

Conexión de Biología y Química vía Síntesis Orgánica dirigida a la Diversidad molecular

Vladimir V. Kouznetsov

Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

“La unión interdisciplinaria de los mundos de la química y la biología debe comenzarse con la comprensión de los campos de desempeño de las dos disciplinas”.

Stuart Schreiber

Resumen

El enorme progreso en el entendimiento de los sistemas biológicos y del funcionamiento de los fármacos dentro del cuerpo humano se debe a la unión de la química y la biología y a la aplicación inteligente de los principios y técnicas de la química orgánica. Ésta juega el papel de iniciador en el descubrimiento biológico impulsando el diseño y desarrollo de nuevos fármacos. Utilizando tácticas sintéticas modernas de la química orgánica, la síntesis dirigida a la diversidad permite preparar diversas moléculas (fármacos, agentes biológicos) que son valiosos modelos para el estudio de las complejas interacciones biológicas de los organismos vivos. Los resultados y logros del LQOBio se discuten en esta revisión prestando atención al desarrollo de algunos aspectos de la síntesis verde y la biología química que ha venido haciendo el LQOBio estos últimos años.

Palabras claves: síntesis dirigida a la diversidad, moléculas pequeñas, heterociclos, bioensayos *in vitro* e *in vivo*.

Connection between Biology and Chemistry via Diversity Oriented Synthesis

Abstract

The enormous progress in the understanding of biological systems and the functioning of the drugs within the human body is due to the union of chemistry and biology and the intelligent application of the principles and techniques of organic chemistry. This plays the role of initiator in biological discovery driving the design and development of new drugs. Using tactics of modern synthetic organic chemistry, diversity-directed synthesis allows preparation of various molecules (drugs, biological agents) that are valuable models for the study of complex biological interactions of living organisms. The results and achievements of the LQOBio are discussed in this review with attention to the development of some aspects of green synthesis and chemical biology that has been doing the LQOBio recent years.

Key words: Diversity Oriented Synthesis, small molecules, heterocycles, *in vitro* and *in vivo* bioassays.

Introducción

La química orgánica, la biología y la física son las columnas primarias que sostienen el templo de la ciencia que estudia y trata de entender los procesos fundamentales de la vida de los seres vivos. El enorme progreso en el entendimiento de los sistemas biológicos y del funcionamiento de los fármacos dentro del cuerpo humano se debe a la aplicación inteligente de los principios y técnicas de la química orgánica.

La química orgánica juega el papel del iniciador en el descubrimiento biológico, en el diseño y desarrollo de nuevos fármacos. Desde hace muchos años la biología “se movió “desde del nivel descriptivo y fenomenológico hasta el nivel molecular y bioquímico. En consecuencia, nuevas

disciplinas como la biología estructural, la biología molecular y la genética molecular fueron creadas y desarrolladas (Waldmann y Janning, 2004).

Los seres vivos producen y liberan al medio diversos compuestos químicos (productos naturales) que afectan de manera significativa a otros organismos y participan en sus interacciones químicas. Así pues, todos los organismos producen señales químicas y responden a las señales químicas de otros organismos. Las señales químicas producidas por los

Correspondencia:

Vladimir V. Kouznetsov, vkuznechnik@gmail.com

Recibido: 10 de marzo de 2014

Aceptado: 30 de mayo de 2014

organismos están constituidas por compuestos, relativamente sencillos en su estructura, llamados moléculas “pequeñas”. Son preparadas a través de vías metabólicas secundarias que dan origen a los metabolitos primarios, macromoléculas - carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos.

De otro lado, se sabe que la unidad mínima de los seres vivos es la célula. Es una región protegida en el que diversos conjuntos de moléculas “pequeñas” y macromoléculas interactúan entre sí en una armonía lograda a través de auto-ensamblaje. Gran parte del contenido de la célula es una sopa aguada con sabor a moléculas “pequeñas”: los azúcares simples, los aminoácidos, vitaminas, y los iones sodio, cloruro, los iones de calcio (Lodish et al., 2008). Estos productos naturales y/o sus análogos próximos tienen una importancia vital en el descubrimiento de los mecanismos universales en los seres vivos, tales como la división celular, apoptosis celular, las interacciones ADN-proteínas, etc.

