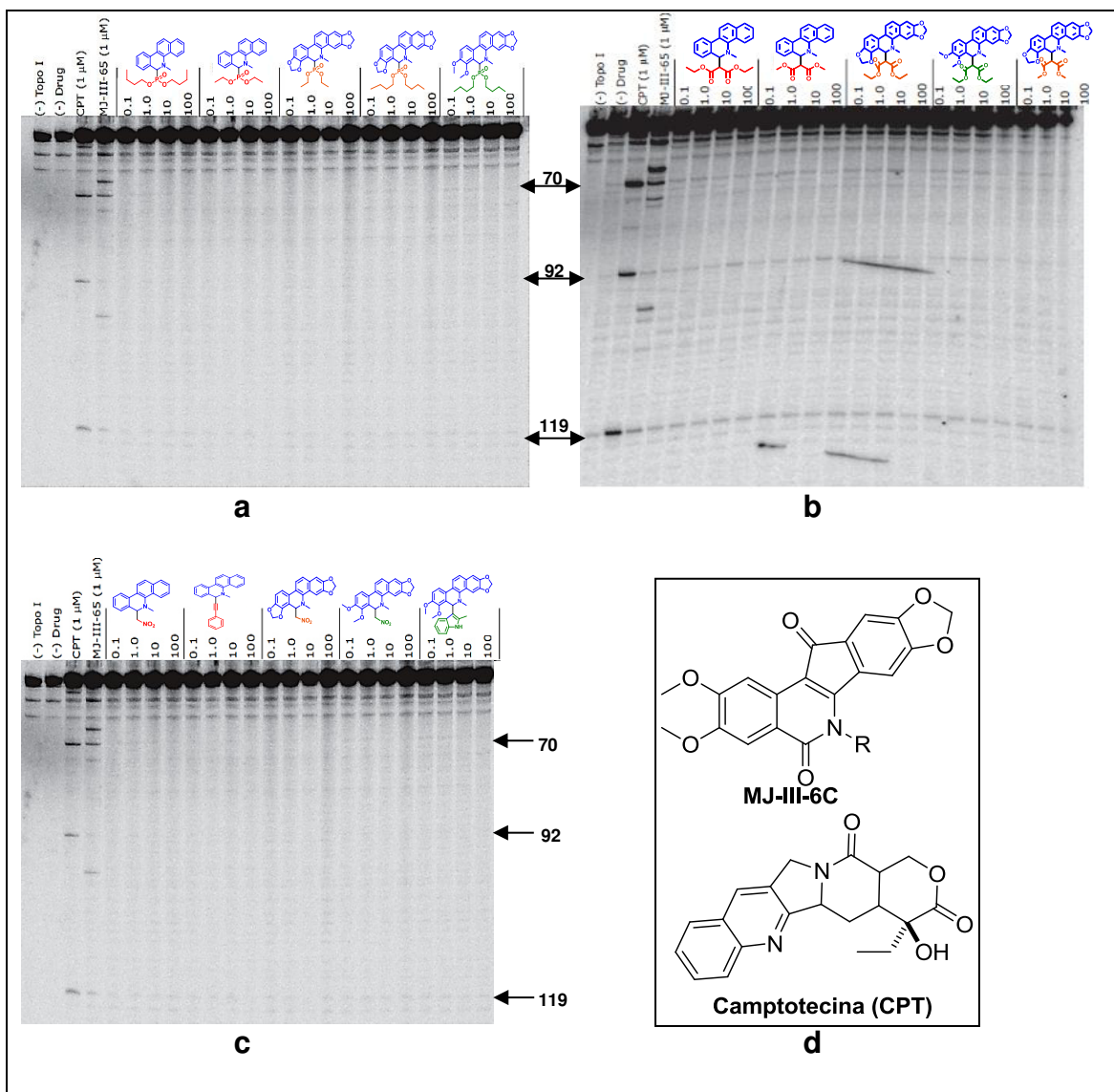


Figura 43. Determinación anti-Topo I de dihidrobenzo[c]fenantridinas: a) actividad anti-Topo I de los aminofosfonatos **3j**, **3i**, **1d**, **1e** y **2g**; b) actividad anti-Topo I de los derivados malónicos **3e**, **3d**, **1b**, **2i** y **1a**; c) actividad anti-Topo I de los compuestos **3k**, **3p**, **1f**, **2a** y **2e**; d) Controles positivos. Carriles de izquierda a derecha: carril 1: ADN solo; carril 2: ADN + enzima; carril 3: carril 2 + CPT; Carril 4: carril 2 + MJ-III-6C; carriles 5-20: Dihidrobenzo[c]fenantridinas evaluadas a 0.1, 1.0, 10 y 100 μM.

Considerando los resultados de la figura **43**, se observa que únicamente los derivados malónicos exhibieron bandas debidas a fragmentos de ADN. En comparación con las bandas que exhibe la camptotecina (carril 3, Figura **43b**), los derivados malónicos también presentaron bandas en 70, 92 y 119, pero

menos intensas que el control positivo. Por ello, se puede establecer que los derivados malónicos **3e**, **3d**, **1b**, **2i** y **1b** poseen débil actividad inhibitoria de topoisomerasa I.

Los reportes en la literatura indican que fagaronina y nitidina, alcaloides relacionados estructuralmente con las dihidrobenzo[c]fenantridinas C(6)-funcionalizadas en el presente trabajo, inhiben la Topoisomerasa I y II [99]. Las diferencias estructurales radican en que fagaronina y nitidina poseen grupo iminio y grupos metoxilo y dioximetileno en las posiciones 2, 3, 8 y 9; mientras que, los presentes derivados carecen del grupo iminio y poseen sustituyentes en las posiciones 6 y 7 (Figura **44**). En una revisión realizada por Kadha y Cho, encontraron que una benzo[*i*]fenantridina derivado de nitidina presentó una actividad inhibitoria de Topo I a 10 μ M (Figura **44**) [89]. Aunado a lo anterior, se ha reportado que 6-etoxidihidronitidina posee actividad inhibitoria de la topoisomerasa I, lo cual proporciona evidencia de que sustituyentes electrodonadores de poco volumen en la posición 6 pueden conferir propiedades inhibitorias de Topo [100]. En otro estudio se sintetizaron benzo[c][1,7] y benzo[c][1,8]fenantrolinas, análogos de nitidina y fagaronina, las cuales difieren estructuralmente en las posiciones 2 y 3 del anillo de benceno y en la presencia de imina, y que además han mostrado actividad inhibitoria de Topo I [101].

De acuerdo con los reportes en la literatura para moléculas estructuralmente relacionadas, no es posible establecer una preferencia a la presencia o ausencia de grupo iminio para poder exhibir actividad inhibitoria de Topo I. No obstante, las 5,6-dihidrobenzo[*c*]fenantridinas C(6)-funcionalizadas en el presente proyecto serán oxidadas para determinar si el grupo iminio α -sustituido confiere propiedades citotóxicas e inhibitorias de Topo I.

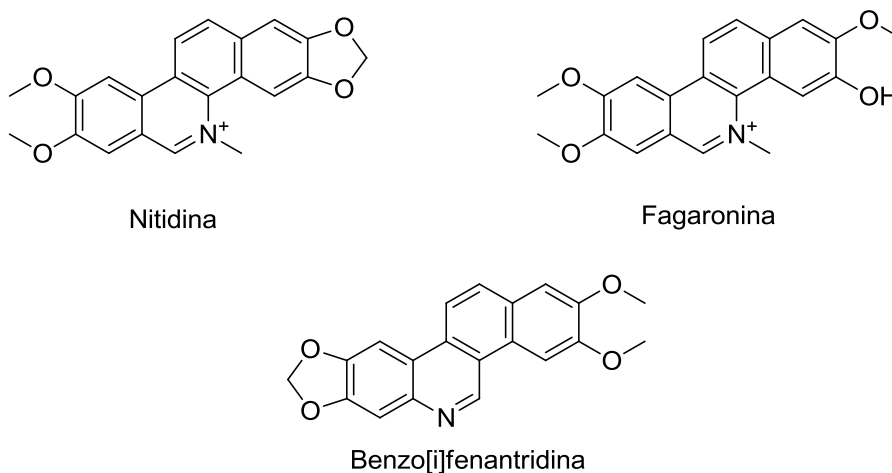


Figura 44. Alcaloides benzofenantridinicos naturales y sintéticos inhibidores de Topoisomerasas

5.8 Determinación de Apoptosis

El proceso apoptótico de las células de carcinoma prostático (PC-3) se determinó por citometría de flujo usando el kit de Anexina V-FITC que contiene los marcadores fluorescentes: anexina V-FITC (anexina marcada con isotiocianato de fluoresceína) y yoduro de propidio.

La anexina V-FITC (FITC, por sus siglas en inglés), presenta una afinidad dependiente de Ca^{++} hacia las fosfatidilserinas las cuales son un tipo de fosfolípidos que se encuentran en la membrana celular en contacto con el citosol pero cuando la célula entra en una apoptosis temprana, las fosfatidilserinas migran hacia la superficie. Sin embargo, cuando la membrana celular se encuentra dañada, el yoduro de propidio entra hacia el núcleo y otros organelos tiñendo los ácidos nucleicos presentes, por lo que este es un indicativo de que la célula está en un proceso de apoptosis tardía y/o necrosis.

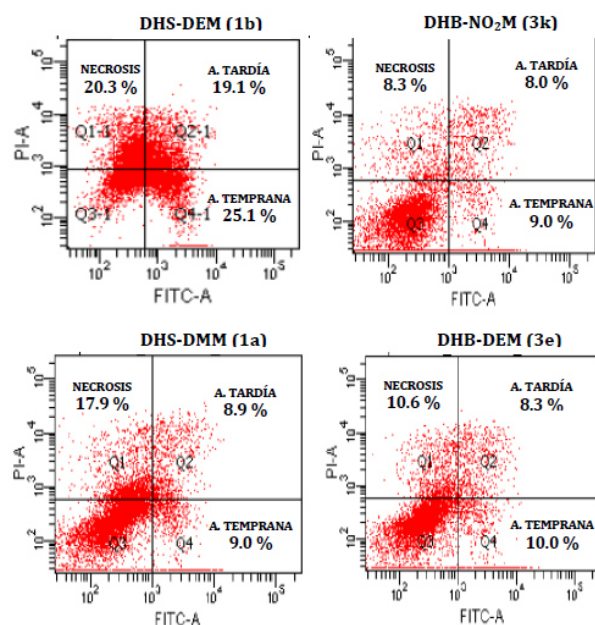


Figura 45. Inducción de apoptosis en células de cáncer prostático (PC-3) por los compuestos **1a**, **3k**, **1b** y **3e**. La apoptosis temprana es definida como Anexina V⁺/IP⁻ (Q4) y apoptosis temprana es definida como Anexina V⁺/IP⁺ (Q2).

Las células de carcinoma prostático fueron expuestas a 5 μ M (compuestos **1a** y **1b**) y 10 μ M (compuestos **3e** y **3k**) por 48 horas y posteriormente fueron teñidas con los fluoróforos. De acuerdo con los resultados obtenidos (Figura 45), se puede observar que el derivado malónico **1b** favorece la muerte celular por apoptosis (42.4%) y necrosis (20.3%). Sin embargo, para el análogo malónico **1a** no se observa una diferencia en el proceso de muerte celular debido a que presenta el mismo porcentaje para necrosis y apoptosis (17.9%). El nitroderivado **3k** mostró 8.3 % de muerte necrótica y el doble del porcentaje por muerte apoptótica (17%). El mismo comportamiento se observó en el derivado malónico **3e** al presentar un 18.3 % de muerte por apoptosis y 10.3 % por muerte necrótica. Estos resultados dan indicios de que un mecanismo de acción

de las 5,6-dihidrobenzo[c]fenantridinas sintéticas y semisintéticas C(6)-funcionalizadas del presente proyecto puede ir vía apoptótica o necrótica o ambos.

CAPÍTULO 6

Conclusiones

1. Se obtuvieron los alcaloides dihidrosanguinarina (1.1 g) y dihidroqueleritrina (1.5 g), a partir de las semillas de *B. latisejala* por métodos convencionales, en rendimientos de 0.03% y 0.05%, respectivamente.
2. Se obtuvieron 12 derivados semisintéticos de dihidroqueleritrina y 8 derivados semisintéticos de dihidrosanguinarina en rendimientos comprendidos entre 30 y 77%. Cabe destacar que, la funcionalización C(sp³)-H de estos alcaloides naturales se llevó a cabo en condiciones suaves de reacción y amigables al medio ambiente; es decir, se efectuó en presencia de aire ambiental (sin agentes oxidantes como las quinonas o hidroperóxidos) y a temperatura ambiente.
3. Cuatro de los 8 derivados de dihidrosanguinarina (**1a**, **1b**, **1e** y **1f**) mostraron concentraciones inhibitorias medias menores de 5 μM frente a las tres líneas de células cancerosas, siendo el derivado malónico **1b** el más citotóxico al exhibir valores de CI₅₀ que oscilan entre 0.62 y 1.03 μM

frente a las células cancerosas. Dichos valores son muy similares a los observados para el control positivo doxorrubicina que presentó CI_{50} oscilantes entre 0.16 y 0.43 μM frente a las líneas cancerosas. Aunado a lo anterior, el derivado **1b** presentó 94% de inhibición de crecimiento en FGH a una concentración de 50 μM , mientras que la doxorrubicina presentó 35% de inhibición de FGH a 5 μM . Así, el derivado **1b** es menos tóxico a células normales y puede ser considerado para futuros estudios relacionados con la inhibición de células cancerosas.

4. Tres de los 12 derivados de dihidroqueleritrina (**2a**, **2h** y **2i**) mostraron valores de CI_{50} menores a 10 μM frente a tres líneas de células cancerosas (PC-3, HTC-15 y MCF-7), siendo el derivado malónico **2i** el más citotóxico al presentar valores de CI_{50} que oscilan entre 2.73 y 3.99 μM . Por ello, estas moléculas también son muy promisorias para estudios posteriores como agentes anticancerígenos.
5. Se sintetizó la plataforma *N*-metil-5,6-dihidrobenzo[*c*]fenatridina (DHB) en 65 % de rendimiento global y en solo 3 etapas de reacción (aminación reductiva, *N*-metilación y ciclación tipo Heck). Cabe destacar que, la presente ruta sintética es más corta y eficiente que las rutas reportadas en la literatura.

6. Se sintetizaron 16 derivados a partir de la plataforma sintética DHB mediante acoplamiento cruzado deshidrogenativo catalizado por CuBr/DDQ, obteniéndose rendimientos que oscilan entre 20 y 70%.
7. Tres de los 16 derivados de DHB (**3d**, **3e** y **3k**) mostraron ser compuestos promisorios con actividad anticancerígena al exhibir valores de CI_{50} menores a 10 μ M frente a las líneas celulares PC-3, HCT-15 y MCF-7, por lo cual son moléculas muy prometedoras para estudios posteriores como agentes anticancerígenos.
8. Se determinó la actividad anti-Topo I de 15 dihidrobenzo[c]fenantridinas sintéticas y semisintéticas C(6)-funcionalizadas (**3j**, **3i**, **1d**, **1e**, **1g**, **3e**, **3d**, **1b**, **2i**, **1a**, **3k**, **3p**, **1f**, **2a** y **2e**), observándose que solo los derivados malónicos (**1a**, **1b**, **2i**, **3d** y **3e**) presentaron débil actividad inhibitoria de la Topo-I al exhibir el mismo patrón de inhibición del complejo ADN-TopoI de los pares de bases 70, 92 y 119, que el control positivo camptotecina.
9. Se realizó el ensayo de Anexina V-FITC para determinar el mecanismo de muerte de células de carcinoma prostático (PC-3) causada por cuatro dihidrobenzo[c]fenantridinas (**1a**, **1b**, **3e** y **3k**). Los resultados obtenidos indican que los derivados sintéticos **3e**, **3k** y el derivado semisintético **1b** mayormente producen la muerte celular por apoptosis, mientras que el

derivado **1a** causa una muerte celular necrótica y por procesos apoptóticos de manera equivalente.

10. Tomando en cuenta que los derivados **1a**, **1b**, **1f**, **1d**, **3e**, **2e**, **3e**, **3d** y **3k** presentaron CI_{50} menores a $3 \mu M$ al menos en una línea de células cancerosas, estos pueden ser investigados para conocer sus blancos terapéuticos para el desarrollo de nuevos agentes anticancerígenos.

11. A pesar de que 23 derivados no presentaron una actividad citotóxica menor a $10 \mu M$, pueden ser estudiados como agentes antimicrobianos, antivirales, antidiabéticos y/o antiparasitarios, ya que poseen grupos funcionales que podrían contribuir a que se manifiesten dichas propiedades farmacológicas.

12. Finalmente se puede concluir que la hipótesis propuesta en este trabajo es rechazada debido a que los derivados más promisorios obtenidos en este proyecto no presentaron actividad citotóxica mayor que la doxorubicina. El compuesto **1b** presentó valores de CI_{50} cercanos a la doxorubicina: CI_{50} de 0.73 y $0.43 \mu M$ frente a PC-3, respectivamente, y CI_{50} de 0.62 y $0.16 \mu M$ frente a HCT-14, respectivamente.

CAPÍTULO 7

REFERENCIAS

- [1] J. Yamaguchi, A.D. Yamaguchi, K. Itami, C-H bond functionalization: Emerging synthetic tools for natural products and pharmaceuticals, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 51 (2012) 8960–9009.
- [2] D. Sames, C-H Bond Functionalization in Complex Organic Synthesis Alkane C-H Bonds : Coordination-Directed C-H Bond Activation, *Am. Chem. Soc.* (2004) 155–168.
- [3] M.C. Bryan, B. Dillon, L.G. Hamann, G.J. Hughes, M.E. Kopach, E. a Peterson, M. Pourashraf, I. Raheem, P. Richardson, D. Richter, H.F. Sneddon, Sustainable Practices in Medicinal Chemistry: Current State and Future Directions BT - *Journal of Medicinal Chemistry, J. Med. Chem.* (2013).
- [4] C.L. Sun, B.J. Li, Z.J. Shi, Direct C-H transformation via iron catalysis, *Chem. Rev.* 111 (2011) 1293–1314.
- [5] S.A. Girard, T. Knauber, C.J. Li, The cross-dehydrogenative coupling of Csp³ -H bonds: A versatile strategy for C-C bond formations, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 53 (2014) 74–100.
- [6] J. Ulrichová, Z. Dvořák, J. Vičar, J. Lata, J. Smržová, A. Šedo, V. Šimánek, Cytotoxicity of natural compounds in hepatocyte cell culture models: The case of quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids, *Toxicol. Lett.* 125 (2001) 125–132.
- [7] T. Nakanishi, M. Suzuki, A. Saimoto, T. Kabasawa, Structural considerations of NK109, an antitumor benzo[c]phenanthridine alkaloid, *J. Nat. Prod.* 62 (1999) 864–867.
- [8] M.H. Zenk, The formation of benzophenanthridine alkaloids, *Pure Appl. Chem.* 66 (1994) 2023–2028.
- [9] I. Kock, D. Heber, M. Weide, U. Wolschendorf, B. Clement, *Synthesis and*

- biological evaluation of 11-substituted 6-aminobenzo[c]phenanthridine derivatives, a new class of antitumor agents., *J. Med. Chem.* 48 (2005) 2772–2777.
- [10] X. Yu, X. Gao, Z. Zhu, Y. Cao, Q. Zhang, P. Tu, X. Chai, Alkaloids from the tribe Bocconieae (Papaveraceae): A chemical and biological review, *Molecules*. 19 (2014) 13042–13060.
- [11] V. Preininger, Chapter 1 Chemotaxonomy of Papaveraceae and Fumariaceae, *Alkaloids Chem. Pharmacol.* 29 (1986) 1–98.
- [12] M.J.S. Charles R. Gunn, *Seeds and fruits of North American papaveraceae*, Tech. Bulletin No. 1517, United States Department of Agriculture, 1976.
- [13] X.A. Dominguez, J.G. Delgado, A.M. C., L.G. Armendariz, A. Alcala, J. Quevedo, P. Rojas, Chemical study of *Bocconia latisejala* Wats., *Can. J. Chem.* 43 (1965) 679–682.
- [14] SEInet Arizona-New Mexico Chapter, (n.d.).
<http://swbiodiversity.org/seinet/map/googlemap.php?maptype=taxa&taxon=127212&clid=0>.
- [15] A. Kumar, S. Srivastava, G. Gupta, V. Chaturvedi, S. Sinha, R. Srivastava, Natural product inspired diversity oriented synthesis of tetrahydroquinoline scaffolds as antitubercular agent, *ACS Comb. Sci.* 13 (2011) 65–71.
- [16] G.M. Cragg, P.G. Grothaus, D.J. Newman, Impact of natural products on developing new anti-cancer agents, *Chem Rev.* 109 (2009) 3012–3043.
- [17] A.L. Harvey, Natural products in drug discovery, *Drug Discov. Today*. 13 (2008) 894–901.
- [18] B.B. Mishra, V.K. Tiwari, Natural products: An evolving role in future drug discovery, *Eur. J. Med. Chem.* 46 (2011) 4769–4807.
- [19] World Health Organization, Organización Mundial de Salud (OMS), (2016).
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>].
- [20] N.C. Organization, National Cancer Institute, (n.d.). <http://www.cancer.gov>.
- [21] W. MacSween, *Patología de Muir*, 13th ed., 1995.
- [22] K. Fauci, A.; Braunwald, E.; Isselbacher, Harrison. *Principio de Medicina Interna.*, 14 ed., 1998.
- [23] J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D.M. Parkin, D. Forman, F. Bray, Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012, *Int. J. Cancer.* 136 (2015)

E359–E386.

- [24] (INEGI), Instituto Nacional de Estadística y Geografía, (2016).
<http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemo107&s=est&c=23587>.
- [25] ACS, American Cancer Society, (2016). <http://www.cancer.org/>.
- [26] CDC, Center for Disease Control and Prevention, (2016).
<http://www.cdc.gov/cancer/>.
- [27] P.Y. Zhang, I.L.K. Wong, C.S.W. Yan, X.Y. Zhang, T. Jiang, L.M.C. Chow, S.B. Wan, Design and syntheses of permethyl ningalin B analogues: Potent multidrug resistance (MDR) reversal agents of cancer cells, *J. Med. Chem.* 53 (2010) 5108–5120.
- [28] L. Pan, H.-B. Chai, A.D. Kinghorn, Discovery of new anticancer agents from higher plants., *Front. Biosci. (Schol. Ed.)* 4 (2012) 142–56.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3314490&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [29] R.D.I. to C.C.C.R. 109 (7): 2859–2861 (2009 Shewach, D.; Kuchta, Introduction to Cancer Chemotherapeutics., *Chem. Rev.* 109 (2009) 2859–2861.
- [30] J.. G.-B.M. Espinosa, E.; Zamora, P.; Feliu, Classification of Anticancer Drugs Based on Therapeutic Targets. *Cancer Treat Rev.* 29(6):515-523 (2003)., *Cancer Treat Rev.* 29 (2003) 515–516.
- [31] K. Bruton, Laurence; Lazo, John; Parker, Goodman e Guilman. *Las bases farmacológicas de la terapéutica.*, 11ed. ed., McGrawHill, n.d.
- [32] A.C. Ketron, N. Osheroff, Phytochemicals as anticancer and chemopreventive topoisomerase II poisons, *Phytochem. Rev.* 13 (2014) 19–35.
- [33] A. Lauria, M. Ippolito, A.M. Almerico, Molecular docking approach on the Topoisomerase I inhibitors series included in the NCI anti-cancer agents mechanism database., *J. Mol. Model.* 13 (2007) 393–400.
- [34] S. Payne, D. Miles, *Scott-Brown’s Otorhinolaryngology: Head and Neck Surgery*, *Scott-Brown’s Otorhinolaryngol. Head Neck Surg.* (2008) 34–46.
- [35] B.E. Gryder, M.J. Akbashev, M.K. Rood, E.D. Raftery, W.M. Meyers, P. Dillard, S. Khan, A.K. Oyelere, Selectively targeting prostate cancer with antiandrogen equipped histone deacetylase inhibitors, *ACS Chem. Biol.* 8 (2013) 2550–2560.
- [36] M. Haberland, R.L. Montgomery, E.N. Olson, The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and

- therapy., *Nat. Rev. Genet.* 10 (2009) 32–42.
- [37] FDA, Food and Drugs Administration, 2016.
<http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/default.htm>.
- [38] G. Marcucci, D. Perrotti, M.A. Caligiuri, Understanding the Molecular Basis of Imatinib Mesylate Therapy in Chronic Myelogenous Leukemia and the Related Mechanisms of Resistance: Commentary re: A. N. Mohamed et al., The Effect of Imatinib Mesylate on Patients with Philadelphia Chromosome-positive, *Clin. Cancer Res.* 9 (2003) 1248–1252.
<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/9/4/1248.full>.
- [39] K. Rajalingam, R. Schreck, U.R. Rapp, Š. Albert, Ras oncogenes and their downstream targets, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1773 (2007) 1177–1195.
- [40] C.E. Pinzón, M.L. Serrano, M.C. Sanabria, Papel de la vía fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K/Akt) en humanos Role of phosphatidylinositol 3-kinase pathway (PI3K/Akt) in humans, *Rev. Cienc. Salud. Bogotá.* 7 (2009) 47–66.
- [41] F. Pellegrini, D.R. Budman, Review: tubulin function, action of antitubulin drugs, and new drug development., *Cancer Invest.* 23 (2005) 264–73.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15948296> (accessed April 7, 2016).
- [42] S. Goodin, M.P. Kane, E.H. Rubin, Epothilones: Mechanism of Action and Biologic Activity, *J. Clin. Oncol.* 22 (2004) 2015–2025.
- [43] K.L. Cheng, T. Bradley, D.R. Budman, Novel microtubule-targeting agents - the epothilones., *Biologics.* 2 (2008) 789–811.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19707459> (accessed April 7, 2016).
- [44] J.B. Aragon-Ching, H. Li, E.R. Gardner, W.D. Figg, Thalidomide analogues as anticancer drugs., *Recent Pat. Anticancer. Drug Discov.* 2 (2007) 167–74.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17975653> (accessed April 7, 2016).
- [45] C. Mas-Moruno, F. Rechenmacher, H. Kessler, Cilengitide: the first anti-angiogenic small molecule drug candidate design, synthesis and clinical evaluation., *Anticancer. Agents Med. Chem.* 10 (2010) 753–68.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21269250> (accessed April 7, 2016).
- [46] M. Pickarski, A. Gleason, B. Bednar, L.T. Duong, Orally active $\alpha\beta 3$ integrin inhibitor MK-0429 reduces melanoma metastasis., *Oncol. Rep.* 33 (2015) 2737–45.
- [47] K. Lee, M.M. Briehl, A.P. Mazar, I. Batinic-Haberle, J.S. Reboucas, B.

- Glinsmann-Gibson, L.M. Rimsza, M.E. Tome, The copper chelator ATN-224 induces peroxynitrite-dependent cell death in hematological malignancies., *Free Radic. Biol. Med.* 60 (2013) 157–67.
- [48] clinical trials, *Clinical trials*, (n.d.). 43.
<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=ATN-224&Search=Search>.
- [49] M. Ghobrial, M. Schnürch, M.D. Mihovilovic, Direct functionalization of (Un)protected tetrahydroisoquinoline and isochroman under iron and copper catalysis: Two metals, two mechanisms, *J. Org. Chem.* 76 (2011) 8781–8793.
- [50] K.R. Campos, Direct sp³ C-H bond activation adjacent to nitrogen in heterocycles., *Chem. Soc. Rev.* 36 (2007) 1069–1084.
- [51] J. Schranck, A. Tlili, M. Beller, Functionalization of remote C-H bonds: Expanding the frontier, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 53 (2014) 9426–9428.
- [52] Y.-L. Zhao, Y. Wang, Y.-C. Luo, X.-Z. Fu, P.-F. Xu, Asymmetric C–H functionalization involving organocatalysis, *Tetrahedron Lett.* 56 (2015) 3703–3714.
- [53] P. Thansandote, M. Lautens, Construction of nitrogen-containing heterocycles by C-H bond functionalization., *Chemistry*. 15 (2009) 5874–5883.
- [54] Q. Wang, X. Dong, T. Xiao, L. Zhou, PhI(OAc)₂-Mediated Synthesis of 6-(Trifluoromethyl)phenanthridines by Oxidative Cyclization of 2-Isocyanobiphenyls with CF₃SiMe₃ under Metal-Free Conditions, *Org. Lett.* 15 (2013) 4846–4849.
- [55] Z. Li, C.-J. Li, Highly Efficient CuBr-Catalyzed Cross-Dehydrogenative Coupling (CDC) between Tetrahydroisoquinolines and Activated Methylene Compounds, *European J. Org. Chem.* 2005 (2005) 3173–3176.
- [56] Z. Li, C.J. Li, CuBr-catalyzed direct indolation of tetrahydroisoquinolines via cross-dehydrogenative coupling between sp³ C-H and sp² C-H bonds, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 6968–6969.
- [57] Q.-H. Zheng, W. Meng, G.-J. Jiang, Z.-X. Yu, CuI-catalyzed C1-alkynylation of tetrahydroisoquinolines (THIQs) by A³ reaction with tunable iminium ions., *Org. Lett.* 15 (2013) 5928–31.
- [58] G. Zhang, Y. Ma, S. Wang, Y. Zhang, R. Wang, Enantioselective metal/organocatalyzed aerobic oxidative sp³ C-H olefination of tertiary amines using molecular oxygen as the sole oxidant., *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 12334–7.
- [59] K. Alagiri, P. Devadig, K.R. Prabhu, CDC reactions of N-aryl tetrahydroisoquinolines using catalytic amounts of DDQ: C-H activation under

- aerobic conditions, *Chem. - A Eur. J.* 18 (2012) 5160–5164.
- [60] L. Ruiz Espelt, E.M. Wiensch, T.P. Yoon, Brønsted acid cocatalysts in photocatalytic radical addition of α -amino C-H bonds across Michael acceptors, *J. Org. Chem.* 78 (2013) 4107–4114.
- [61] J. Dhineshkumar, M. Lamani, K. Alagiri, K.R. Prabhu, A versatile C-H functionalization of tetrahydroisoquinolines catalyzed by iodine at aerobic conditions, *Org. Lett.* 15 (2013) 1092–1095.
- [62] K.S. Lam, New aspects of natural products in drug discovery, *Trends Microbiol.* 15 (2007) 279–289.
- [63] M. ONDA, K. YUASA, J. OKADA, Utilization of protopine and related alkaloids. VIII. Synthesis of an analogue of alkaloid corynoline., *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 22 (1974) 2365–2371.
- [64] M. Cushman, P. Mohan, E.C. Smith, Synthesis and biological activity of structural analogues of the anticancer benzophenanthridine alkaloid nitidine chloride., *J. Med. Chem.* 27 (1984) 544–547.
- [65] Y.L. Janin, A. Croisy, J.F. Riou, E. Bisagni, Synthesis and evaluation of new 6-amino-substituted benzo[*c*]phenanthridine derivatives, *J. Med. Chem.* 36 (1993) 3686–3692.
- [66] D. Makhey, D. Li, B. Zhao, S.P. Sim, T.K. Li, A. Liu, L.F. Liu, E.J. LaVoie, Substituted benzo[*i*]phenanthridines as mammalian topoisomerase-targeting agents, *Bioorganic Med. Chem.* 11 (2003) 1809–1820.
- [67] H. Jiang, Y. Cheng, R. Wang, M. Zheng, Y. Zhang, S. Yu, Synthesis of 6-alkylated phenanthridine derivatives using photoredox neutral SOMOphilic isocyanide insertion, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 52 (2013) 13289–13292.
- [68] D. Leifert, C.G. Daniliuc, A. Studer, 6-alkylated phenanthridines via base promoted homolytic aromatic substitution (BHAS), *Org. Lett.* 15 (2013) 6286–6289.
- [69] J. Vrba, P. Doležel, J. Višar, J. Ulrichová, Cytotoxic activity of sanguinarine and dihydrosanguinarine in human promyelocytic leukemia HL-60 cells, *Toxicol. Vitro.* 23 (2009) 580–588.
- [70] S.D. Fang, L.K. Wang, S.M. Hecht, Inhibitors of DNA topoisomerase I isolated from the roots of *Zanthoxylum nitidum*, *J. Org. Chem.* 58 (1993) 5025–5027.
- [71] J. Vrba, P. Doležel, J. Višar, M. Modrianská, J. Ulrichová, Chelerythrine and dihydrochelerythrine induce G1 phase arrest and bimodal cell death in human

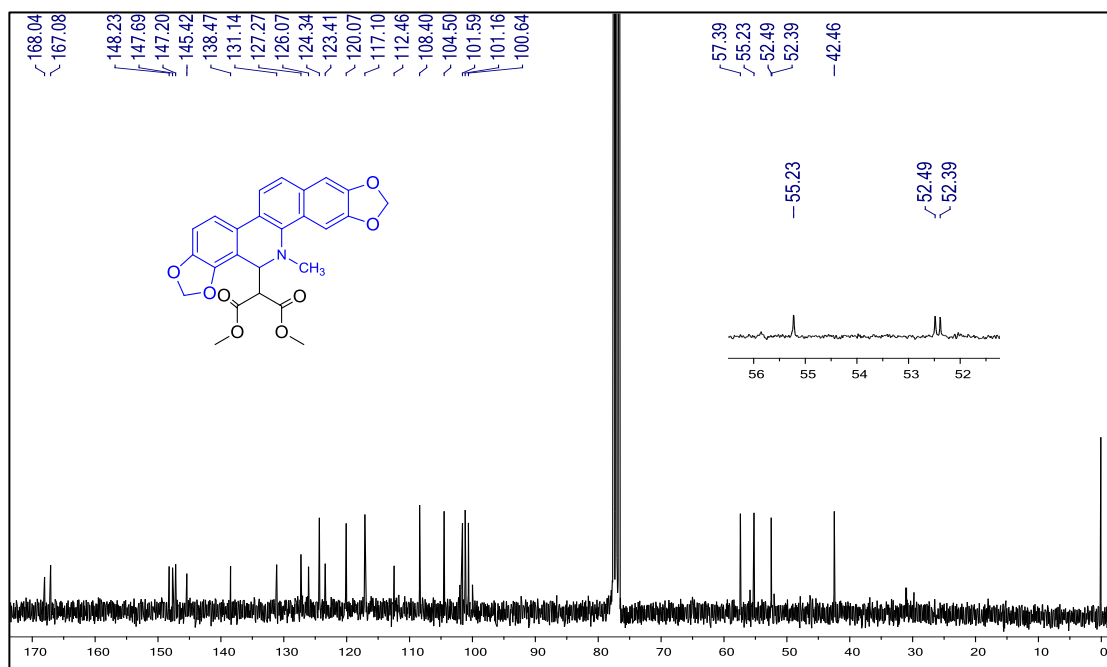
- leukemia HL-60 cells, *Toxicol. Vitr.* 22 (2008) 1008–1017.
- [72] A. jun Deng, H. lin Qin, Cytotoxic dihydrobenzophenanthridine alkaloids from the roots of *Macleaya microcarpa*, *Phytochemistry*. 71 (2010) 816–822.
- [73] E. Debiton, J.-C. Madelmont, J. Legault, C. Barthomeuf, Sanguinarine-induced apoptosis is associated with an early and severe cellular glutathione depletion., *Cancer Chemother. Pharmacol.* 51 (2003) 474–82.
- [74] M.H. Han, G.Y. Kim, Y.H. Yoo, Y.H. Choi, Sanguinarine induces apoptosis in human colorectal cancer HCT-116 cells through ROS-mediated Egr-1 activation and mitochondrial dysfunction, *Toxicol. Lett.* 220 (2013) 157–166.
- [75] C. Dupont, E. Couillerot, R. Gillet, C. Caron, M. Zeches-Hanrot, J.F. Riou, C. Trentesaux, The benzophenanthridine alkaloid fagaronine induces erythroleukemic cell differentiation by gene activation, *Planta Med.* 71 (2005) 489–494.
- [76] R. Sándor, A. Midlik, K. Šebřlová, G. Dovrtělová, K. Nosková, J. Juřica, I. Slaninová, E. Táborská, O. Peš, Identification of metabolites of selected benzophenanthridinealkaloids and their toxicity evaluation, *J. Pharm. Biomed. Anal.* (n.d.).
- [77] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, Programmed Cell Death (Apoptosis), (2002).
- [78] M. Ocker, M. Höpfner, Apoptosis-modulating drugs for improved cancer therapy, *Eur. Surg. Res.* 48 (2012) 111–120.
- [79] S. Elmore, Apoptosis: a review of programmed cell death., *Toxicol. Pathol.* 35 (2007) 495–516.
- [80] M. McMahon, Shereen Skola, What is Cell Cycle Arrest?, *WisegEEK*. (2016) 1. <http://www.wisegEEK.com/what-is-cell-cycle-arrest.htm> (accessed June 1, 2016).
- [81] A. Bandyopadhyay, K. Tsuji, K. Cox, B.D. Harfe, V. Rosen, C.J. Tabin, Genetic Analysis of the Roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in Limb Patterning and Skeletogenesis, *PLoS Genet.* 2 (2006) e216.
- [82] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: The next generation, *Cell*. 144 (2011) 646–674.
- [83] F. Cavallo, C. De Giovanni, P. Nanni, G. Forni, P.L. Lollini, 2011: The immune hallmarks of cancer, *Cancer Immunol. Immunother.* 60 (2011) 319–326.
- [84] D.A. Martin, K.B. Elkon, Mechanisms of apoptosis, *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 30 (2004) 441–454.

- [85] T.X. Nguyen, M. Abdelmalak, C. Marchand, K. Agama, Y. Pommier, M. Cushman, Synthesis and Biological Evaluation of Nitrated 7-, 8-, 9-, and 10-Hydroxyindenoisoquinolines as Potential Dual Topoisomerase I (Top1)-Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase I (TDP1) Inhibitors, *J. Med. Chem.* 58 (2015) 3188–3208.
- [86] K. Kirkegaard, G. Pflugfelder, J.C. Wang, The Cleavage of DNA by Type-I DNA Topoisomerases, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 49 (1984) 411–419.
- [87] G. Dong, C. Sheng, S. Wang, Z. Miao, J. Yao, W. Zhang, Selection of evodiamine as a novel topoisomerase I inhibitor by structure-based virtual screening and hit optimization of evodiamine derivatives as antitumor agents, *J. Med. Chem.* 53 (2010) 7521–7531.
- [88] T.S. Dexheimer, Y. Pommier, DNA cleavage assay for the identification of topoisomerase I inhibitors., *Nat. Protoc.* 3 (2008) 1736–50.
- [89] D.B. Khadka, W.-J. Cho, Topoisomerase inhibitors as anticancer agents: a patent update., *Expert Opin. Ther. Pat.* 23 (2013) 1033–56.
- [90] M.M. Gottesman, Mechanisms of cancer drug resistance., *Annu. Rev. Med.* 53 (2002) 615–27.
- [91] A. Haimeur, G. Conseil, R.G. Deeley, S.P.C. Cole, The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation., *Curr. Drug Metab.* 5 (2004) 21–53.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14965249> (accessed April 8, 2016).
- [92] I. Abraham, K. El Sayed, Z.S. Chen, H. Guo, Current status on marine products with reversal effect on cancer multidrug resistance, *Mar. Drugs.* 10 (2012) 2312–2321.
- [93] S.-M. He, R. Li, J.R. Kanwar, S.-F. Zhou, Structural and functional properties of human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1)., *Curr. Med. Chem.* 18 (2011) 439–81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21143116> (accessed April 8, 2016).
- [94] Z. Ni, Z. Bikadi, M.F. Rosenberg, Q. Mao, Structure and function of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)., *Curr. Drug Metab.* 11 (2010) 603–17. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20812902> (accessed April 8, 2016).
- [95] L. Chavez-Acevedo, L.D. Miranda, Organic & Biomolecular Chemistry Synthesis of novel tryptamine-based macrocycles using an Ugi 4-CR/microwave

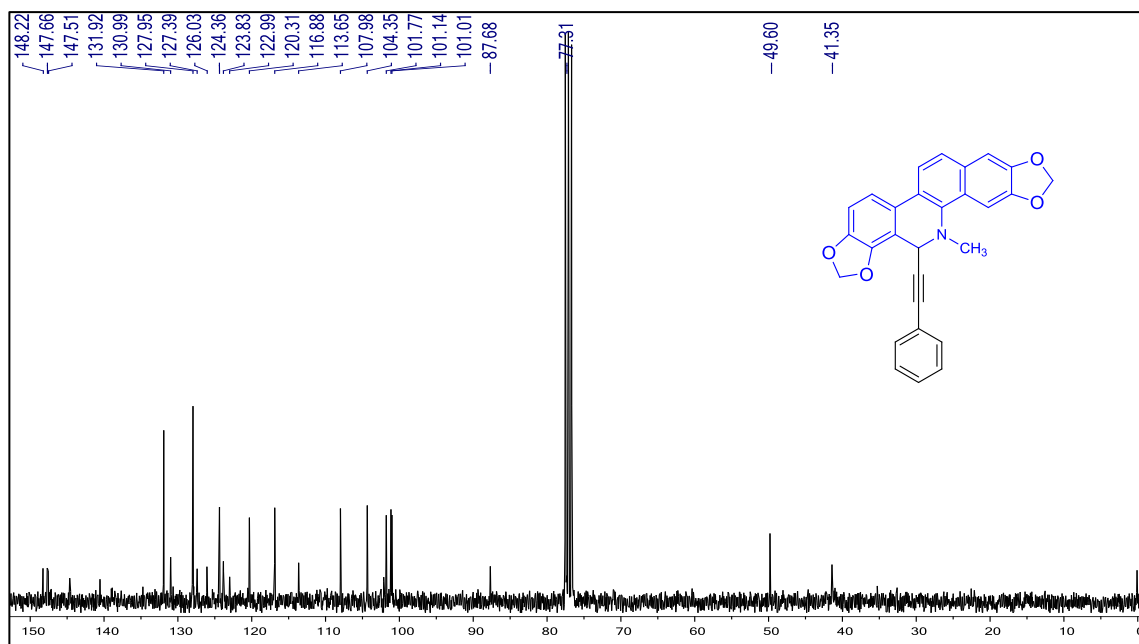
- assisted click-cycloaddition reaction protocol, *Org. Biomol. Chem.* 13 (2015).
- [96] O. Baslé, C.-J. Li, Copper catalyzed oxidative alkylation of sp³ C–H bond adjacent to a nitrogen atom using molecular oxygen in water, (2007).
- [97] A. Padwa, C.K. Eidell, Preparation and cycloaddition chemistry of 1-amino substituted isobenzofurans, *Arkivoc.* 2003 (2003) 62–76. <Go to ISI>://WOS:000220561500007.
- [98] I. Ninomiya, T. Naito, T. Kiguchi, T. Mori, Photocyclisation of enamides. Part II. Photocyclisation of N-benzoyl enamines of 1-tetralone to benzo[c]phenanthridines, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1.* (1973) 1696.
- [99] L.K. Wang, R.K. Johnson, S.M. Hecht, Inhibition of topoisomerase I function by nitidine and fagaronine, *Chem. Res. Toxicol.* 6 (1993) 813–818.
- [100] J.A. Holden, M.E. Wall, M.C. Wani, G. Manikumar, Human DNA topoisomerase I: quantitative analysis of the effects of camptothecin analogs and the benzophenanthridine alkaloids nitidine and 6-ethoxydihydroneitidine on DNA topoisomerase I-induced DNA strand breakage., *Arch. Biochem. Biophys.* 370 (1999) 66–76.
- [101] S. Prado, S. Michel, F. Tillequin, M. Koch, B. Pfeiffer, A. Pierré, S. Léonce, P. Colson, B. Baldeyrou, A. Lansiaux, C. Bailly, Synthesis and cytotoxic activity of benzo[c][1,7] and [1,8]phenanthrolines analogues of nitidine and fagaronine., *Bioorg. Med. Chem.* 12 (2004) 3943–53.