Los productos naturales tienen mucha afinidad hacia las macromoléculas, *e.g.*, proteínas, ADN y estructuras lipídicas. Por eso, estos productos suelen ser utilizados como agentes farmacológicos y/o modelos para desarrollar nuevos agentes más efectivos y menos tóxicos. El término de moléculas “pequeñas” apareció durante el desarrollo de metodologías de síntesis de compuestos orgánicos y se refiere a su peso molecular, menos de 500 Da (Rojas-Ruiz et al., 2011).

Las moléculas sintéticas y naturales forman parte del arsenal de la química orgánica. Ambos tipos de moléculas sirven de prototipos de fármacos y se emplean como precursores en la construcción de nuevas entidades químicas de amplia y diversa utilidad práctica. También pueden ser usados como instrumentos indispensables en el estudio de los procesos biológicos.

Al profundizar los estudios sobre los sistemas vivos y sus procesos bio-químicos, surgió la necesidad de tener medios para perturbar estos sistemas haciendo uso de las moléculas “pequeñas”. Esta táctica, llamada sensibilización química, puede generar nueva información, más profunda y detallada, sobre el funcionamiento de los sistemas vivos. Su desarrollo proporcionó una nueva área emergente: la biología química (Waldmann y Janning, 2004). Para su estudio se necesitan nuevas moléculas “pequeñas” diversas y diferentes, cuya preparación se logra por medio de las actividades de la fitoquímica y de la síntesis química. Esta última tiene varias estrategias y un sinnúmero de tácticas que se desarrollan paulatinamente.

La primera estrategia, -TOS (Target Oriented Synthesis, por sus siglas en inglés), conocida como síntesis orientada a un producto blanco (“target” deseado) que es casi siempre un producto natural (alcaloide, terpeno o fenólico, etc.) de alta complejidad estructural y con una fuente limitada

(Schreiber, 2000). La DOS (Diversity Oriented Synthesis) es otra estrategia desarrollada posteriormente que se enfoca en la síntesis dirigida a la diversidad molecular, funcional y estructural. Ésta busca diferentes tipos de diversificación molecular que permite encontrar moléculas más específicas (fármacos o agentes biológicos) para el estudio de las complejas interacciones biológicas de los seres vivos incluyendo humanos (Spadl et al., 2008). La tercera estrategia, - FOS (Function Oriented Synthesis), síntesis orientada a la función (fragmentos de las moléculas) implica también la detección de pequeñas moléculas más específicas haciendo uso de subunidades o fragmentos de compuestos similares a los medicamentos (Wender et al., 2008).

Las dos últimas metodologías tienen la misma filosofía y las mismas estrategias para cumplir el objetivo general: generar nuevas moléculas bioactivas y comprender el funcionamiento de los procesos biológicos universales a nivel molecular por medio de moléculas pequeñas. Tanto DOS como FOS utiliza tácticas sintéticas modernas de la química orgánica: táctica de economía de átomos mediante reacciones catalíticas en tándem y domino, condensaciones multicomponentes, reacciones de cicloadición (cicloadición [4+2], cicloadición [3+2] dipolar) entre sustratos comerciales y económicos, o sintéticamente accesibles. También se presta atención a la aplicación de los criterios de la química verde en estas reacciones. Todos estos aspectos sintéticos están en el centro de atención de nuestro grupo y van ser mencionados en este ensayo. Además, el trabajo realizado en la síntesis se ilustra con algunas aplicaciones bio- y/o farmacológicas de las moléculas preparadas.

Síntesis de nuevas moléculas pequeñas utilizando AEs y sus componentes como reactivos químicos renovables

La discusión de esta parte está dividida en los siguientes temas: **1.)** Procesos de cicloadición [4+2] con la participación de compuestos fenólicos con grupos alilo y/o propenilo tipo C_6-C_3 como alquenos sustituidos activados; **2.)** Procesos de cicloadición [3+2] con la participación de estirenos derivados de compuestos fenólicos tipo C_6-C_1 , y aldehídos aromáticos; **3.)** Importancia y resultados de bioensayos usando un modelo del pez Cebra.