ANEXOS
ESPECTROS DE RMN ^1H y ^{13}C

ESPECTROS DE RMN ^{13}C DE LOS DERIVADOS 1a Y 1c

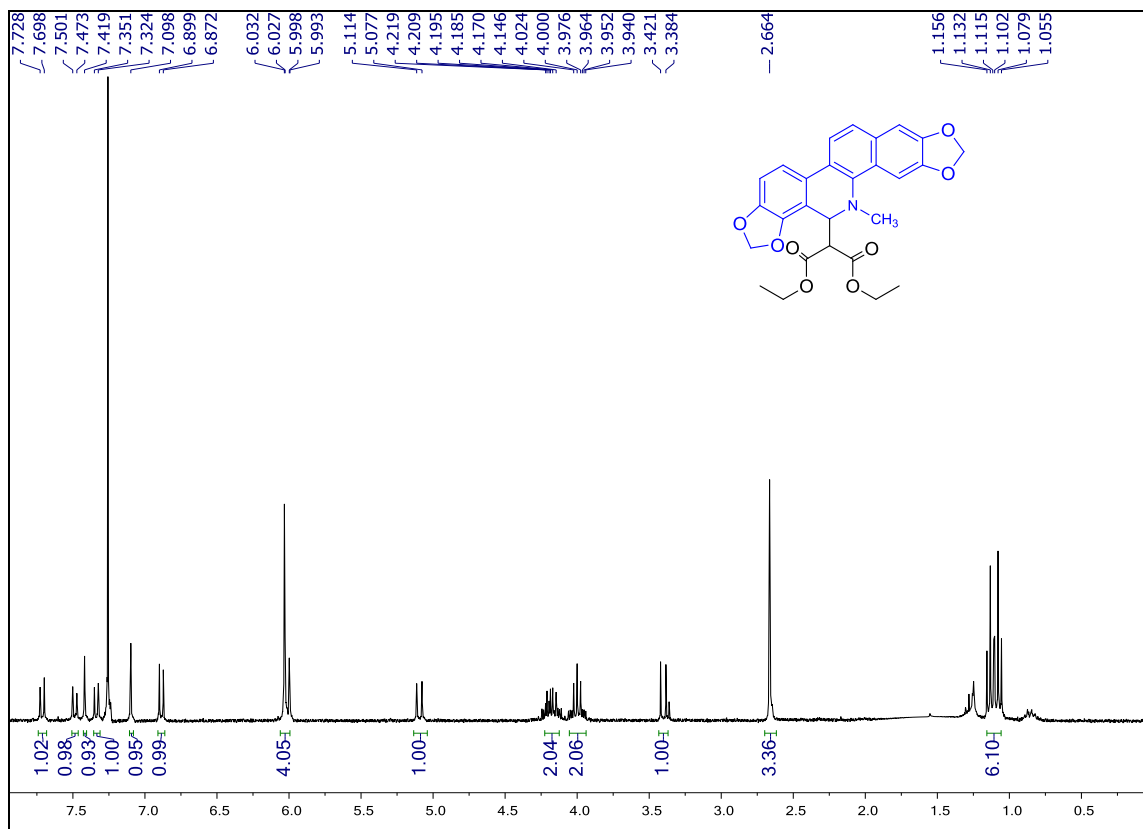


Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) del compuesto 1a

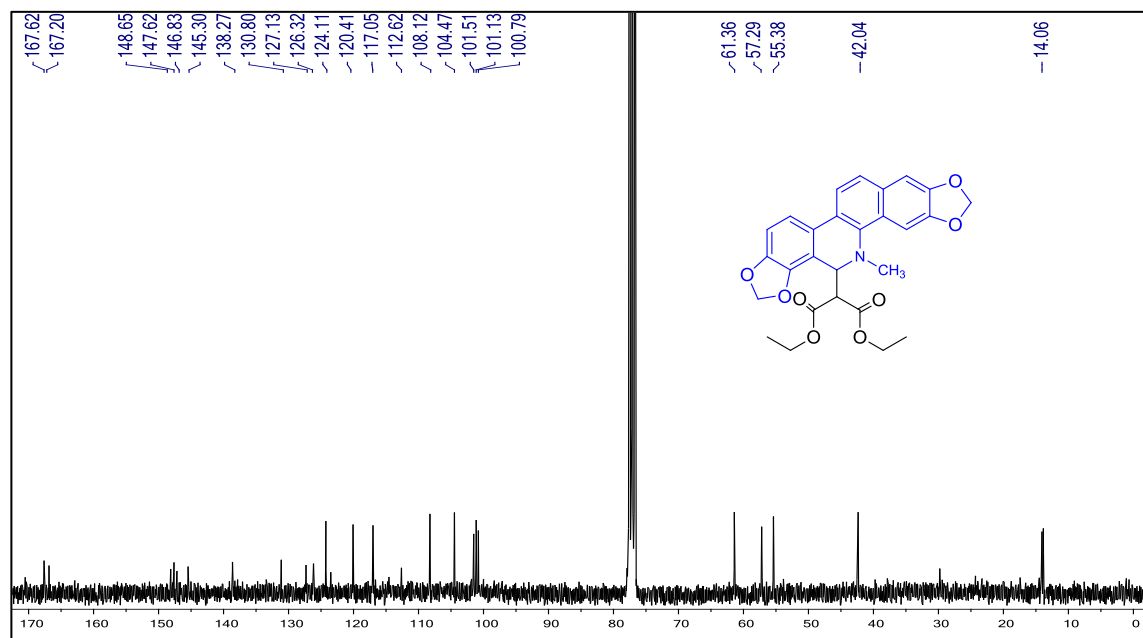


Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) del compuesto 1c

ESPECTROS DE RMN ^1H Y ^{13}C DEL DERIVADO **1b**

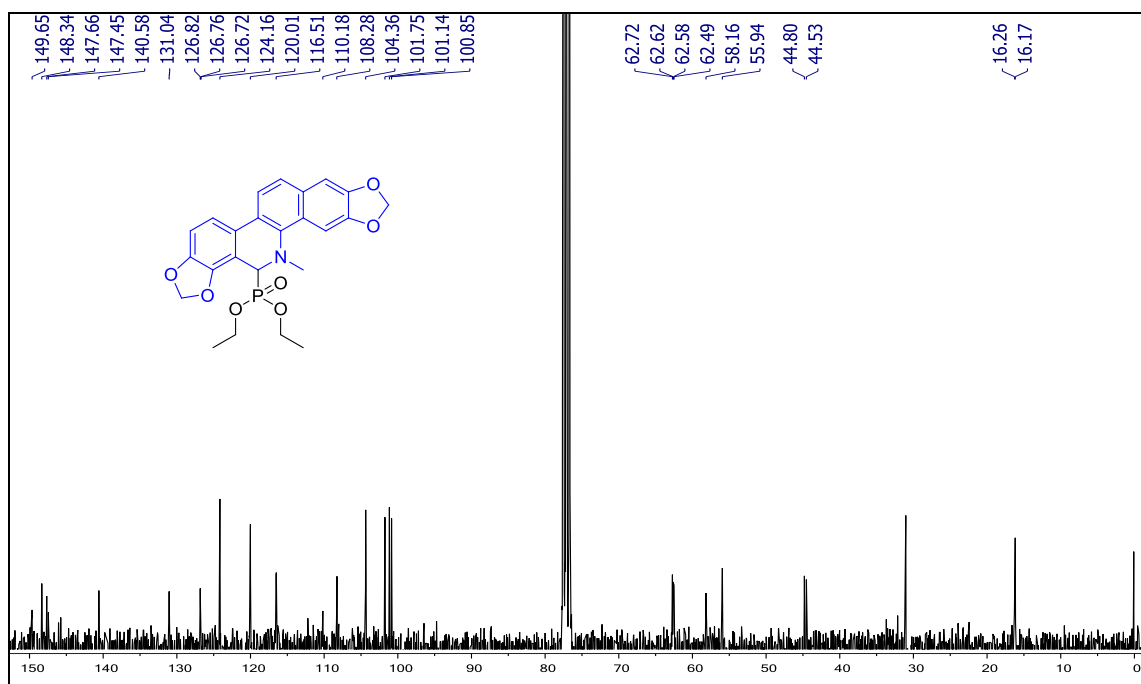


Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del compuesto **1b**

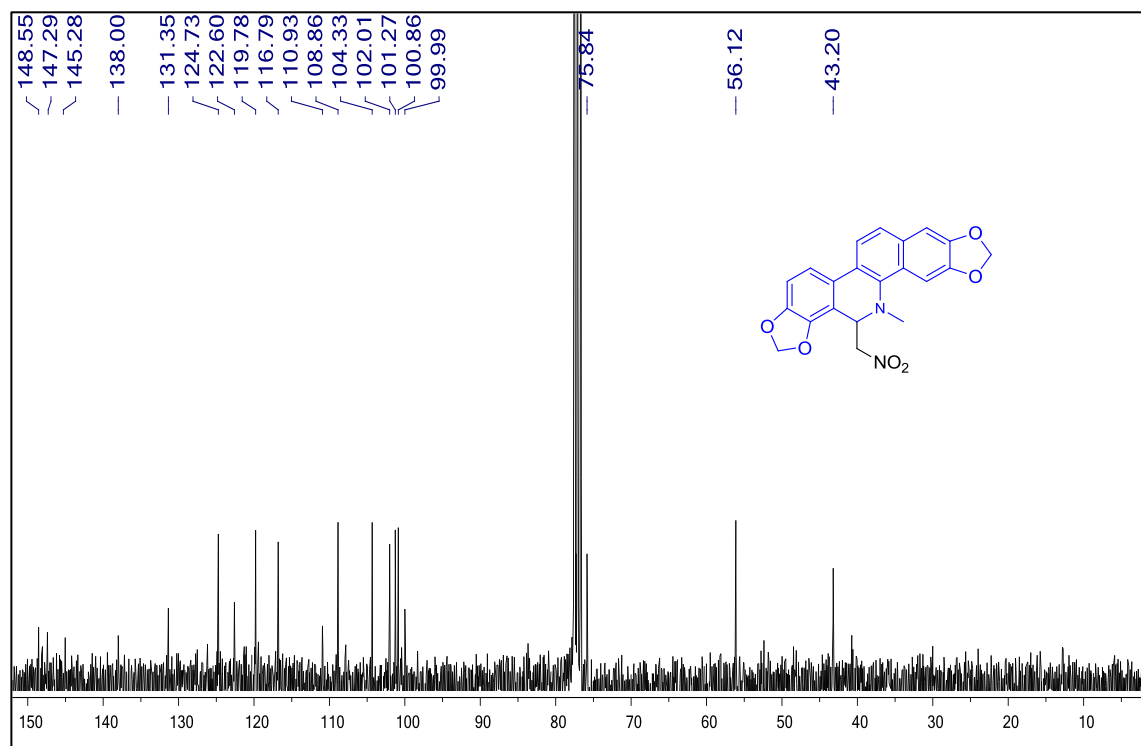


Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) del compuesto **1b**

ESPECTROS DE RMN ^{13}C DE LOS DERIVADOS **1d** Y **1f**

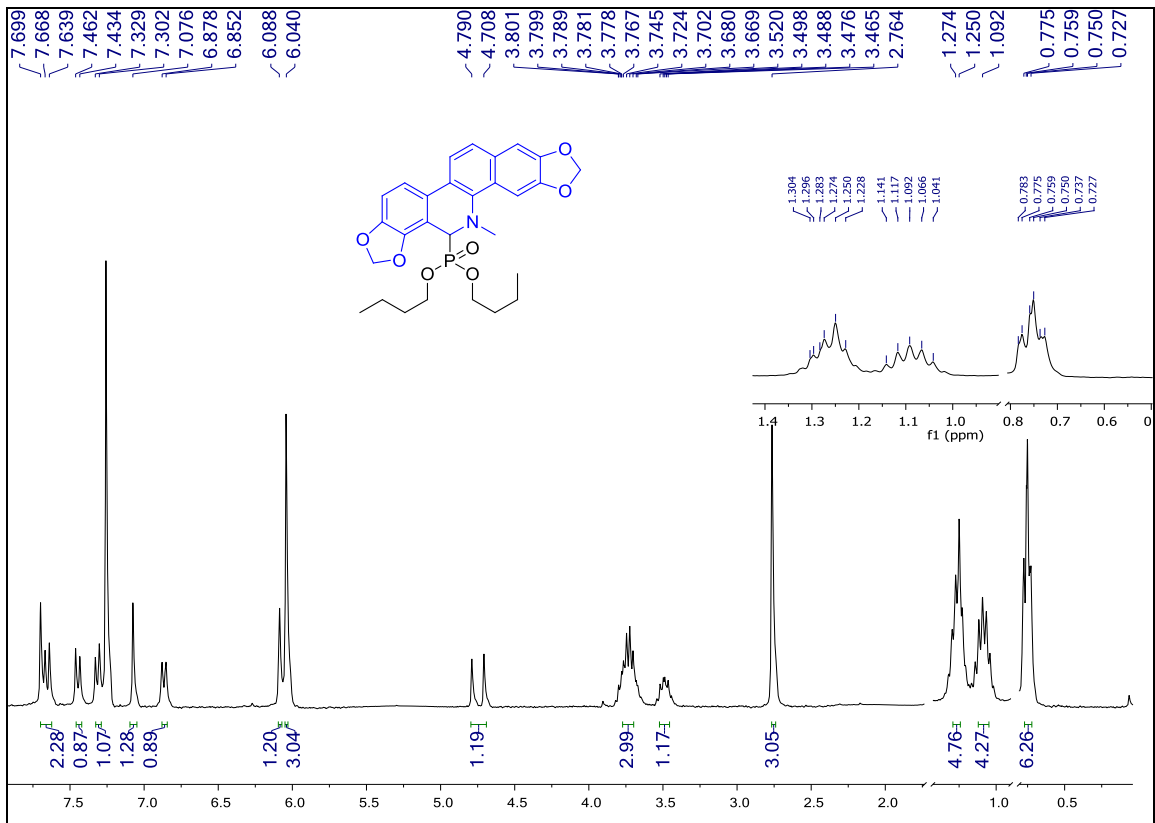


Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) del compuesto **1d**

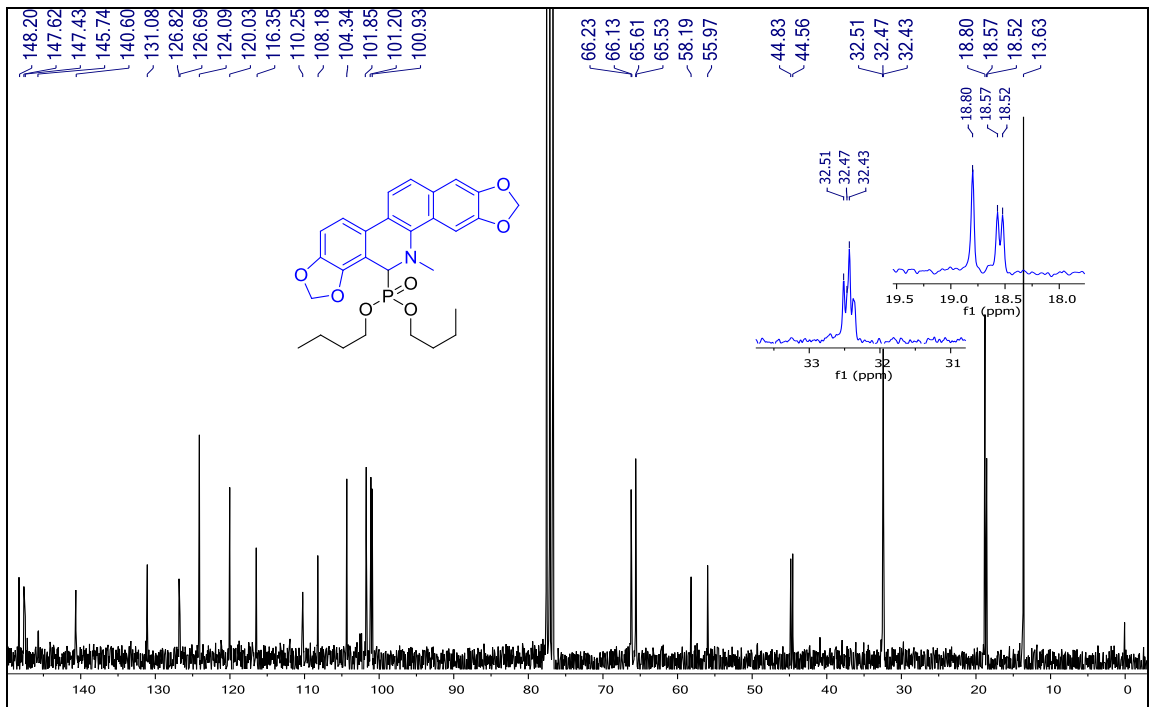


Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) del compuesto **1f**

ESPECTROS DE RMN ¹H Y ¹³C DEL DERIVADO 1e

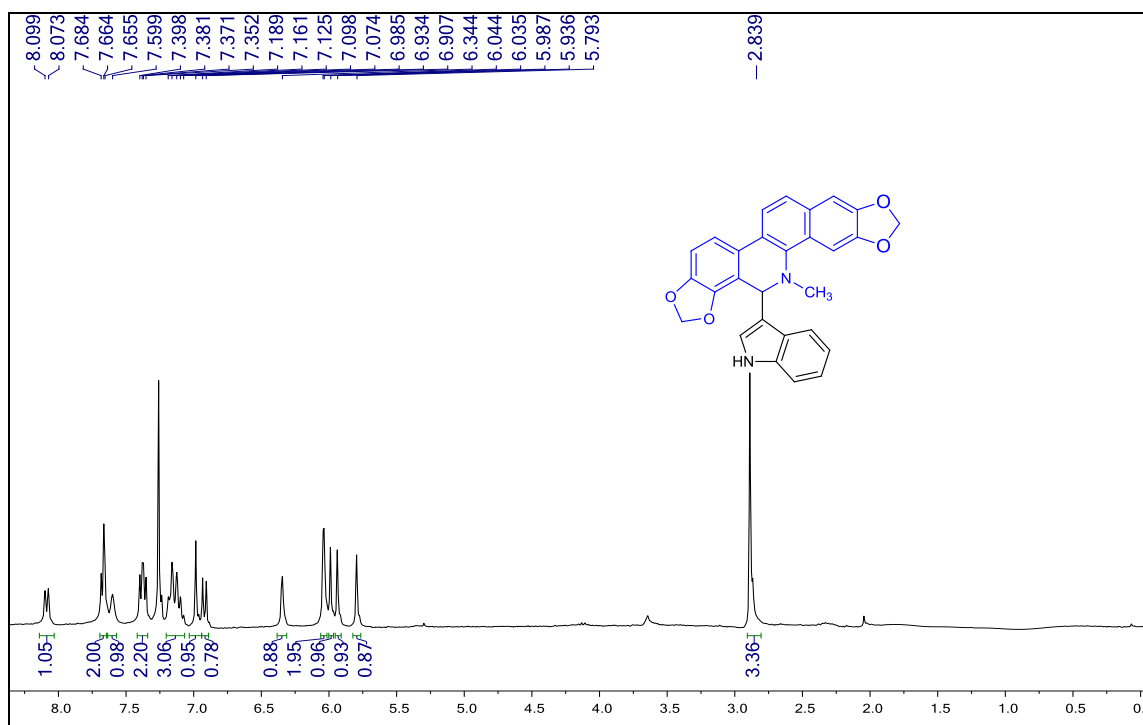


Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) del compuesto 1e

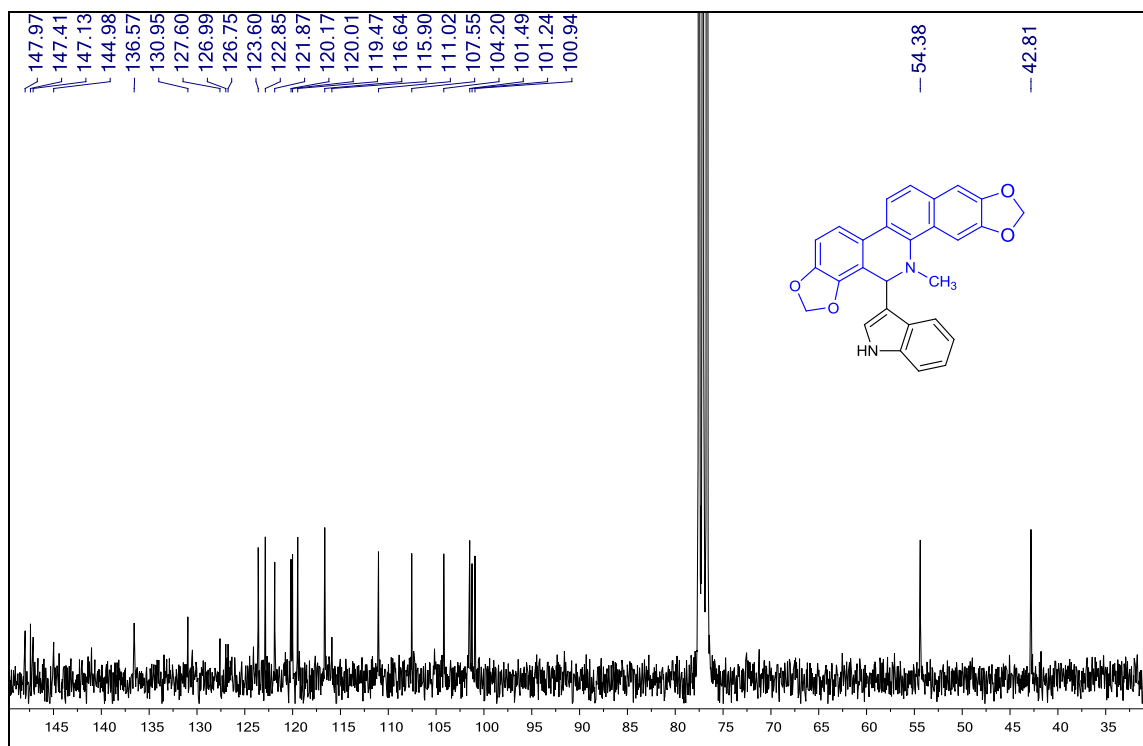


Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) del compuesto 1e

ESPECTROS DE RMN ^1H Y ^{13}C DEL DERIVADO 1g

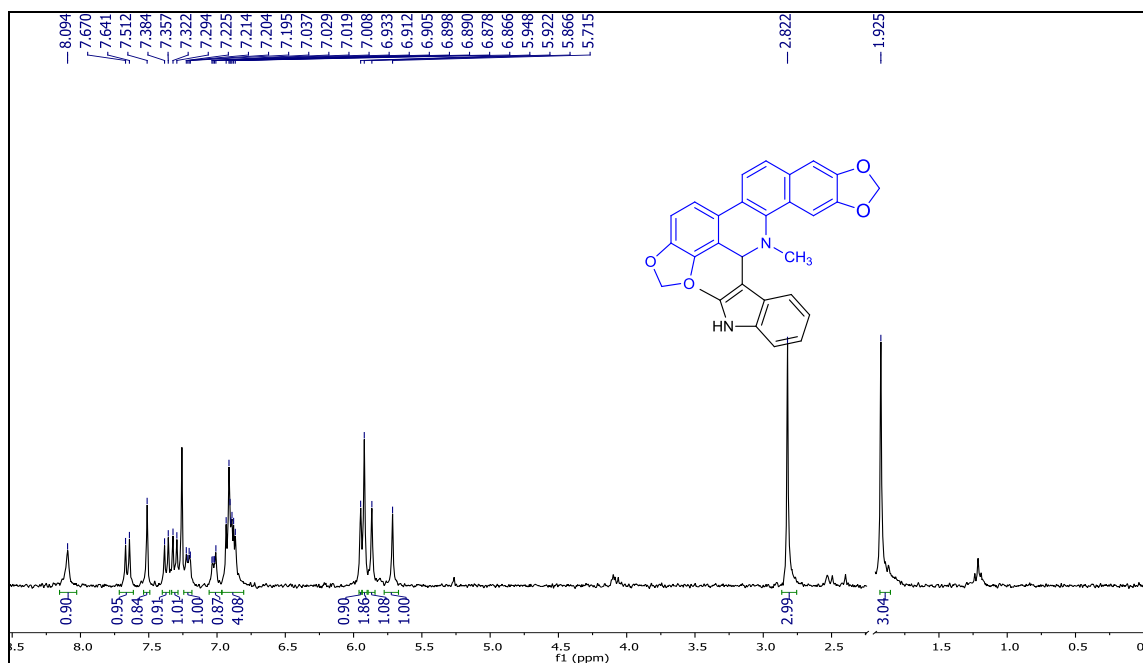


Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del compuesto 1g

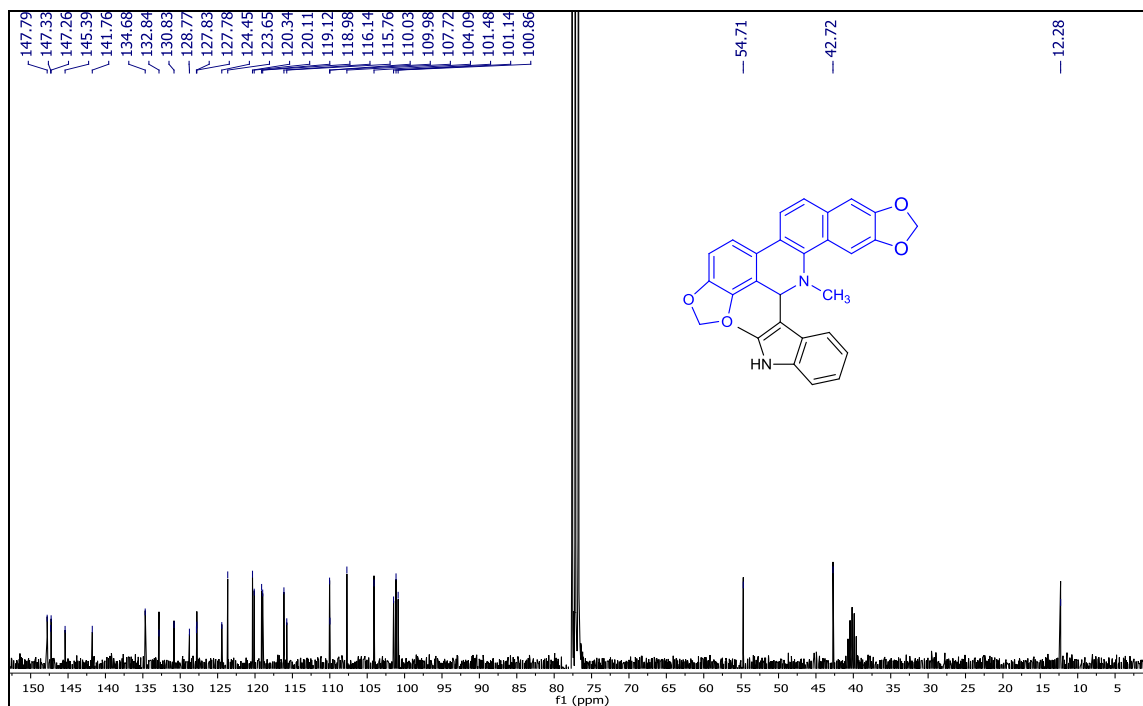


Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) del compuesto 1g

ESPECTROS DE RMN ^1H Y ^{13}C DEL DERIVADO 1h

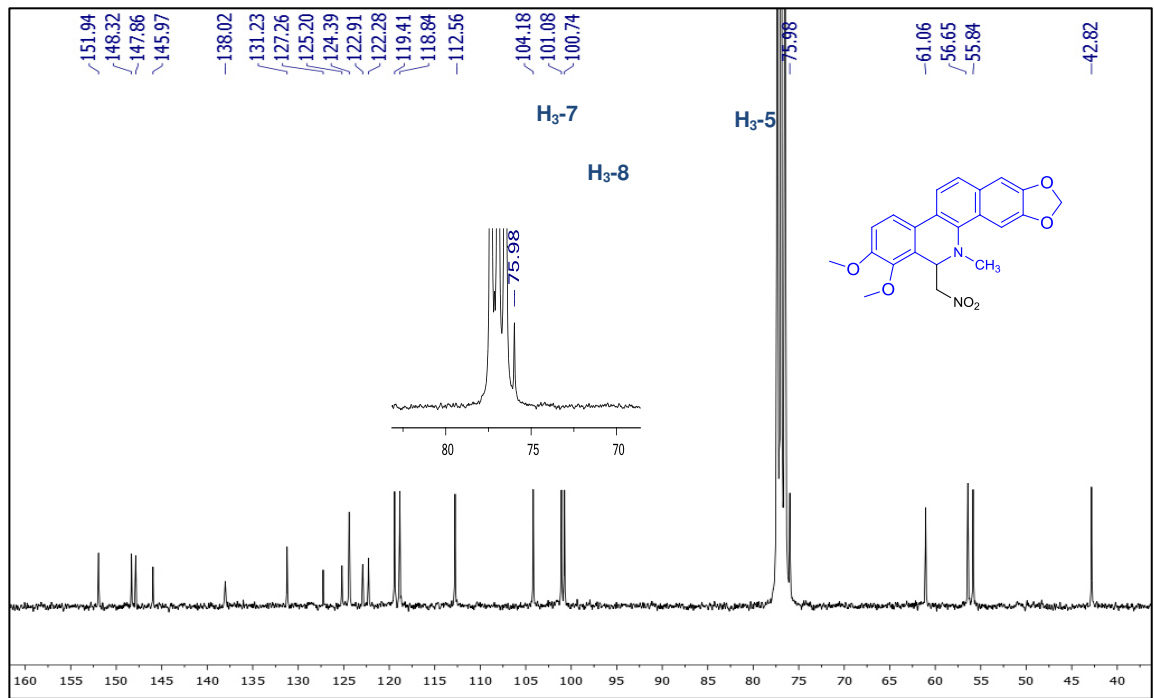


Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , CD_3SOCD_3 (95:5)) del compuesto 1h

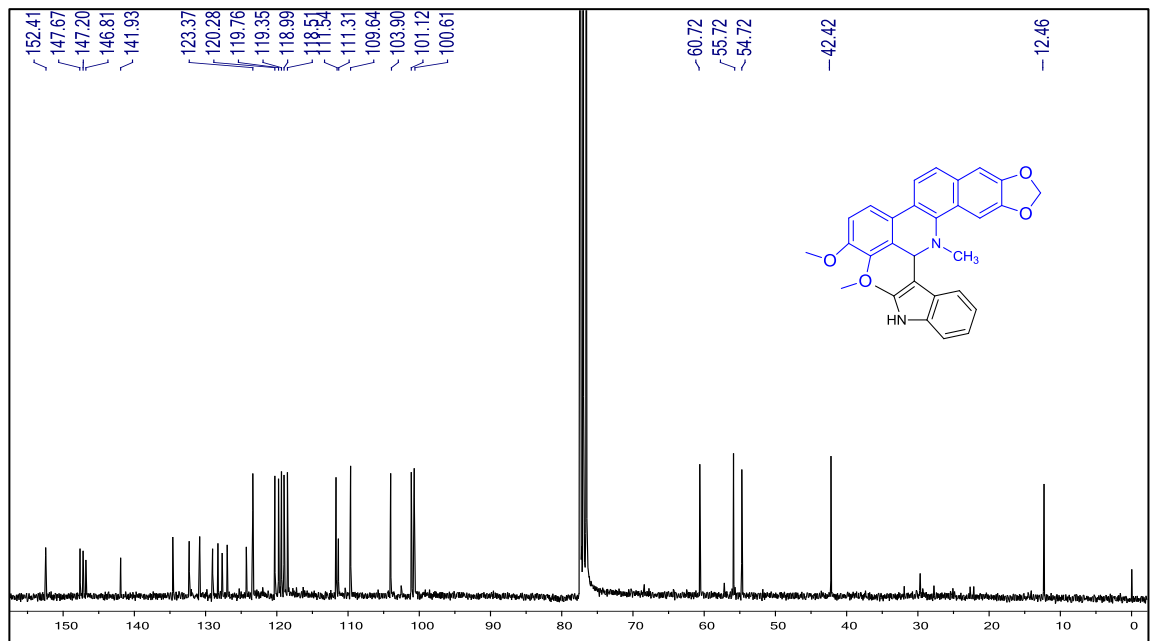


Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , CD_3SOCD_3 (95:5)) del compuesto 1h

ESPECTROS DE RMN ^{13}C DE LOS DERIVADOS DE DHQ 2a Y 2e

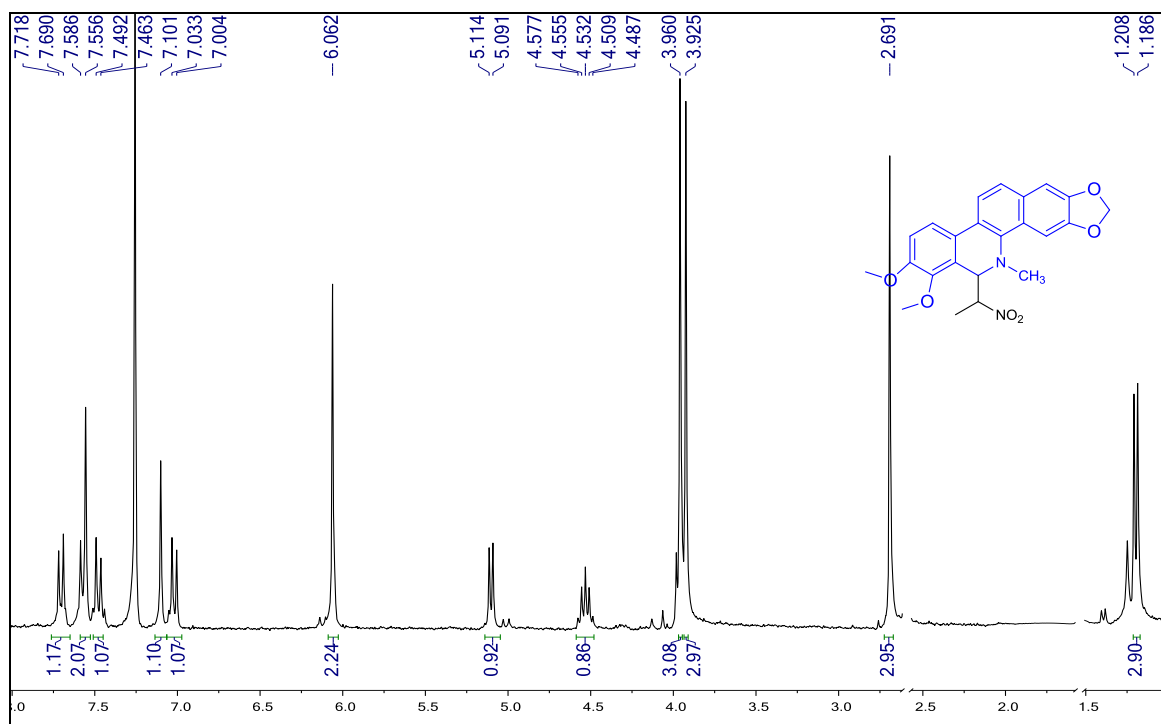


Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) del compuesto **2a**

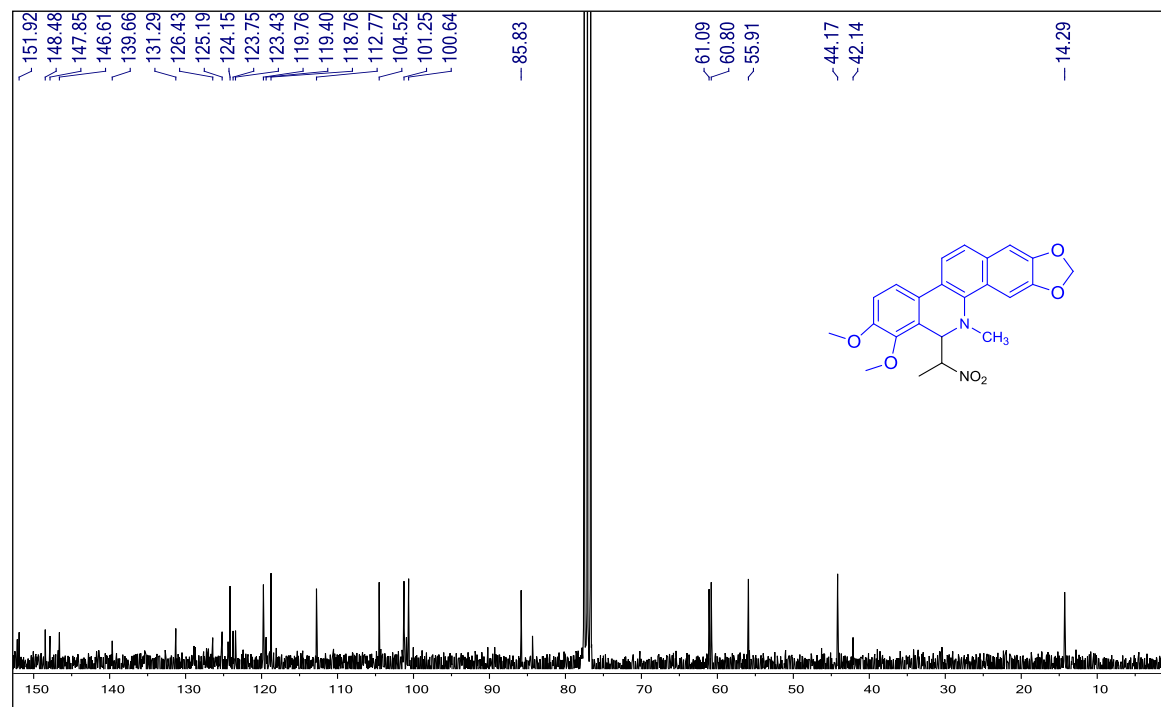


Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) del compuesto **2e**

ESPECTROS DE RMN ^1H Y ^{13}C DEL DERIVADO **2b**

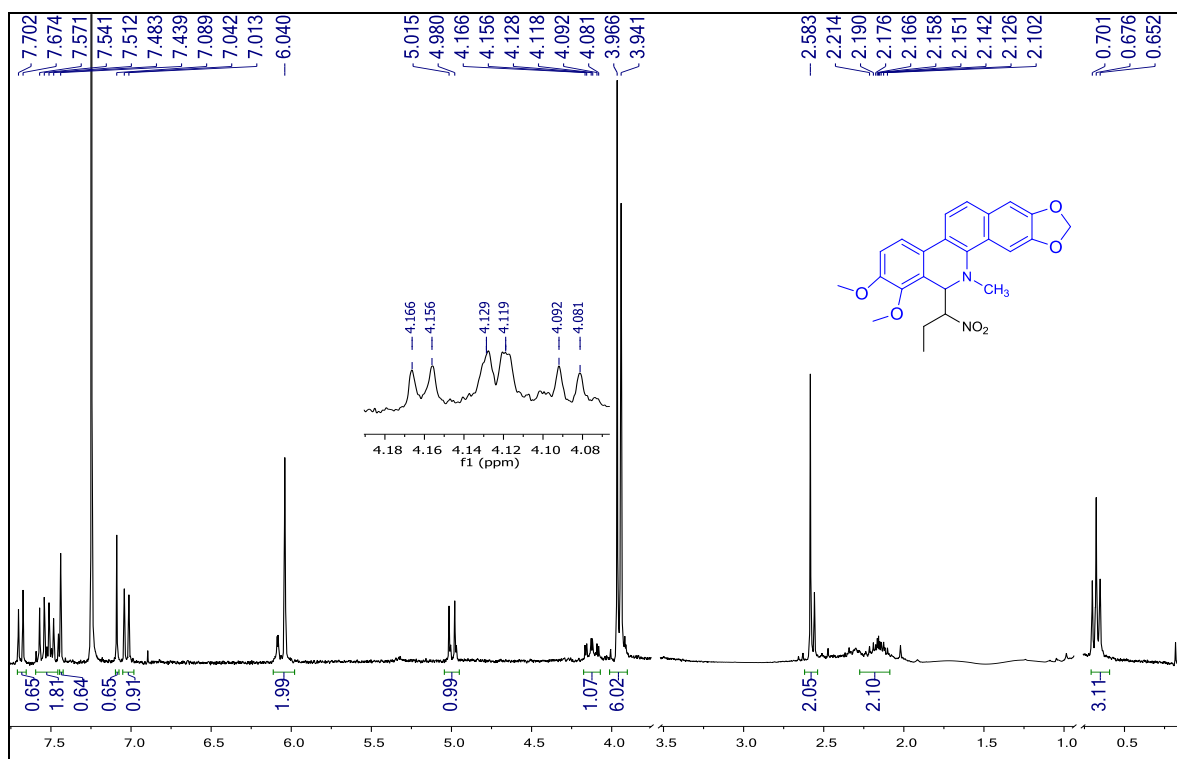


Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del compuesto **2b**

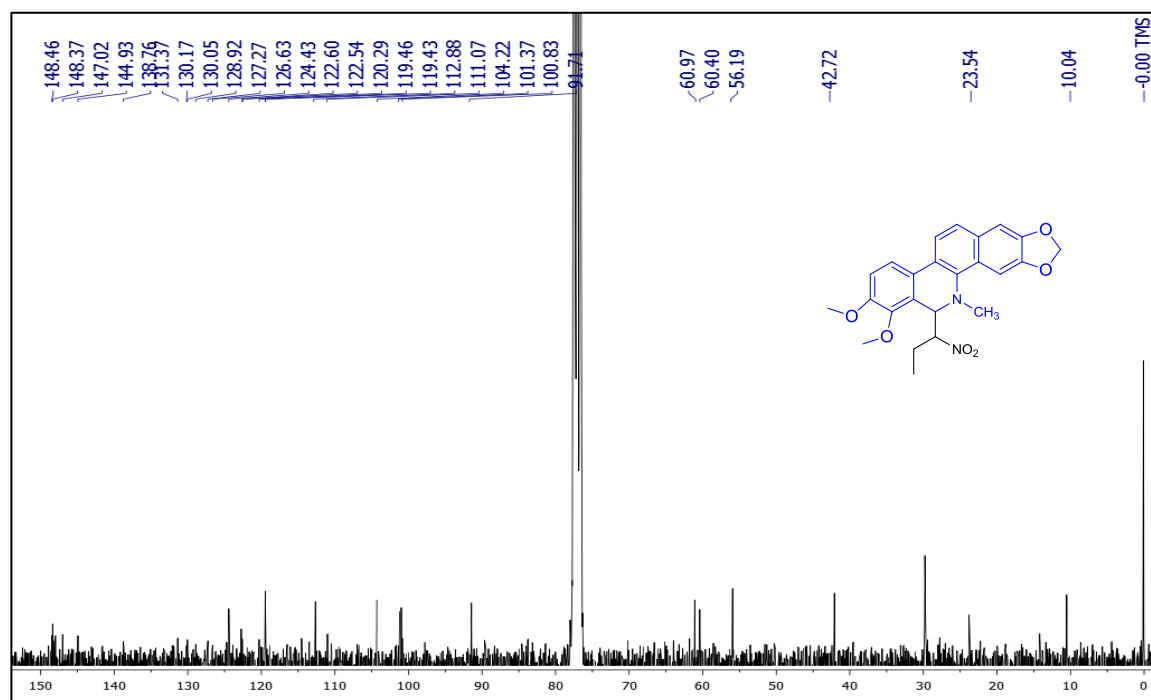


Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) del compuesto **2b**

ESPECTROS DE RMN ¹H Y ¹³C DEL DERIVADO 2c

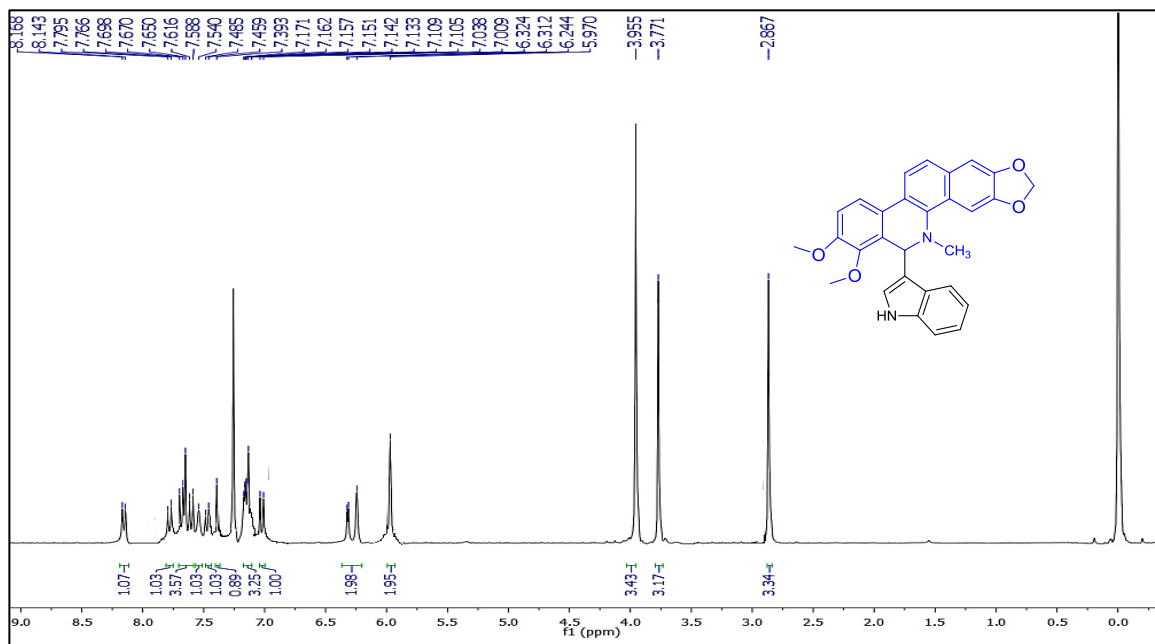


Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) del compuesto 2c

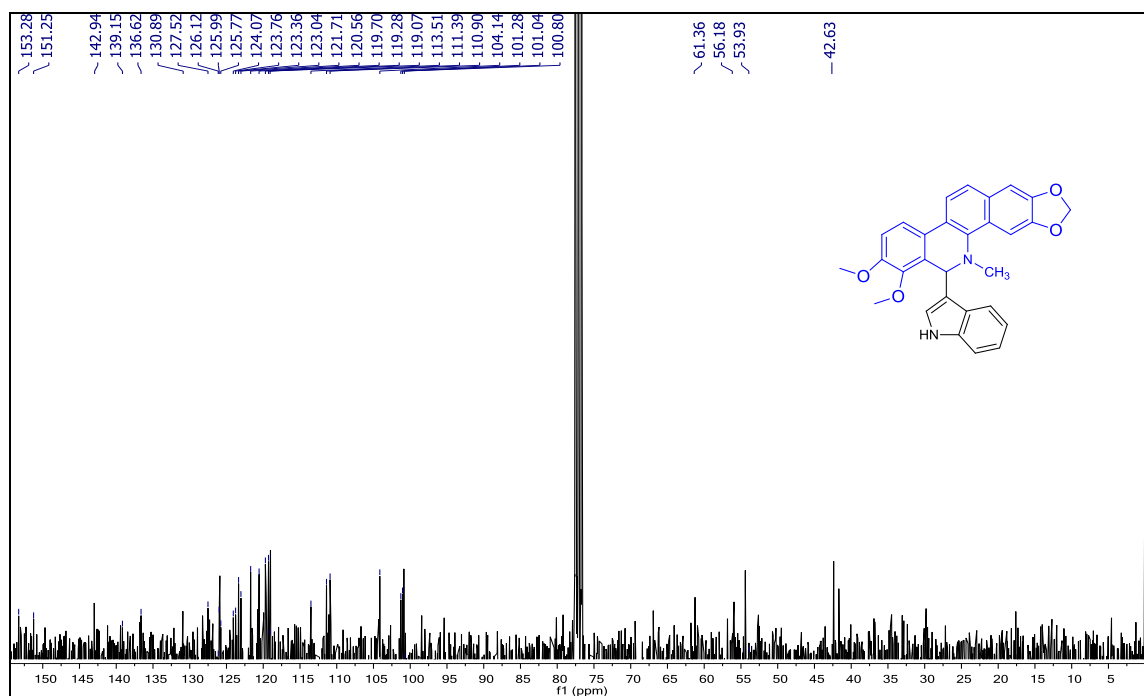


Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) del compuesto 2c

ESPECTROS DE RMN ^1H Y ^{13}C DEL DERIVADO 2d

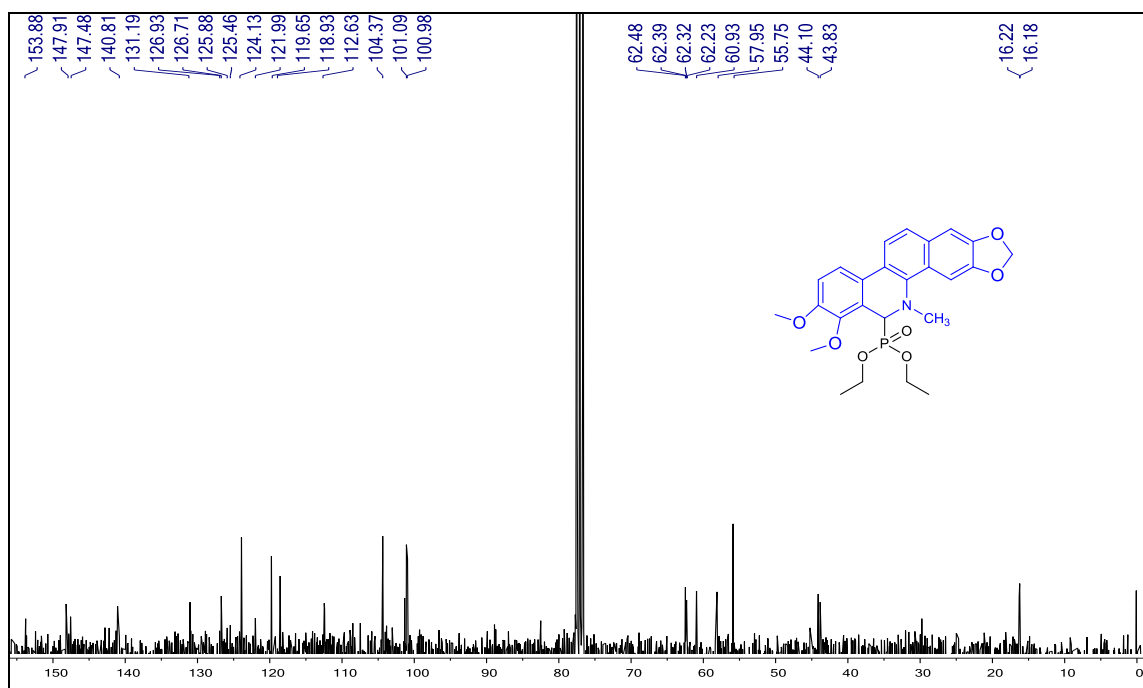


Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del compuesto 2d

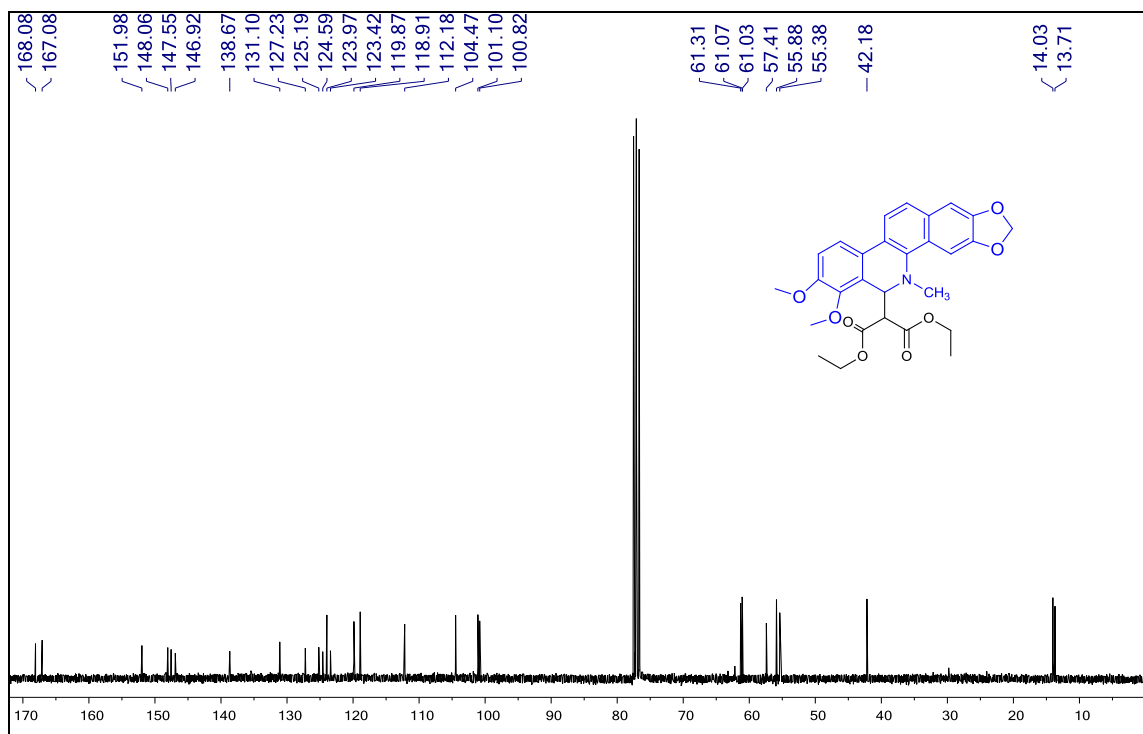


Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) del compuesto 2d

ESPECTROS DE RMN ^1H Y ^{13}C DE LOS DERIVADOS 2f Y 2i

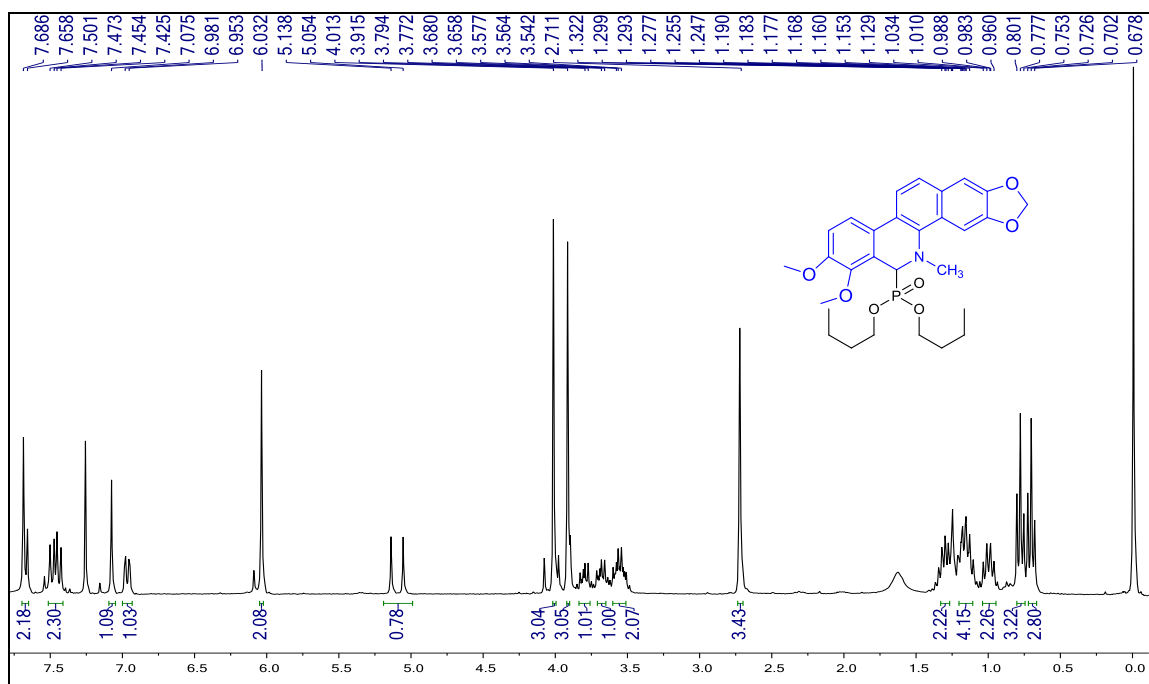


Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) del compuesto 2f