En este contexto, el uso de diversos aceites esenciales (AEs) y sus constituyentes fenólicos mayoritarios de algunas plantas tropicales como materiales renovables se considera una innovación. En general, se sabe que plantas son las magas del metabolismo, biosintetizando miles de moléculas en forma eficiente. Teniendo en cuenta de que Colombia tiene una rica diversidad vegetal, se puede decir que las plantas tropicales comerciales, con sus aceites esenciales, son plataformas importantes para el desarrollo de estudios biológicos.

La necesidad de reducir la dependencia de la sociedad del petróleo crudo ha encaminado la atención de los investigadores al uso de la biomasa vegetal no sólo como fuente de energía, sino también como fuente de productos de química fina. De hecho, algunos componentes de la biomasa fácilmente aislables podrían ser utilizados como reactivos químicos en la síntesis de nuevos productos con un mayor valor añadido (Corma et al., 2007). Por ende, los AEs, con sus constituyentes, son fuente alternativa de materiales renovables.

Explorando el lema “*Diversidad botánica siempre genera diversidad química*”, nos enfocamos a la creación de nuevas bibliotecas de compuestos a partir de los derivados del fenilpropano – “ C_6-C_3 ” y los derivados del metilbenceno – “ C_6-C_1 ” (compuestos fenólicos) (Figura 1). Aunque este grupo presente en los AEs es menos frecuente que el grupo de terpenoides, sus miembros juegan un rol muy importante tanto a nivel práctico como científico.

“¿Es posible generar nuevas quimiotecas con la participación de los componentes principales de los AEs de plantas medicinales? ¿Cuales requisitos deben tener estos aceites?” La lógica de la química orgánica sintética y la necesidad urgente de nuevas moléculas con múltiples usos nos hicieron prestar atención a las plantas tropicales que: a) puedan cultivarse en grandes cantidades y con un fácil manejo; b) den un rendimiento de AE lo más alto posible, >10%, y c) que preferiblemente su componente principal alcance un contenido >55%. Es una situación “ideal” que problemente no siempre se presentará. Sin embargo, se sabe que los derivados fenólicos C_3 -alilo como el eugenol se han obtenido en el 76,8% de la composición total de aceite extraído de brotes florales del clavo seco (*Eugenia*

caryophyllus) en rendimientos superiores al 12,7% (Merchán et al., 2011; Kokate et al., 2005). Otros dos fenilpropenoides de interés son: el estragol, aislado del estragón (*Artemisia dracuncululus* L.) con un porcentaje del 60 - 75% (Kordali et al., 2005), y el safrol obtenido a partir de la madera del tronco de *Ocotea pretiosa* o de la corteza de la raíz o de la fruta de árbol *Sassafras albidum* (Nuttall) Nuss, con una composición de 92,9 y 80,0%, respectivamente (Olivero-Verbelet et al., 2010; Simić et al., 2004). Las frutas del anís estrellado (*Illicium verum* Hook F.) son una fuente rica en el AE (9,8%) y también en el *trans*-anetol (89-92% del AE) (Wang et al., 2010).

Con esta información iniciamos nuestro estudio bio-fito-químico. En los siguientes subrubros temáticos se ofrece información novedosa sobre la utilización del potencial sintético de diversos AEs, con sus constituyentes fenólicos como sustratos renovables en la conversión a nuevos compuestos heterocíclicos funcionalizados, y los resultados obtenidos durante los estudios farmacológicos.

1. Procesos de cicloadición [4+2], reacción de imino Diels-Alder de tres componentes.

Nuevas colecciones de tetrahidroquinolinas y quinolinas con el fragmento de anetol o eugenol se prepararon por medio de la reacción de imino Diels-Alder (IDA) multi-componente (MCIDA), una herramienta potente en la química orgánica y la química medicinal.