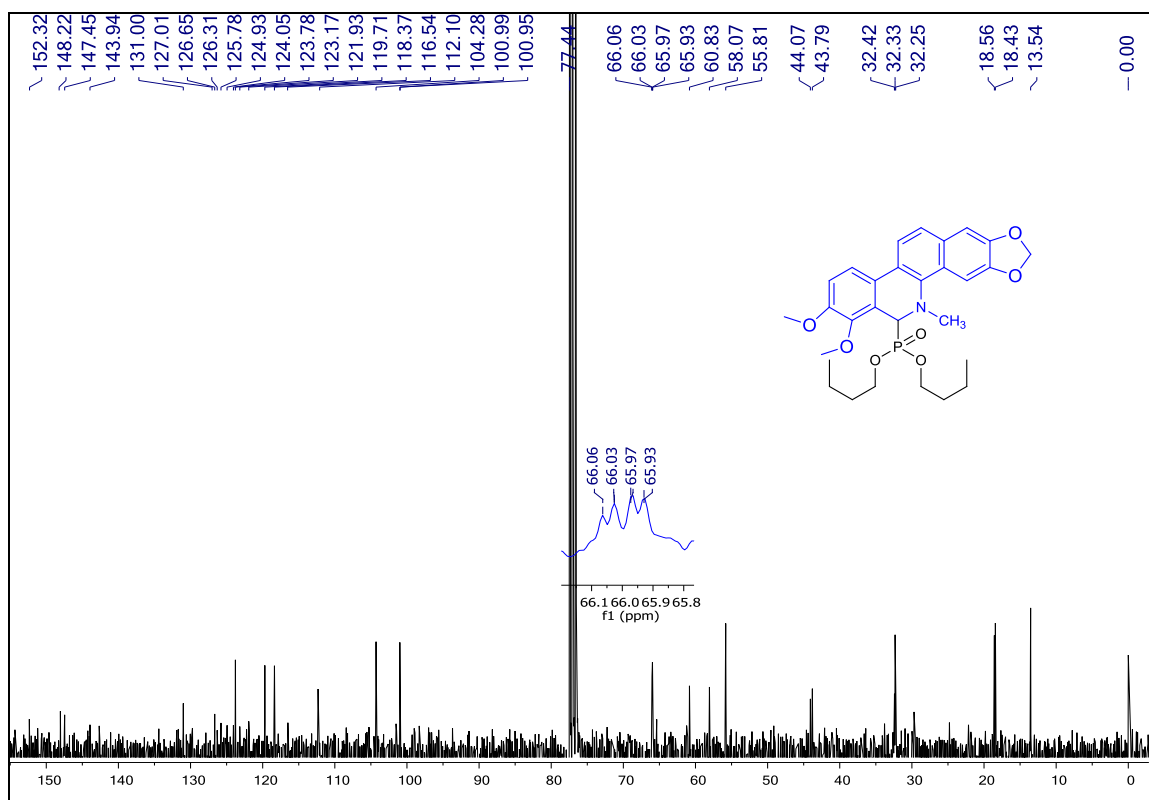


Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) del compuesto 2i

ESPECTROS DE RMN ^1H Y ^{13}C DEL DERIVADO **2g**

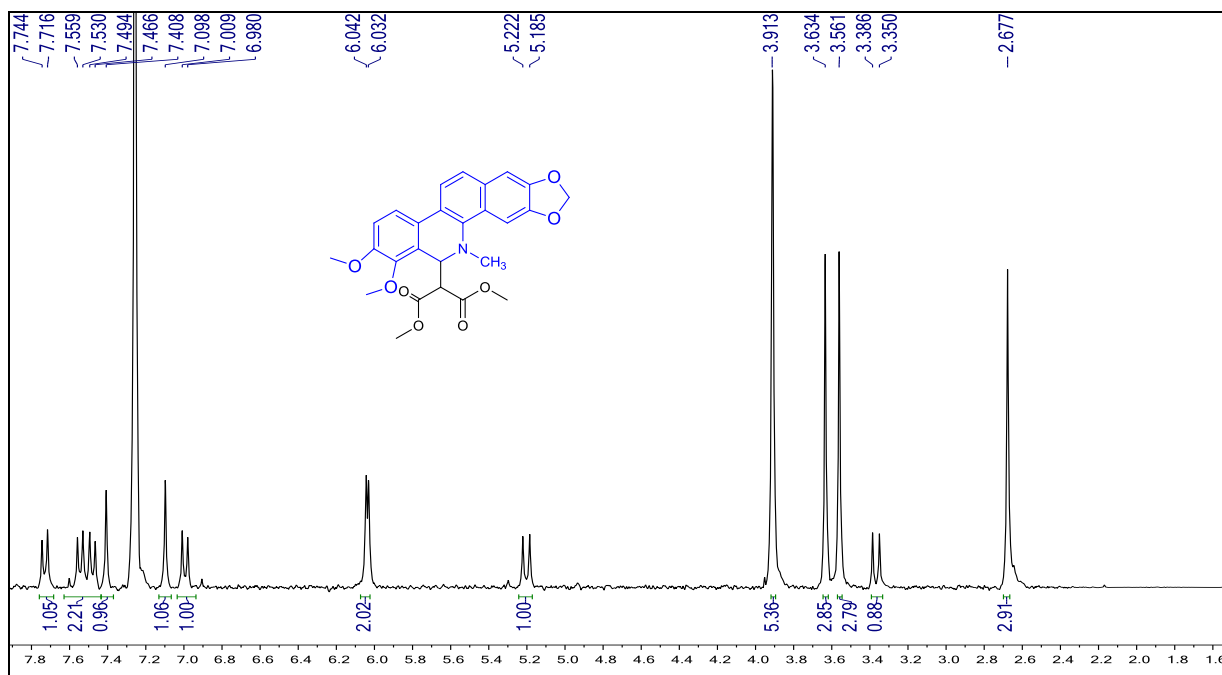


Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del compuesto **2g**

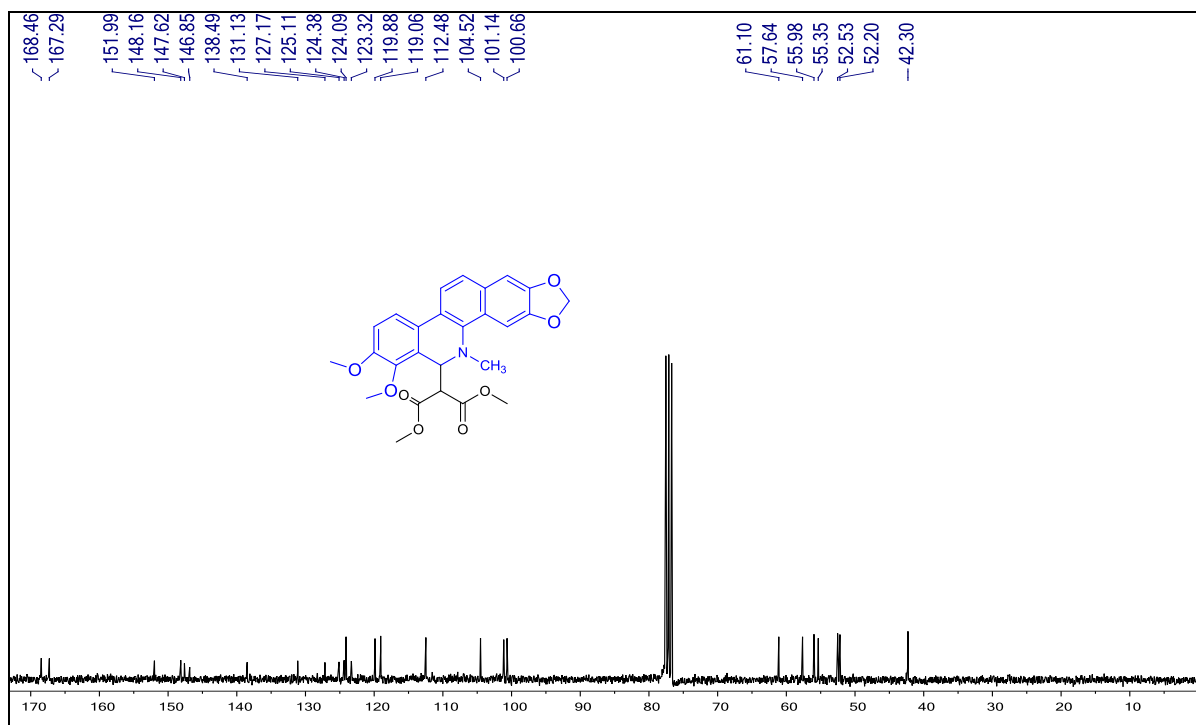


Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) del compuesto **2g**

ESPECTROS DE RMN ^1H Y ^{13}C DEL DERIVADO 2h

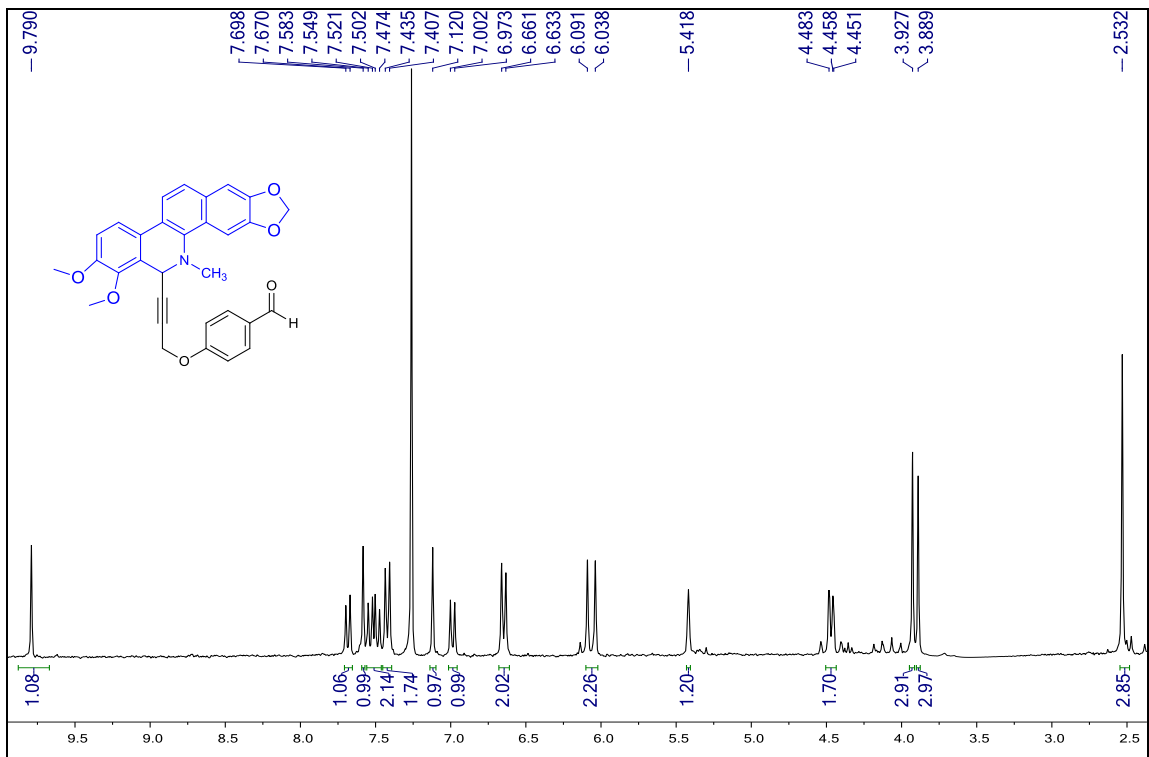


Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del compuesto 2h

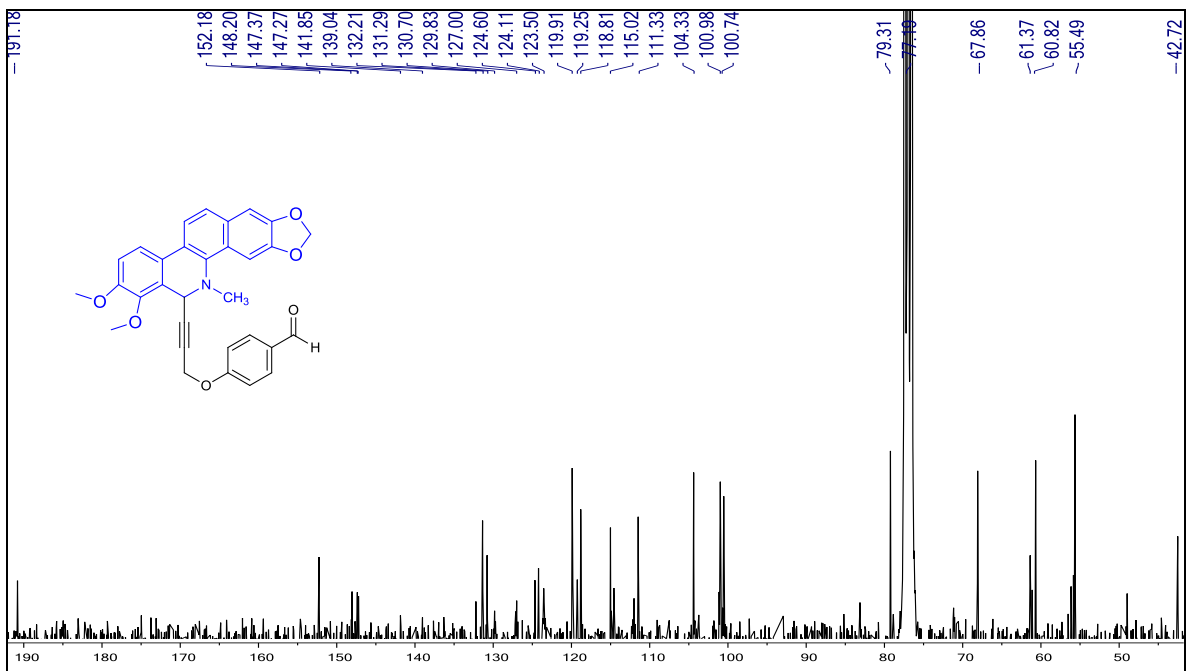


Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) del compuesto 2h

ESPECTROS DE RMN ¹H Y ¹³C DEL DERIVADO 2k

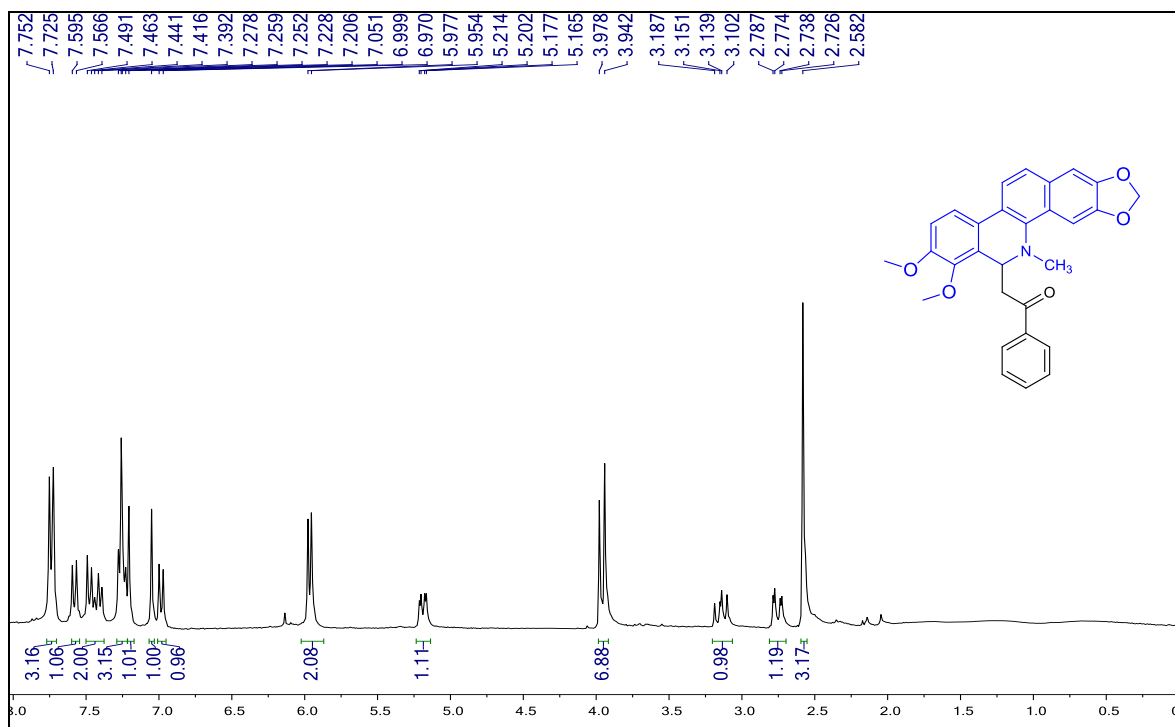


Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) del compuesto **2k**

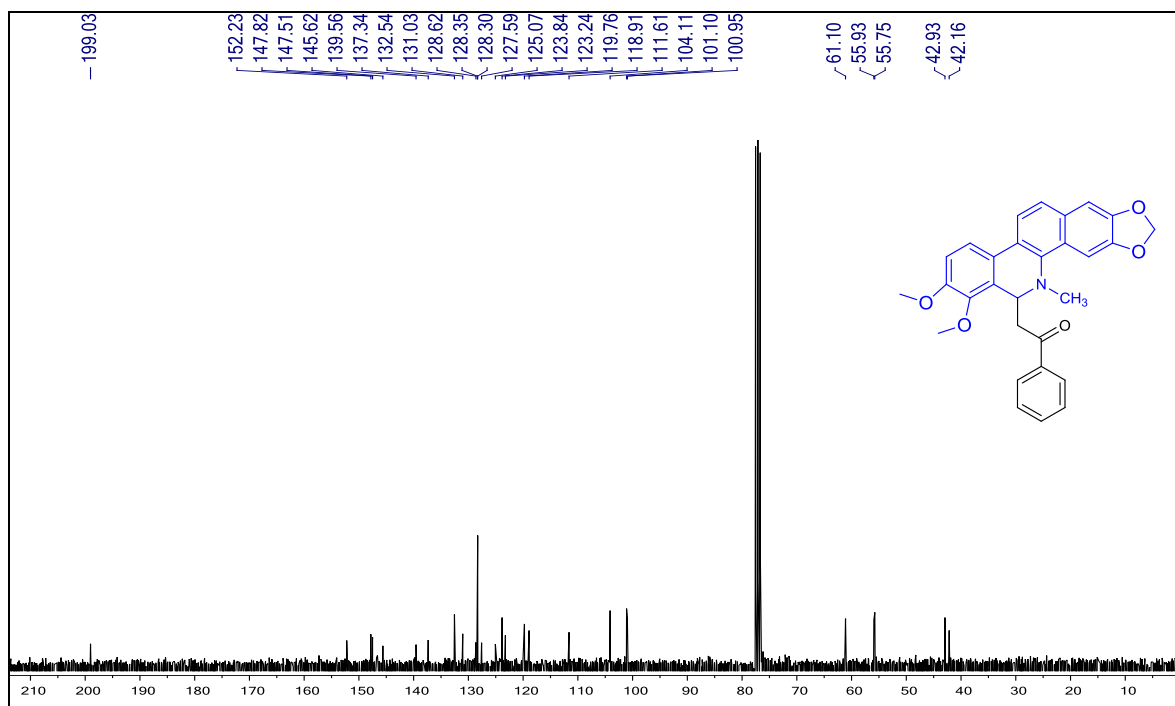


Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) del compuesto **2k**

ESPECTROS DE RMN ¹H Y ¹³C DEL DERIVADO 2I

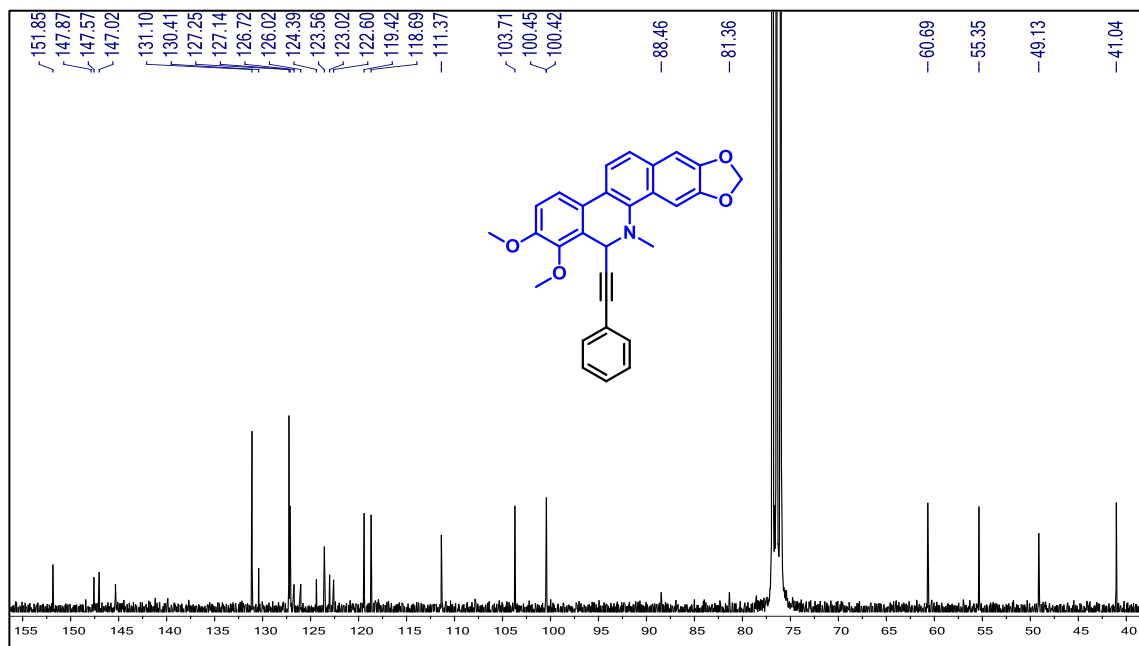


Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) del compuesto 2I



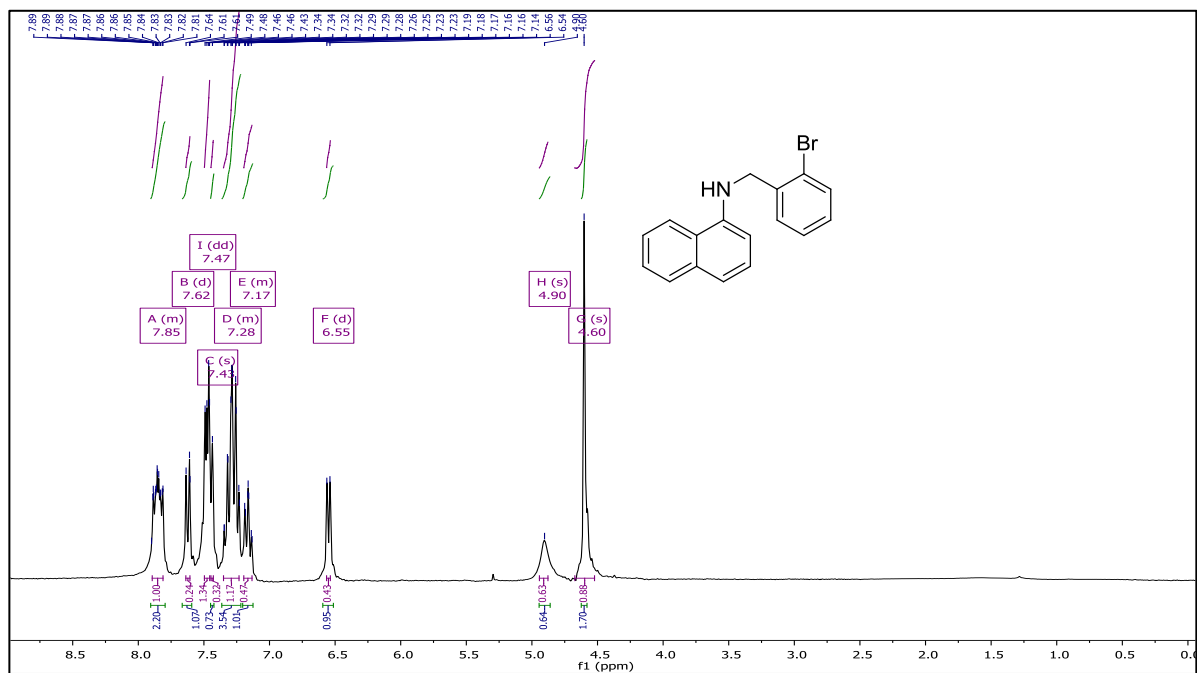
Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) del compuesto 2I

ESPECTRO DE RMN ¹³C DEL DERIVADO 2j

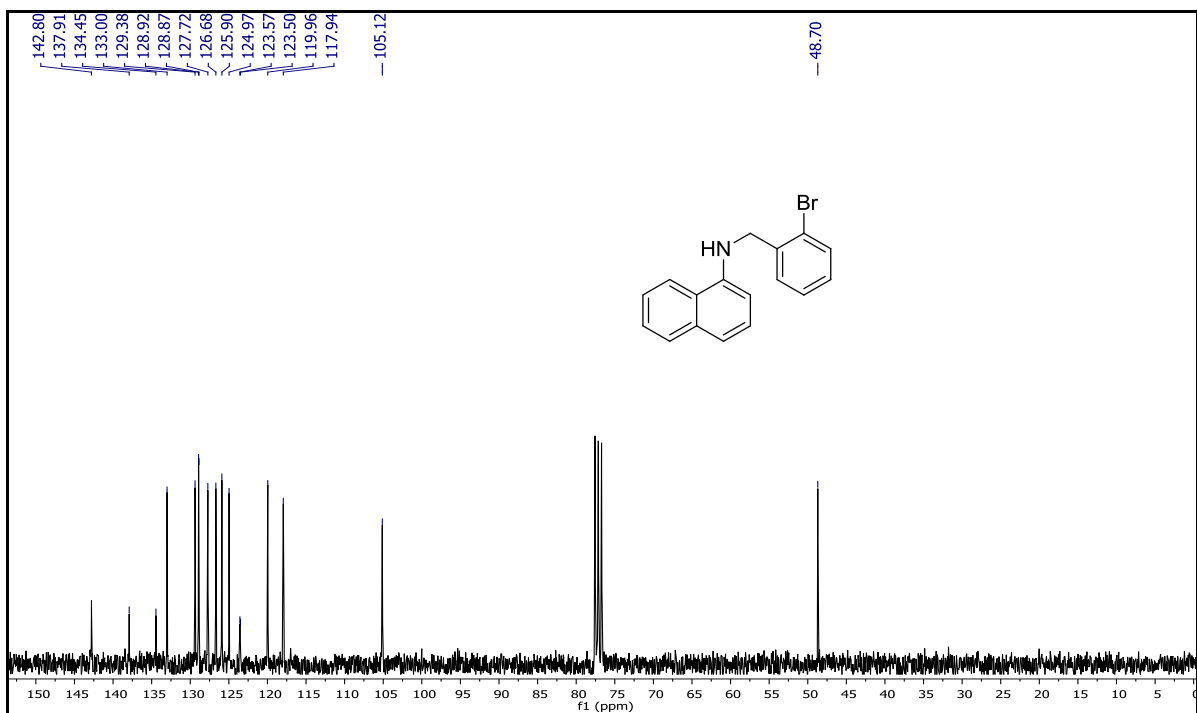


Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) del compuesto 2j

ESPECTROS DE RMN ^1H y ^{13}C DEL COMPUESTO 6

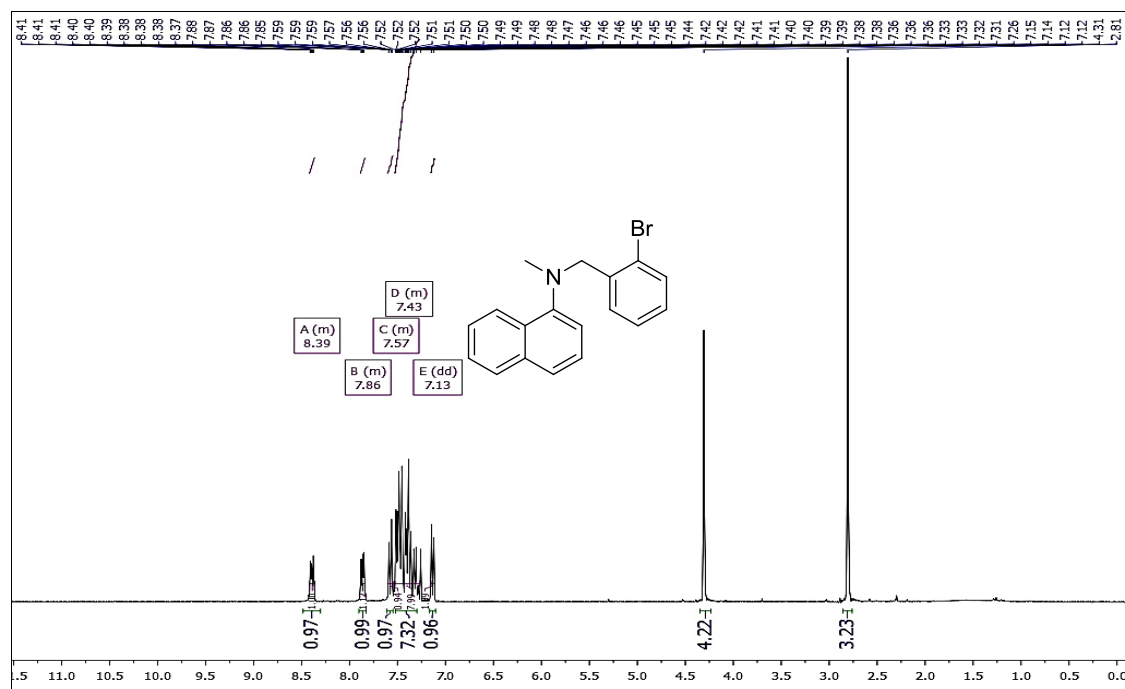


Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del compuesto 6

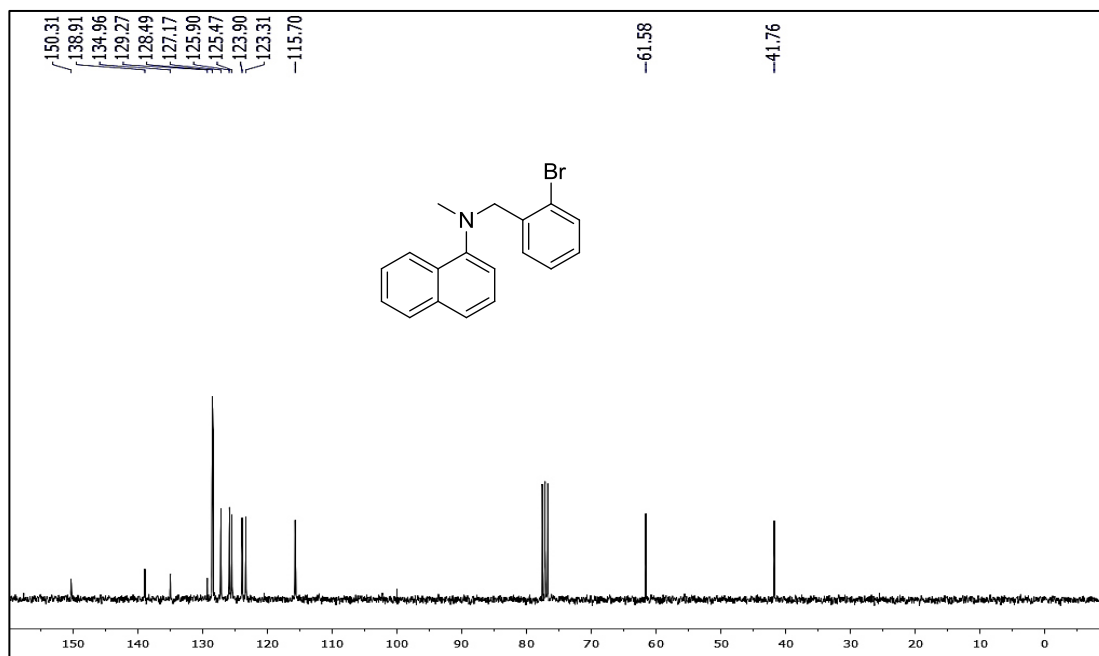


Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) del compuesto 6

ESPECTROS DE RMN ^1H y ^{13}C DEL COMPUESTO 7

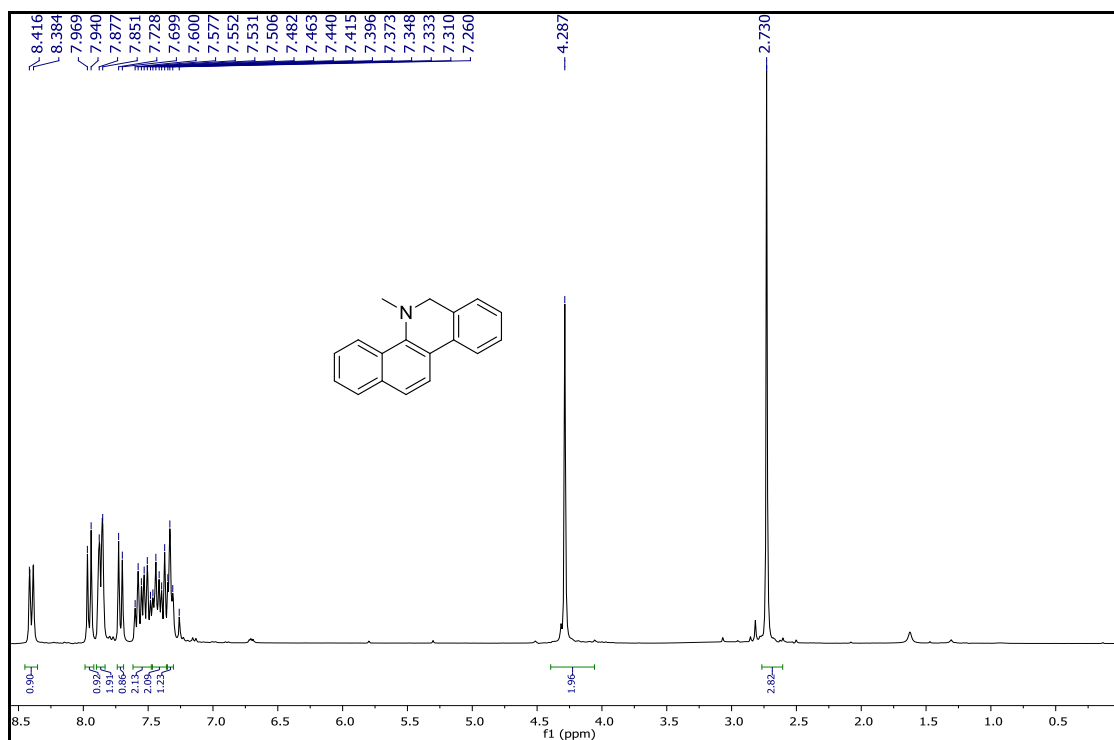


Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del compuesto 7

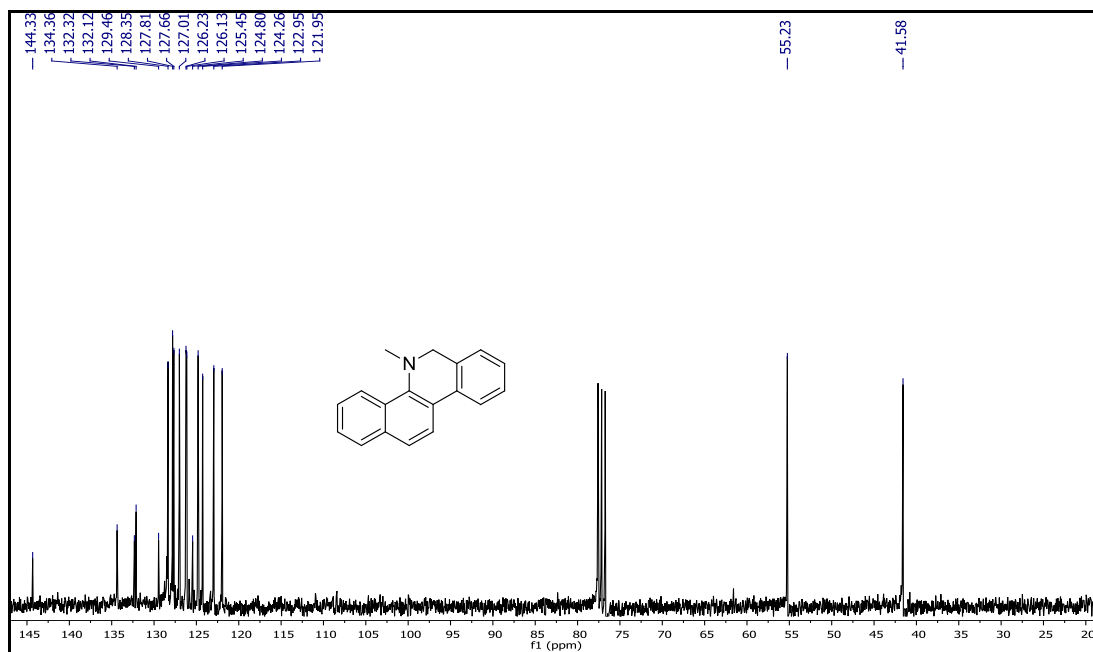


Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) del compuesto 7

ESPECTROS DE RMN ^1H y ^{13}C DEL COMPUESTO 3

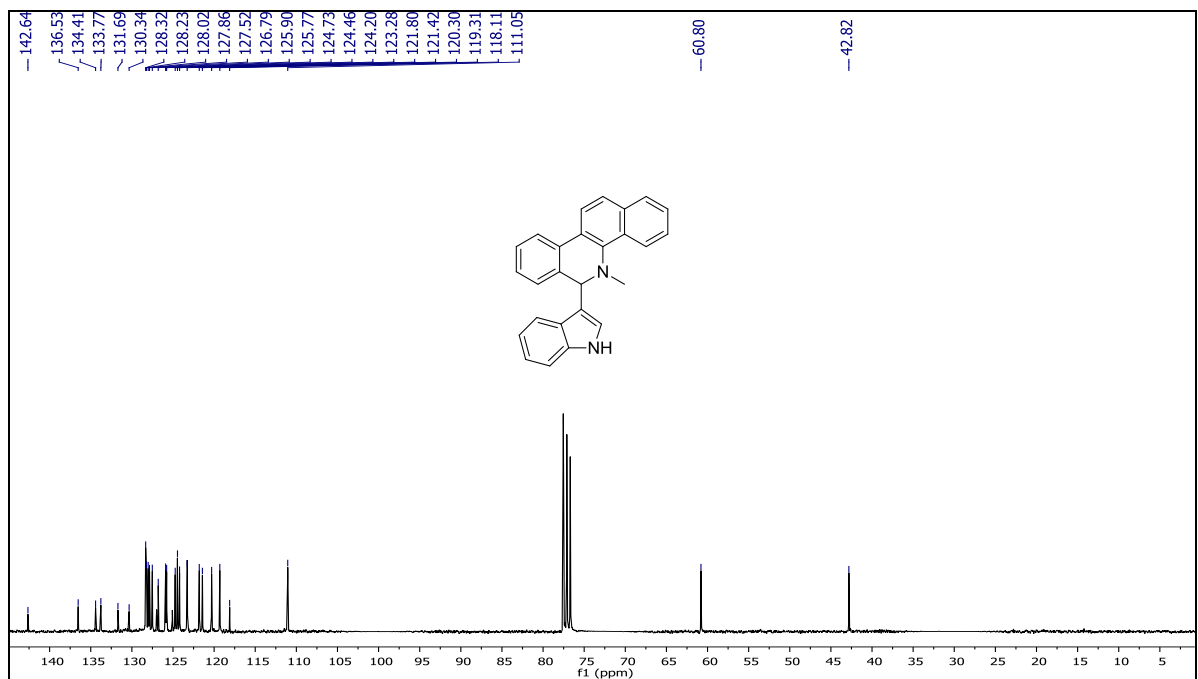


Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del compuesto 3



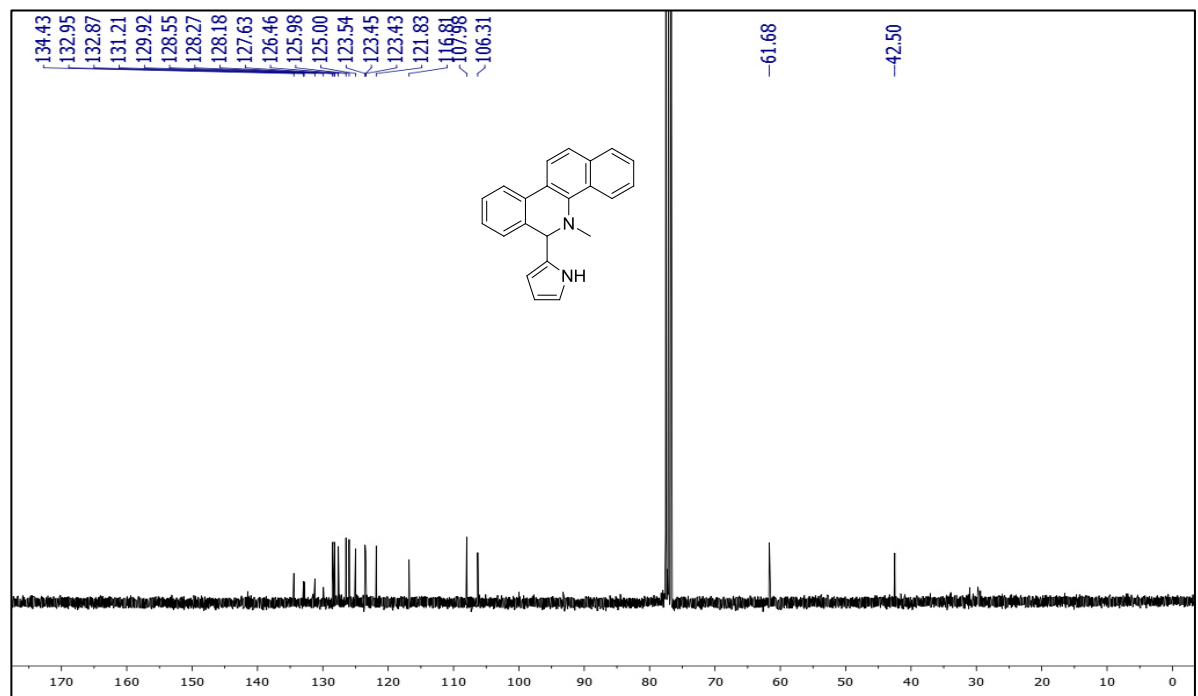
Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) del compuesto 3

ESPECTRO DE RMN ^{13}C DEL COMPUESTO **3a**



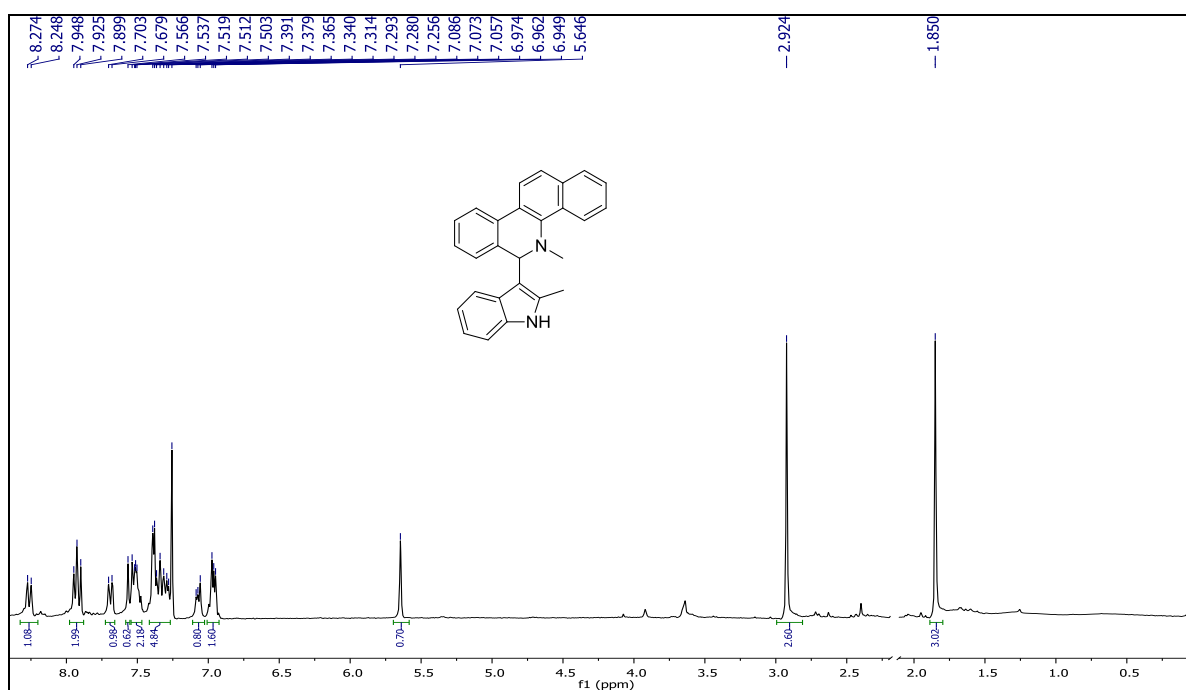
Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) del compuesto **3a**

ESPECTRO DE RMN ^{13}C DEL COMPUESTO **3c**

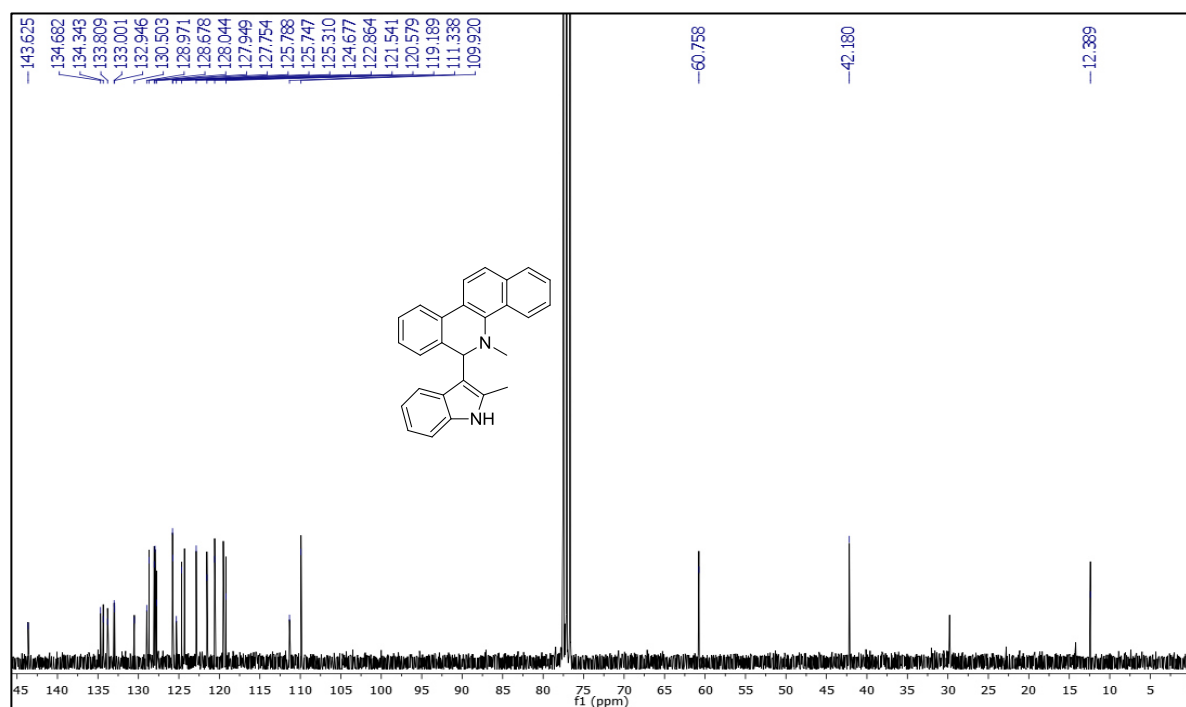


Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) del compuesto **3c**

ESPECTROS DE RMN ^1H y ^{13}C DEL COMPUESTO **3b**

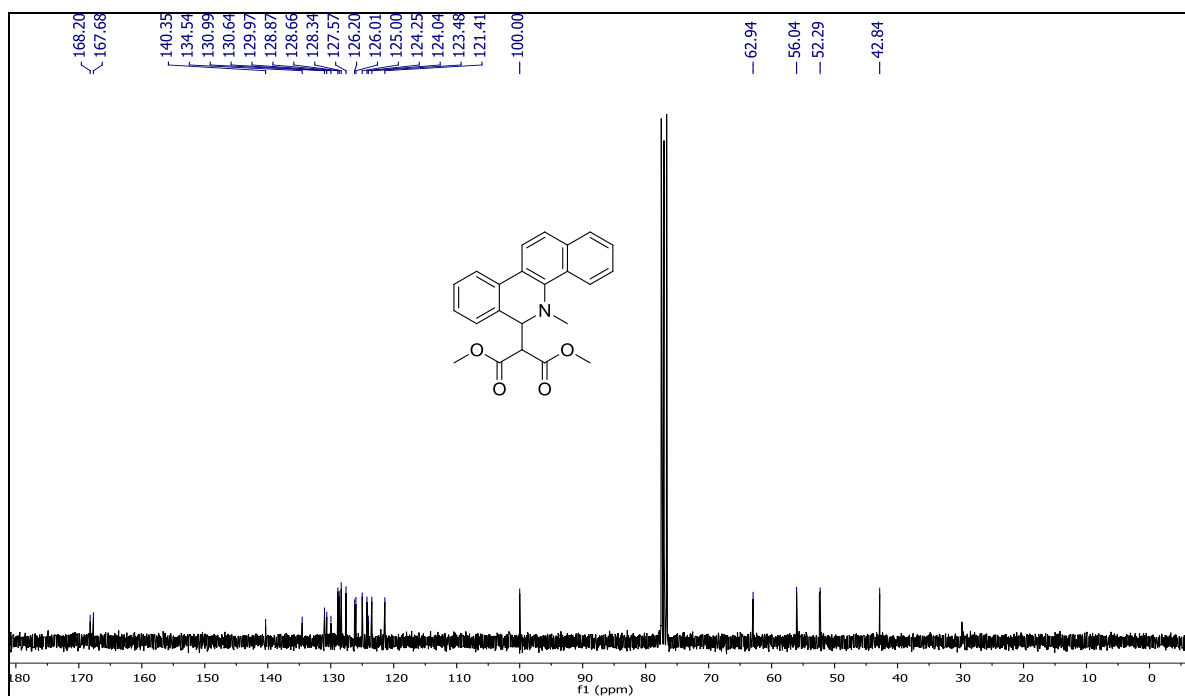


Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del compuesto **3b**



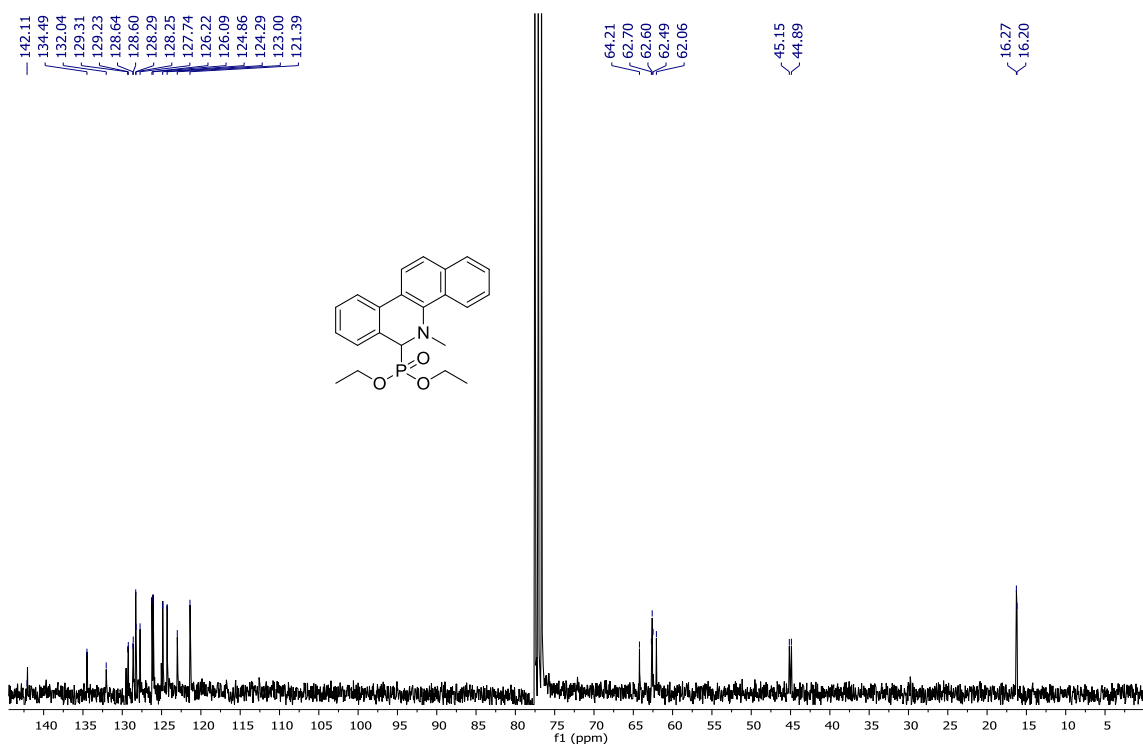
Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) del compuesto **3b**