Debido a la importancia farmacológica de las moléculas heterocíclicas, el desarrollo de sus síntesis está constantemente en el foco de atención de los químicos. Seleccionando un modelo simple forjado en la naturaleza,

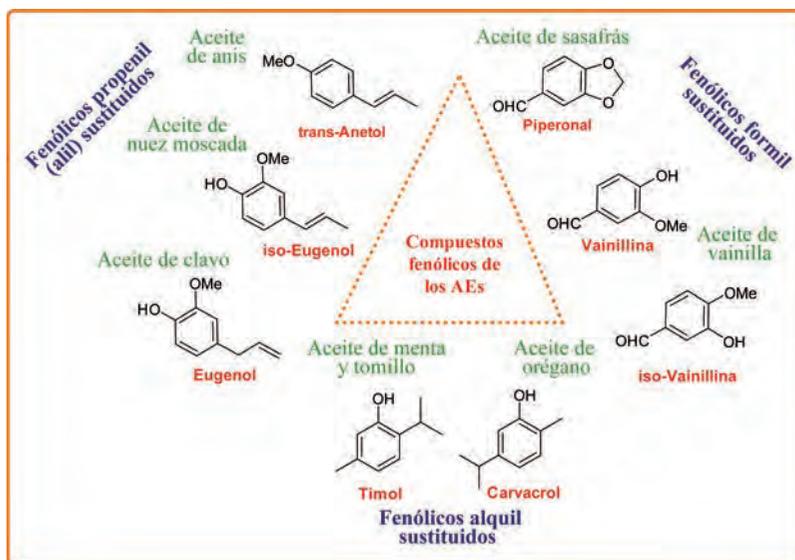


Figura 1. Diversidad química de los componentes principales presentes en los AEs de plantas medicinales.

el alcaloide quinolínico dubamina, aislado de varias especies del género *Haplophyllum* (*H. dubium* y *H. latifolium*) de la familia Rutaceae, nuestro grupo desarrolló un método efectivo de su síntesis, sus análogos cercanos y nuevos derivados con estructuras similares: tetrahydroquinolinas 2-hetaril sustituidas, quinolinas polifuncionalizadas, (tetrahydro)indeno[2,1-*c*]quinolinashetaril-sustituidas, isoindolo[2,1-*a*]quinolinas, etc. (Fig. 2) (Kouznetsov et al., 2012).

Usando la metodología DOS basada en productos naturales y aplicando MCIDA como herramienta sintética, fue posible emplear algunos de los fenilpropanoides mencionados como alquenos para preparar nuevas tetrahydroquinolinas con fragmentos de anetol y/o isoeugenol, bajo principios de la química verde. Un ejemplo ilustrativo de esta metodología se da en la Figura 3, donde se cumplen al menos cuatro de los doce principios de la química verde: 1. Economía atómica (reacción de cicloadición de tres componentes); 2. Disolventes y auxiliares más seguros (reducción de disolventes, uso de solventes verdes – PEG-400, uso de catalizadores heterogeneos verdes – AMCell-SO₃H); 3. El uso de materias primas renovables (eugenol y anetol); 4. Preparación de moléculas en fase sólida, sin solventes (Kouznetsov et al., 2008; Kouznetsov et al., 2013). Gracias al diseño racional y efectivo (Fig. 2 y 3) se logró la identificación y el desarrollo de nuevos agentes antiparasitarios. Entre varias moléculas líderes se destacan la 6-etil-2-fenilquinolina (6-Et-Qu) que fue capaz de inhibir el crecimiento de promastigotes

de *Leishmania braziliensis* y reducir el número de amastigotes intracelulares, bloqueando la biosíntesis del esterol del protozoo vía la acumulación del esqualeno y la disminución del nivel de 5-hidroepisterol (Bompart et al., 2013); las 3-metil-tetrahydroquinolinas (1-B-THQ, 6-CN-THQ) que mostraron efecto inhibitor del crecimiento de *Trypanosoma cruzi* en epimastigotes y amastigotes, y citotoxicidad inespecifica sobre fibroblastos NCTC-929, alcanzando altos índices de selectividad en la forma extracelular y una gran selectividad en la etapa intracelular (Fonseca-Berzal et al., 2013) (Fig. 4). Estos prometedores resultados revelan cómo las tetrahydroquinolinas se constituyen en posibles prototipos de fármacos, contra enfermedades tropicales “huérfanas”, - leishmaniasis y tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas.