ESPECTRO DE RMN ^{13}C DEL COMPUESTO **3d**



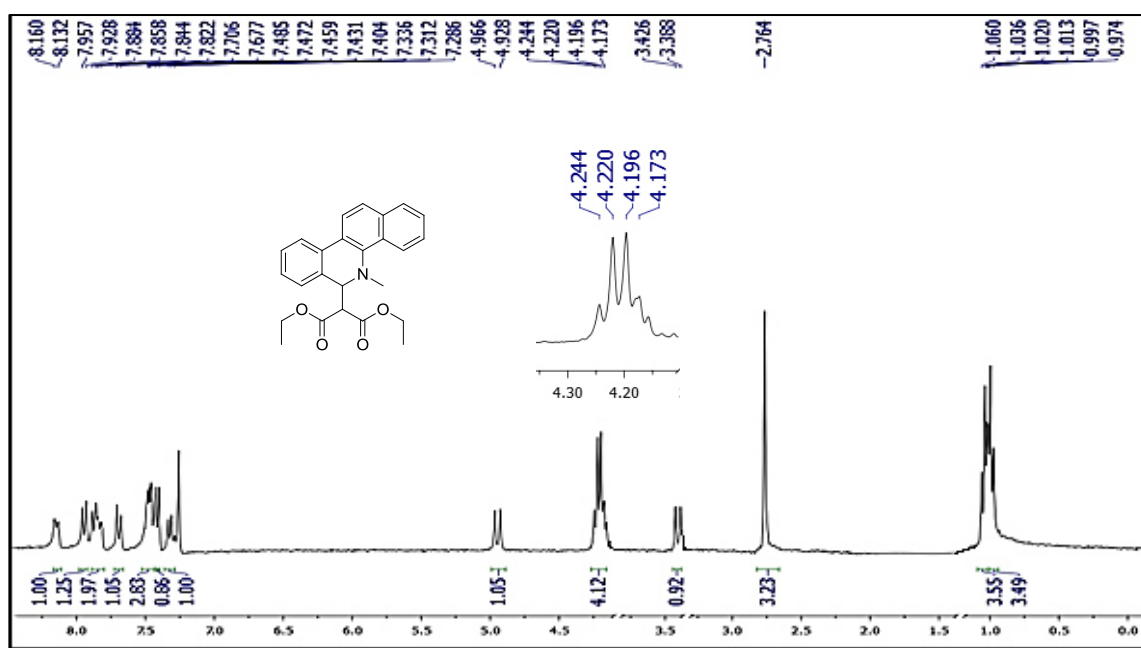
Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) del compuesto **3d**

ESPECTRO DE RMN ^{13}C DEL COMPUESTO **3i**

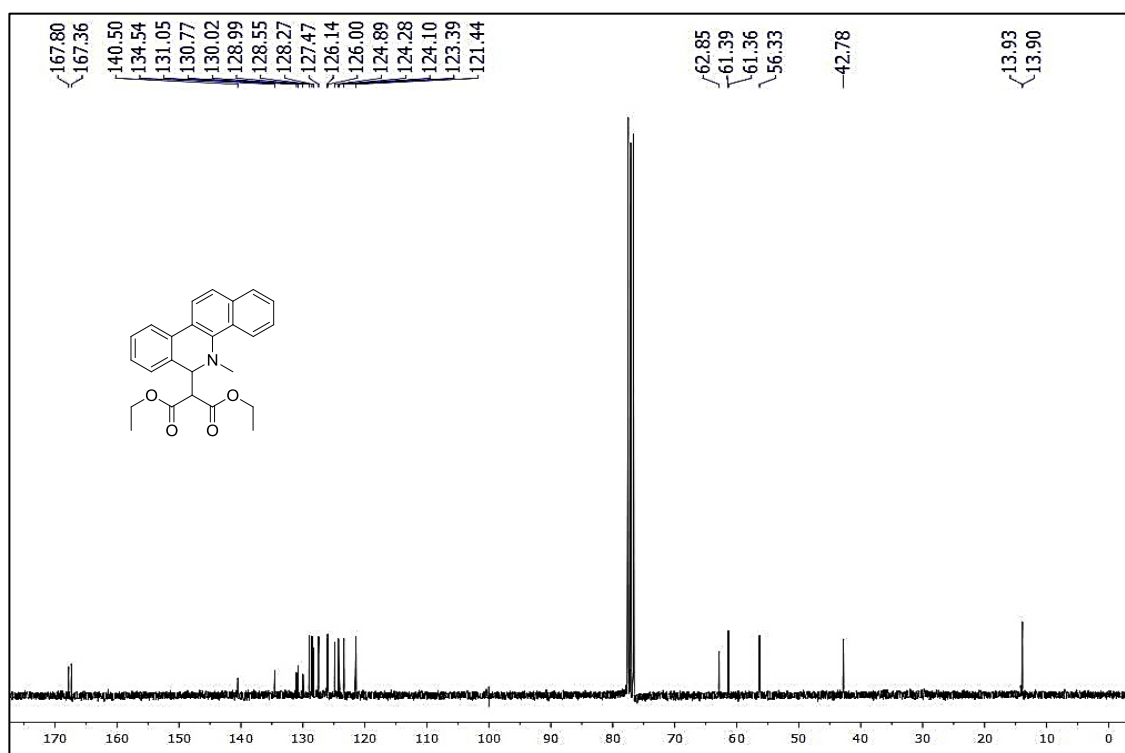


Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) del compuesto **3i**

ESPECTROS DE RMN ^1H y ^{13}C DEL COMPUESTO **3e**

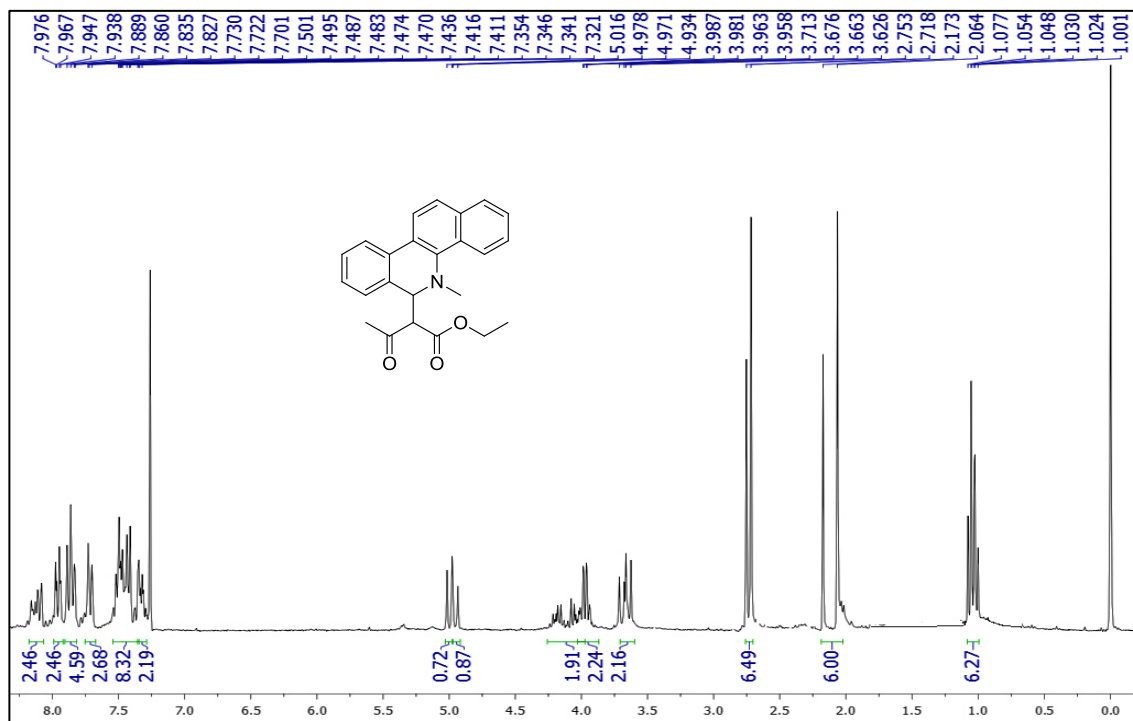


Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del compuesto **3e**

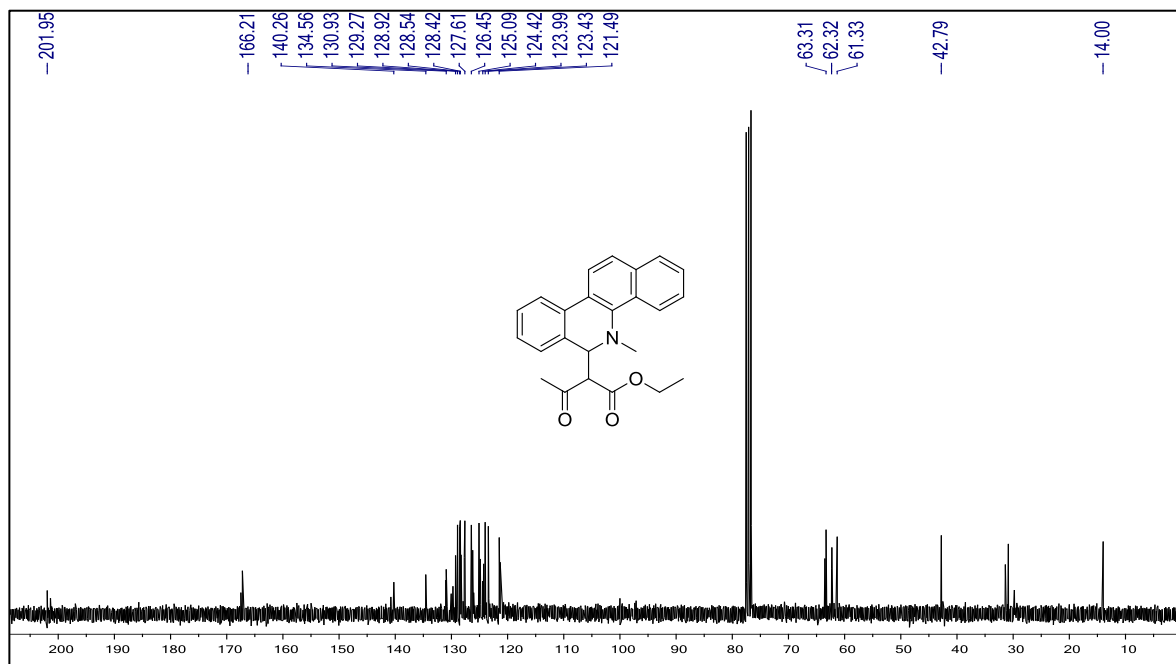


Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) del compuesto **3e**

ESPECTROS DE RMN ^1H y ^{13}C DEL COMPUESTO **3g**

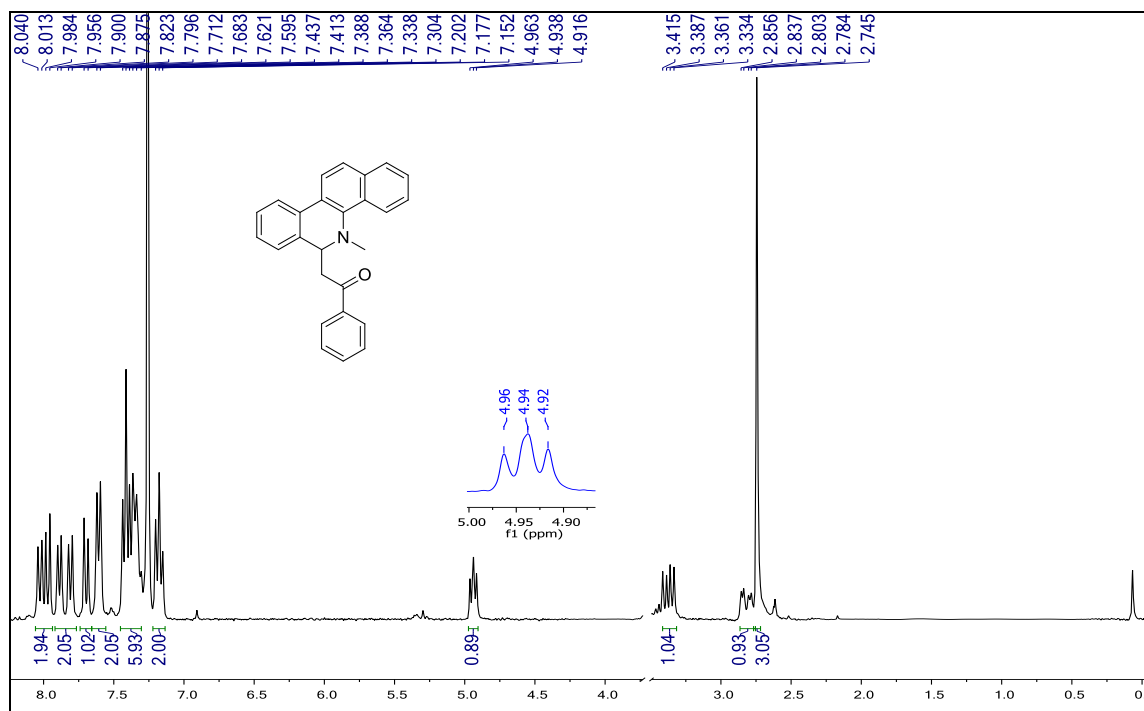


Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del compuesto **3g**

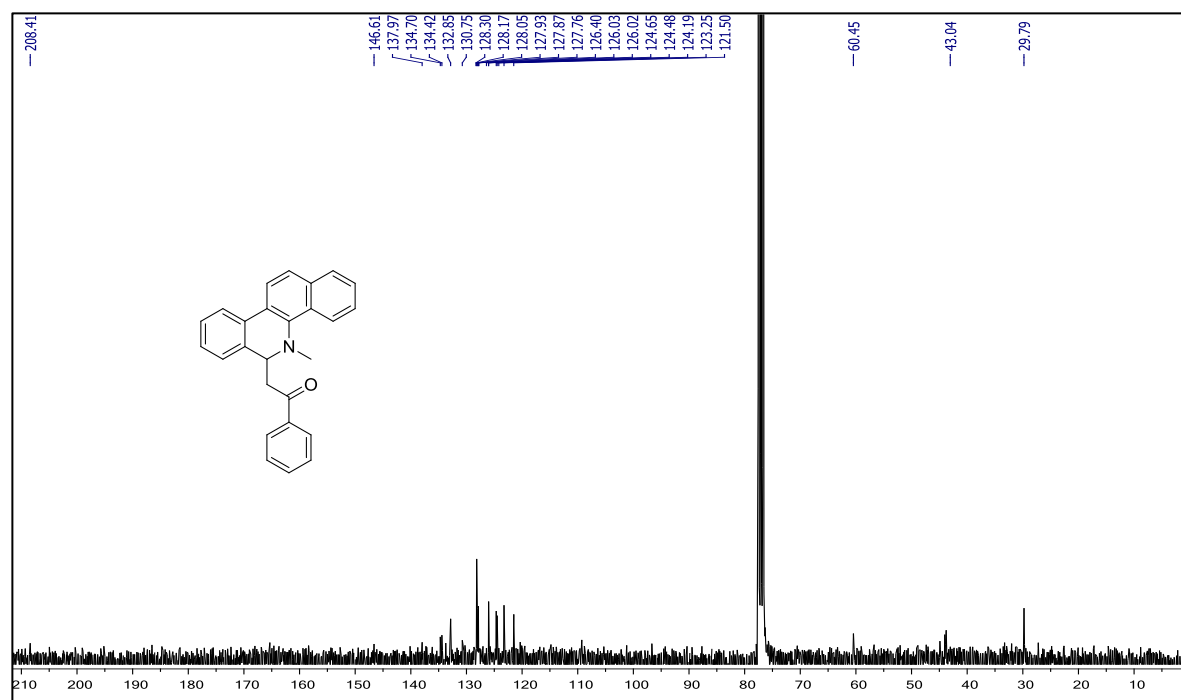


Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) del compuesto **3g**

ESPECTROS DE RMN ^1H y ^{13}C DEL COMPUESTO **3h**

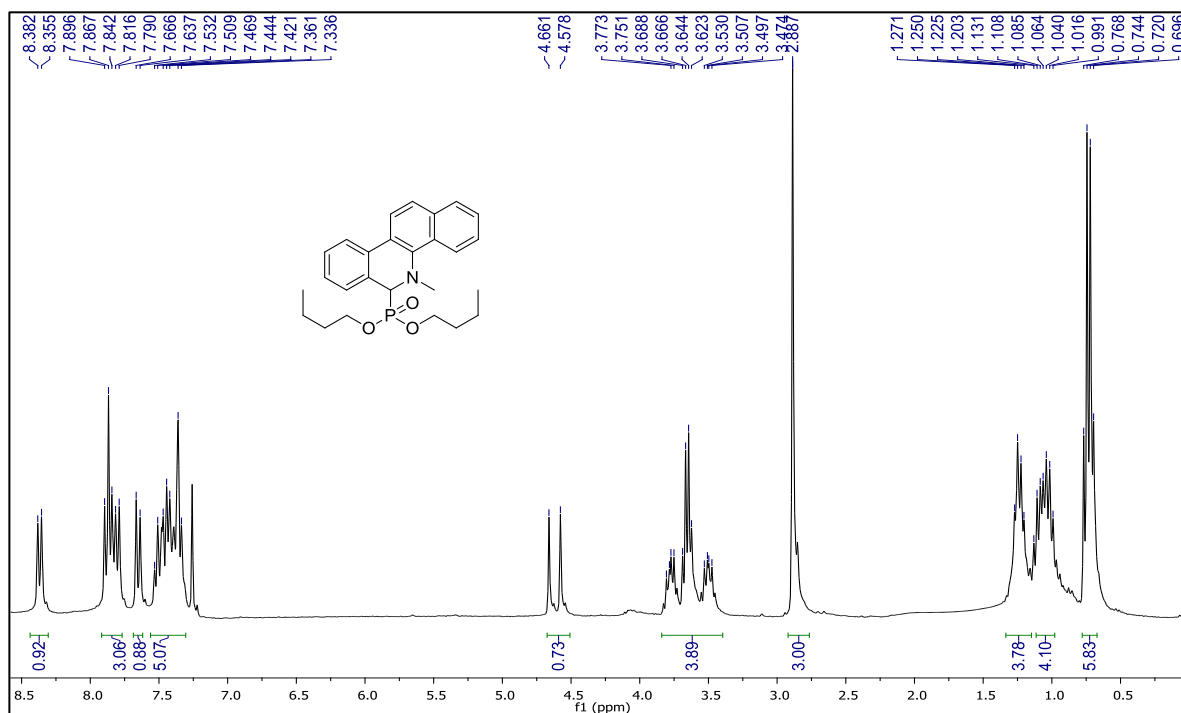


Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del compuesto **3h**

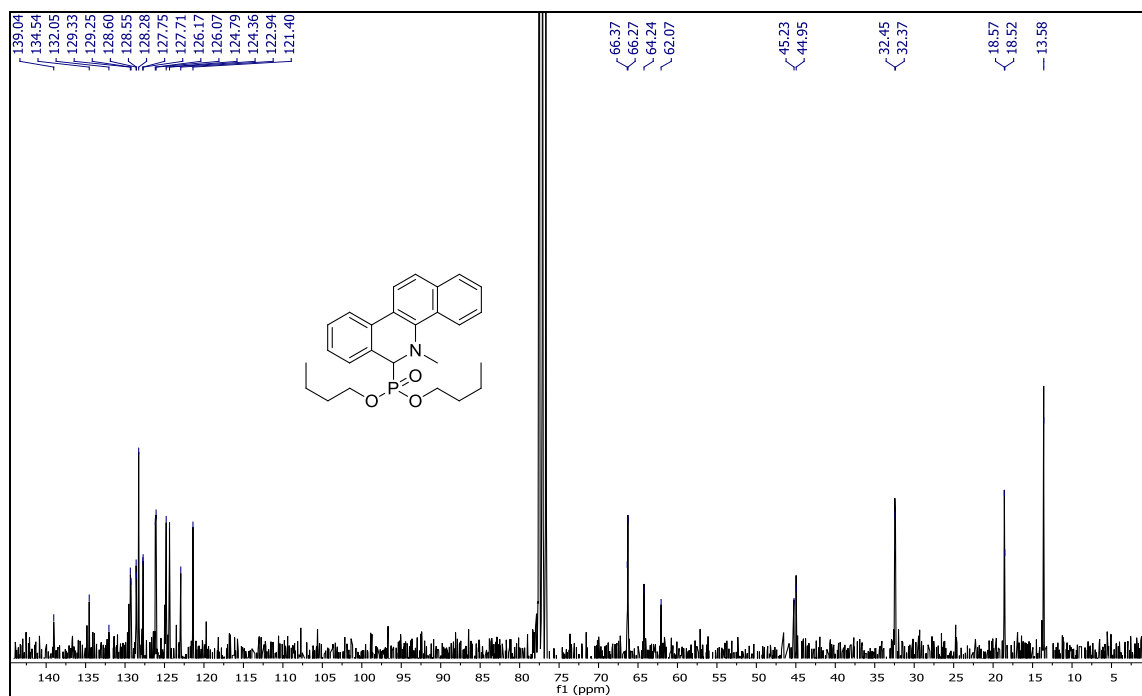


Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) del compuesto **3h**

ESPECTROS DE RMN ^1H y ^{13}C DEL COMPUESTO **3j**

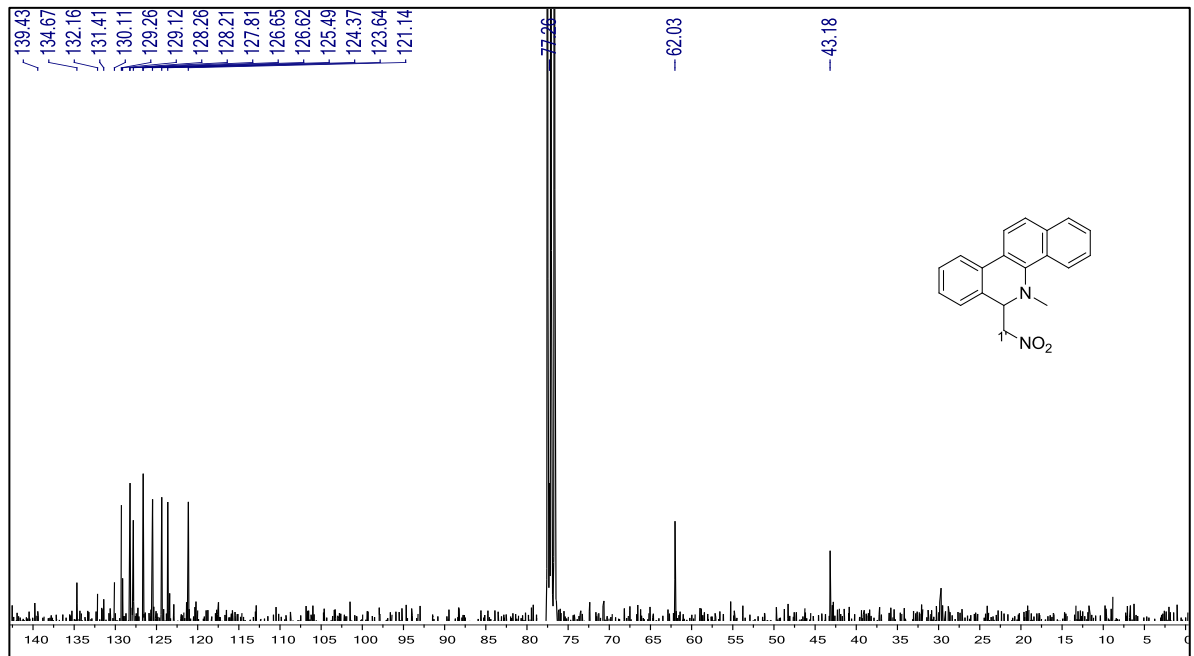


Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del compuesto **3j**



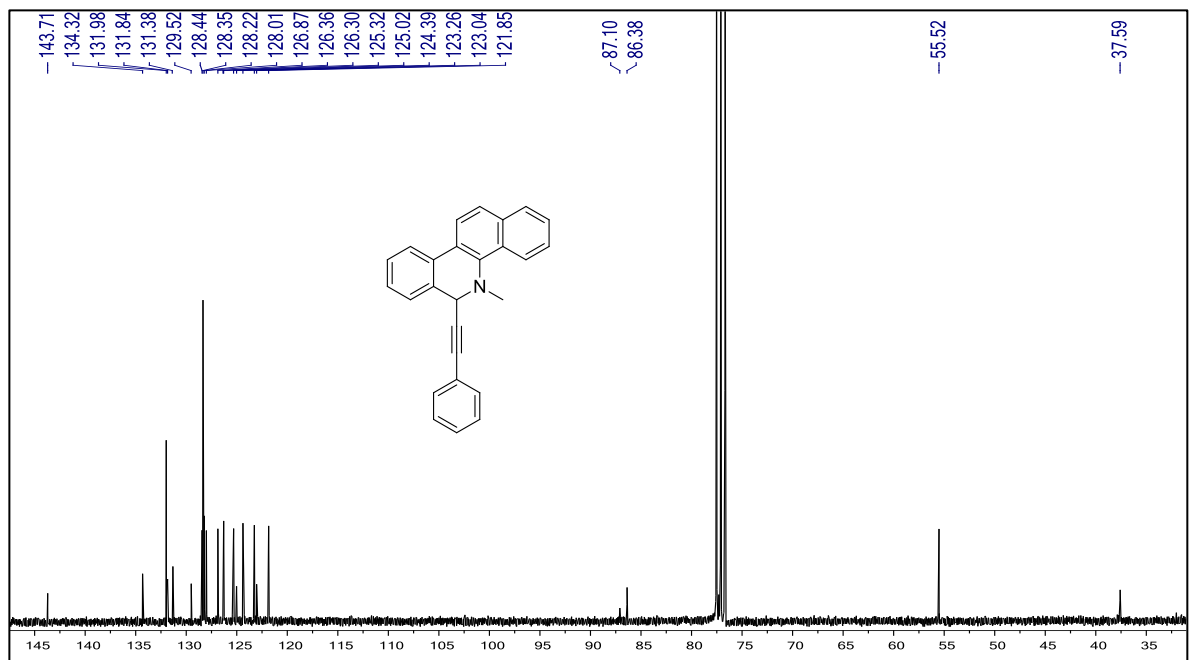
Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) del compuesto **3j**

ESPECTRO DE RMN ^{13}C DEL COMPUESTO **3k**



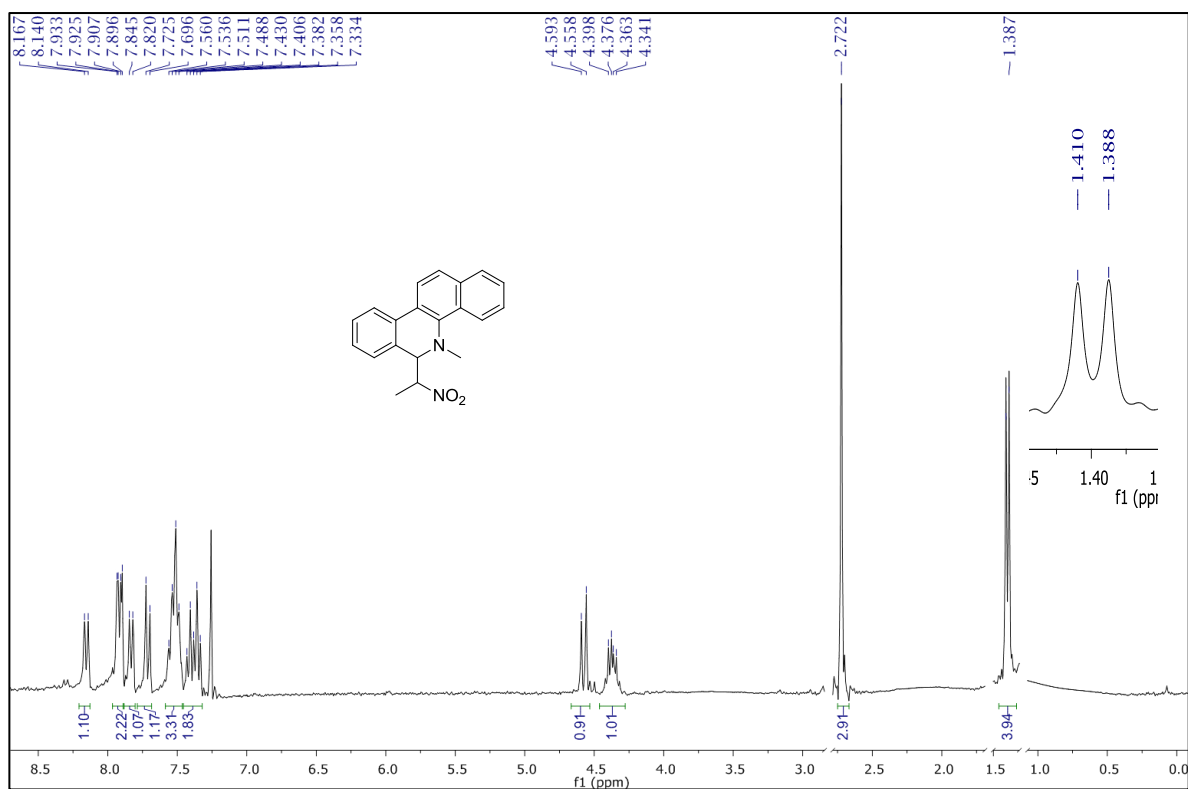
Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) del compuesto **3k**

ESPECTRO DE RMN ^{13}C DEL COMPUESTO **3p**

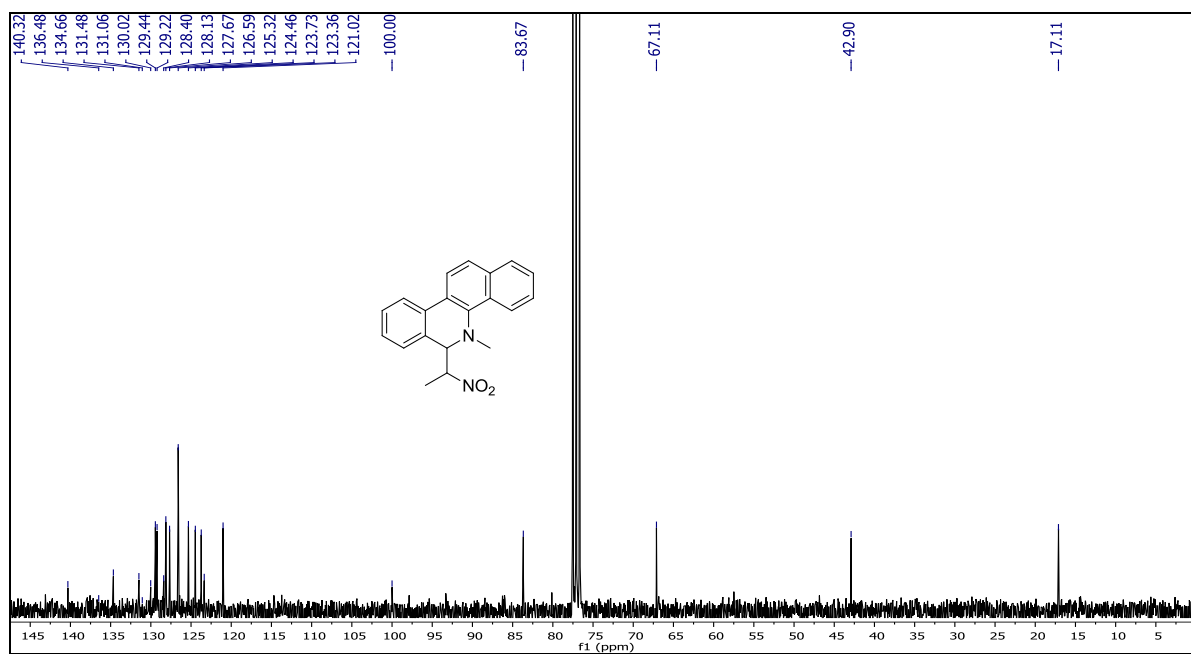


Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) del compuesto **3p**

ESPECTROS DE RMN ^1H y ^{13}C DEL COMPUESTO **3I**

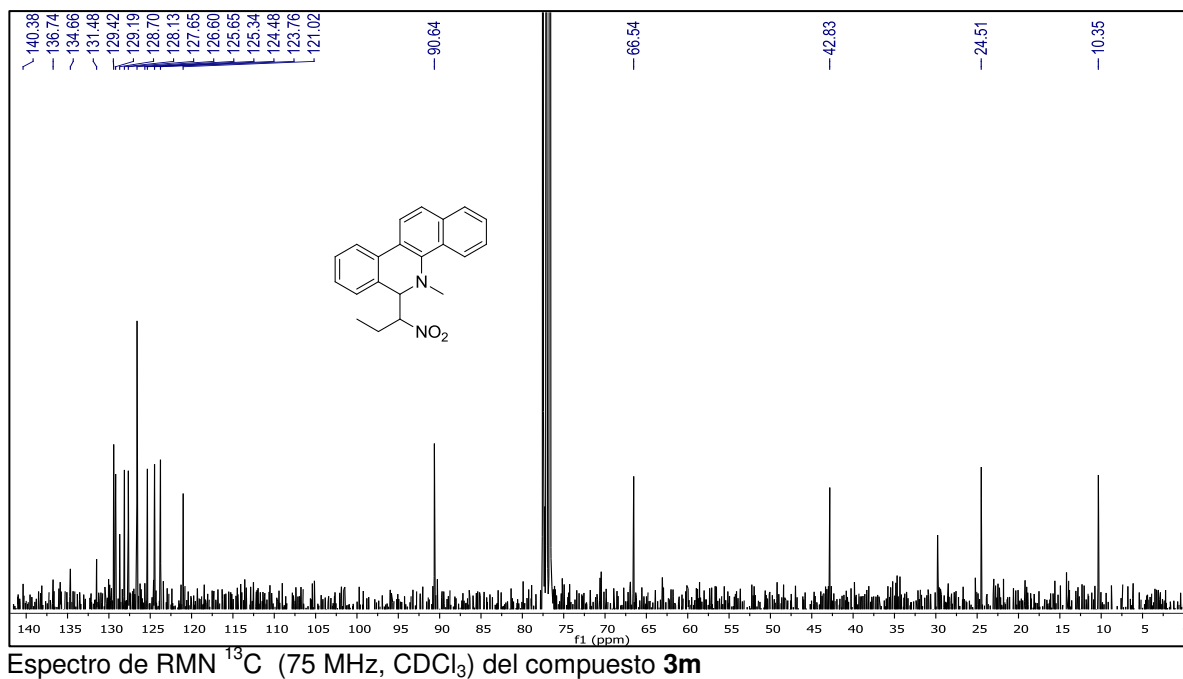
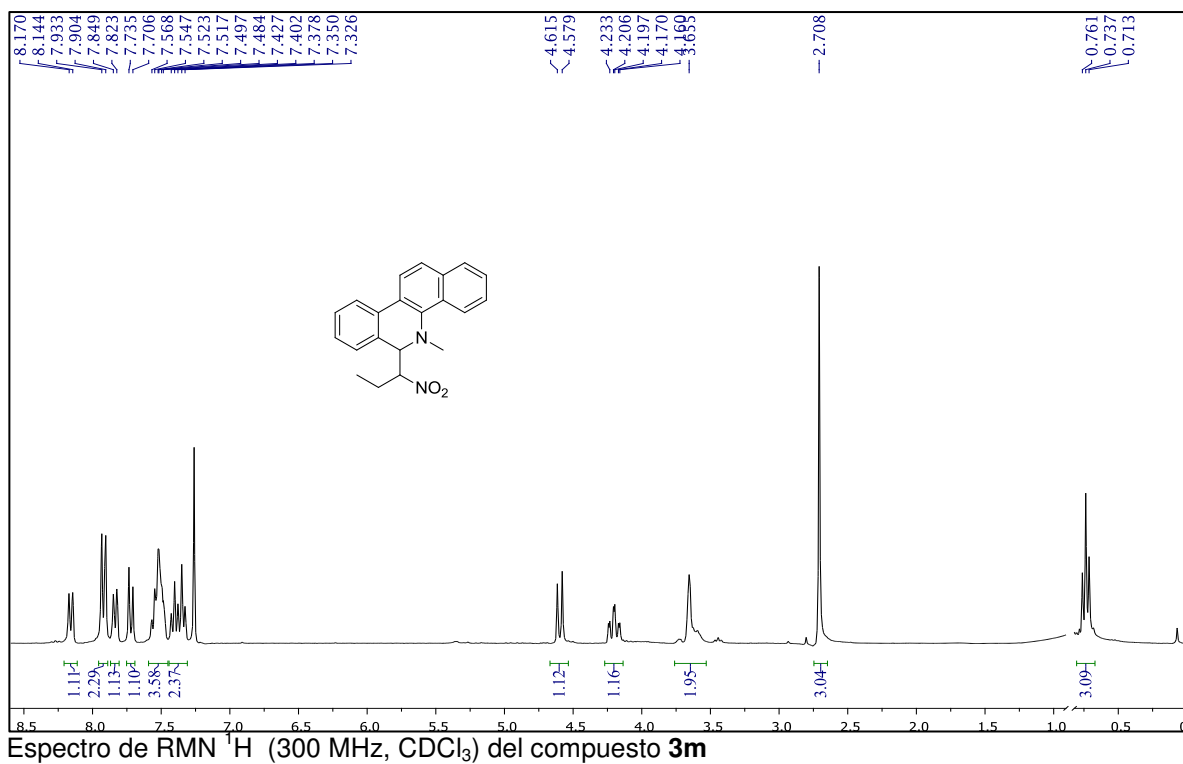


Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del compuesto **3I**

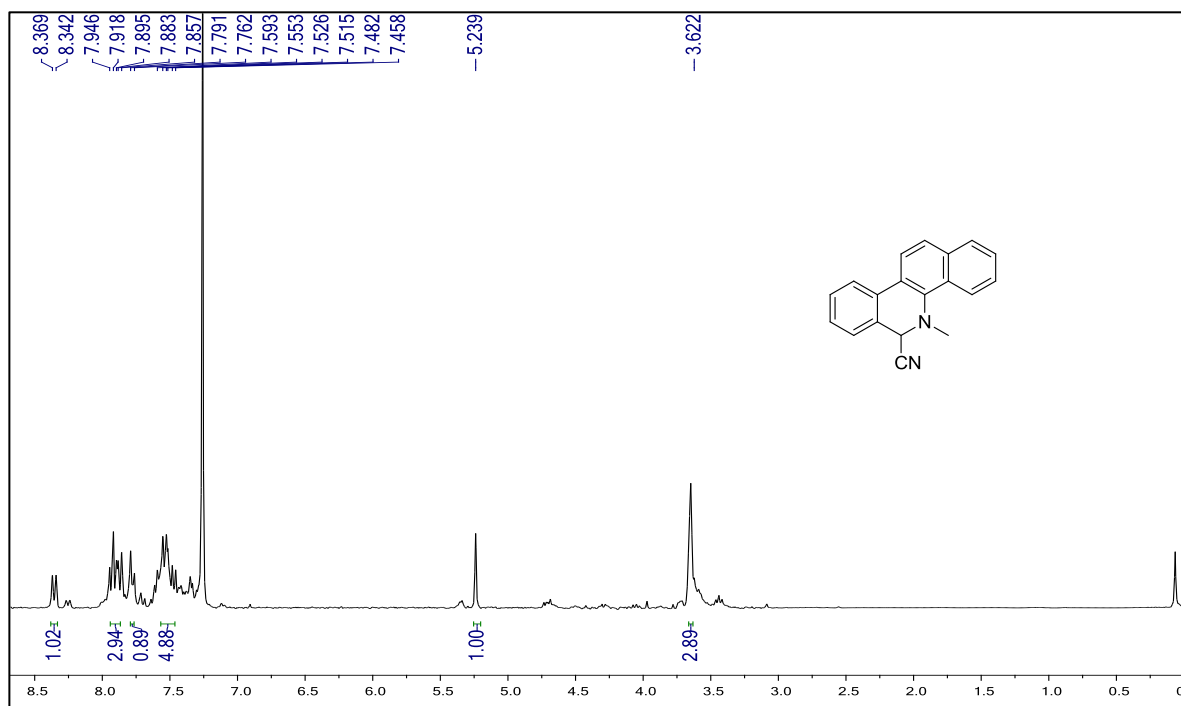


Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) del compuesto **3I**

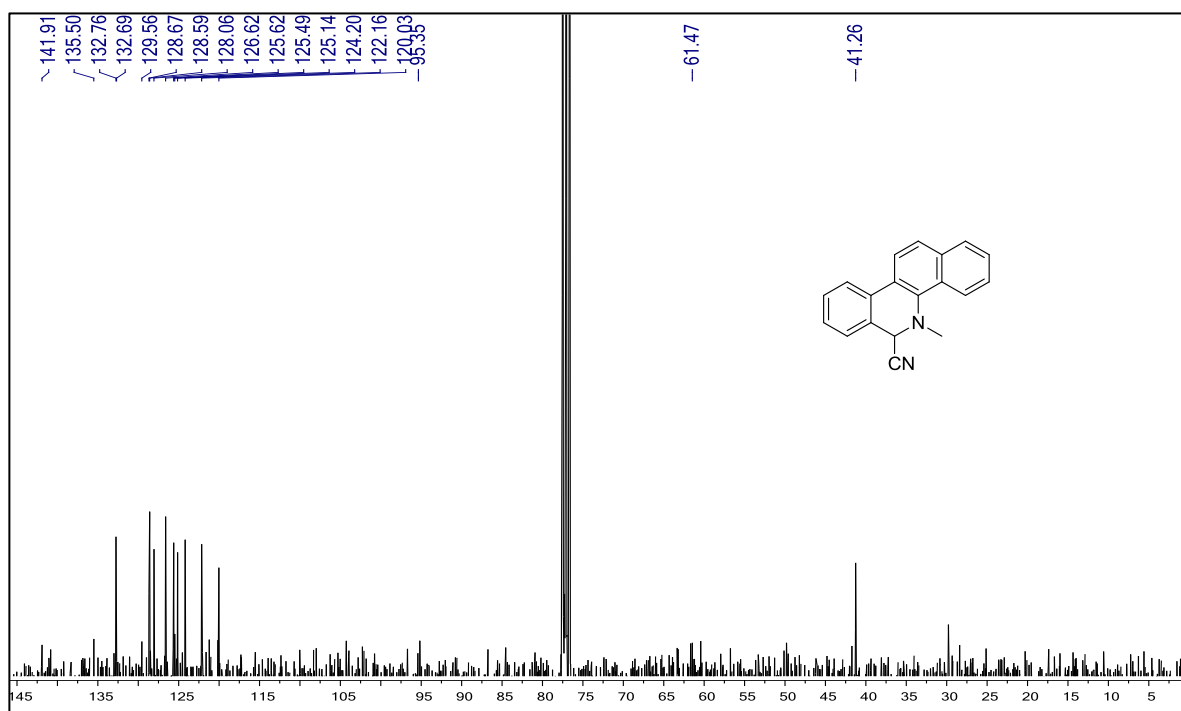
ESPECTROS DE RMN ^1H y ^{13}C DEL COMPUESTO **3m**



ESPECTROS DE RMN ^1H y ^{13}C DEL COMPUESTO **3n**

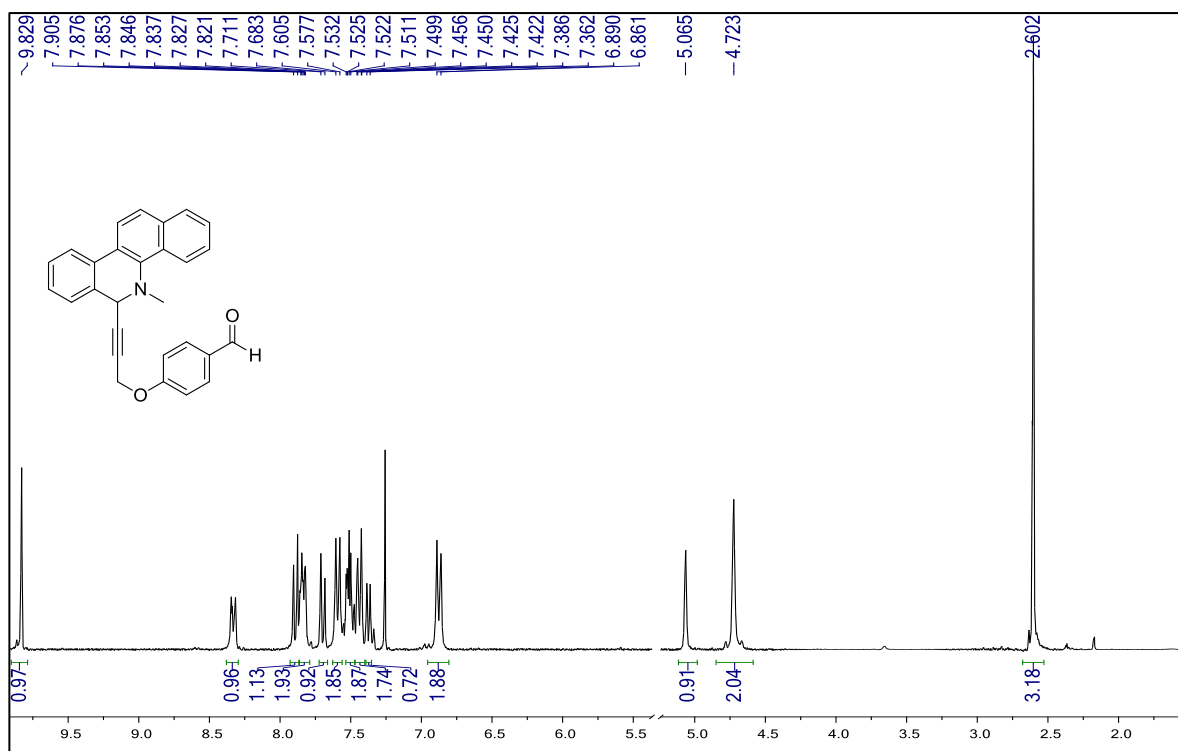


Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del compuesto **3n**

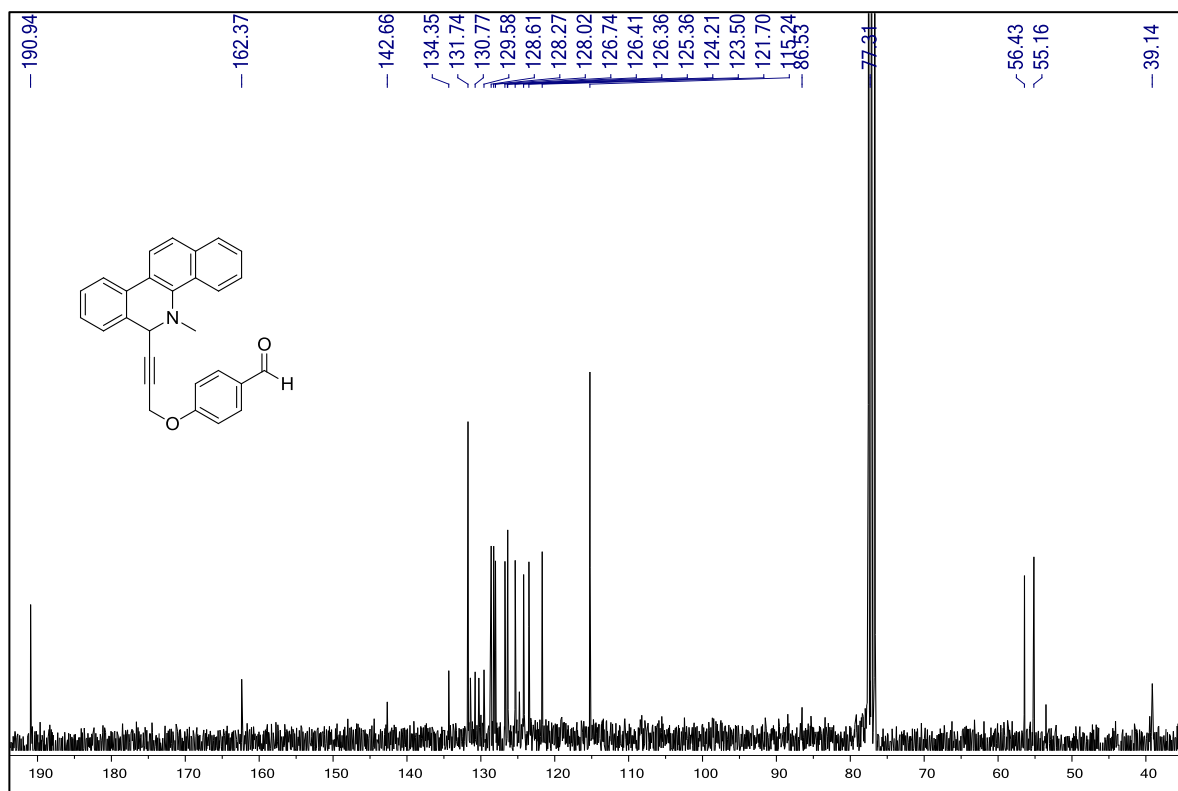


Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) del compuesto **3n**

ESPECTROS DE RMN ^1H y ^{13}C DEL COMPUESTO **3o**



Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del compuesto **3o**



Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) del compuesto **3o**