Tetrahydroquinolinas 8-NH₂-THQ y 8-NO₂-THQ (Fig. 4) presentaron potente actividad citotóxica, siendo más eficaces en las líneas celulares de carcinoma de mama MCF7 y SKBR3. Ambas fueron evaluadas en combinación con dos medicamentos reconocidos, paclitaxel y gemcitabina. Los resultados mostraron que cuando se mezclaron estos derivados con los fármacos se observó un gran sinergismo y una intensificación de la actividad citotóxica sobre ambas líneas celulares a una concentración por debajo de 1 µg/mL. Durante estos estudios, el compuesto 8-NO₂-THQ se identificó como nuevo, perspectiva y seguro agente para terapia adyuvante (Muñoz et al., 2011).

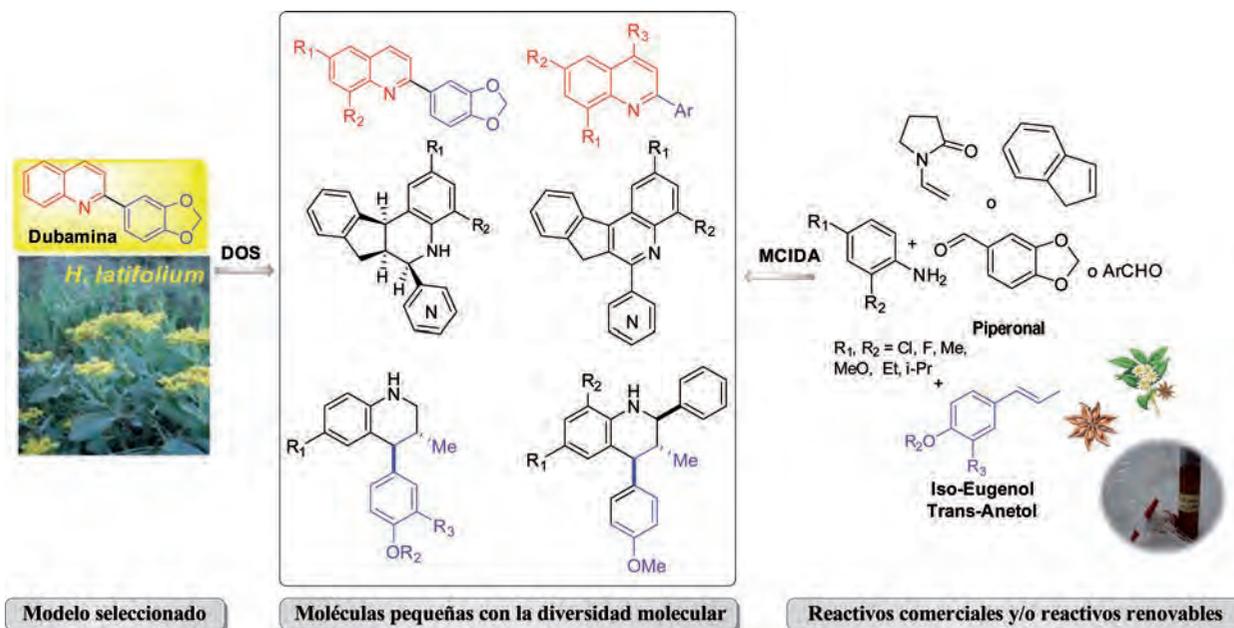


Figura 2. Estrategias y tácticas sintéticas para generar nuevas moléculas pequeñas con diversidad estructural.



Figura3. Desarrollo de nuevas tetrahydroquinolinas con fragmentos de anetol y/o isoeugenol bajo criterios de la química verde.

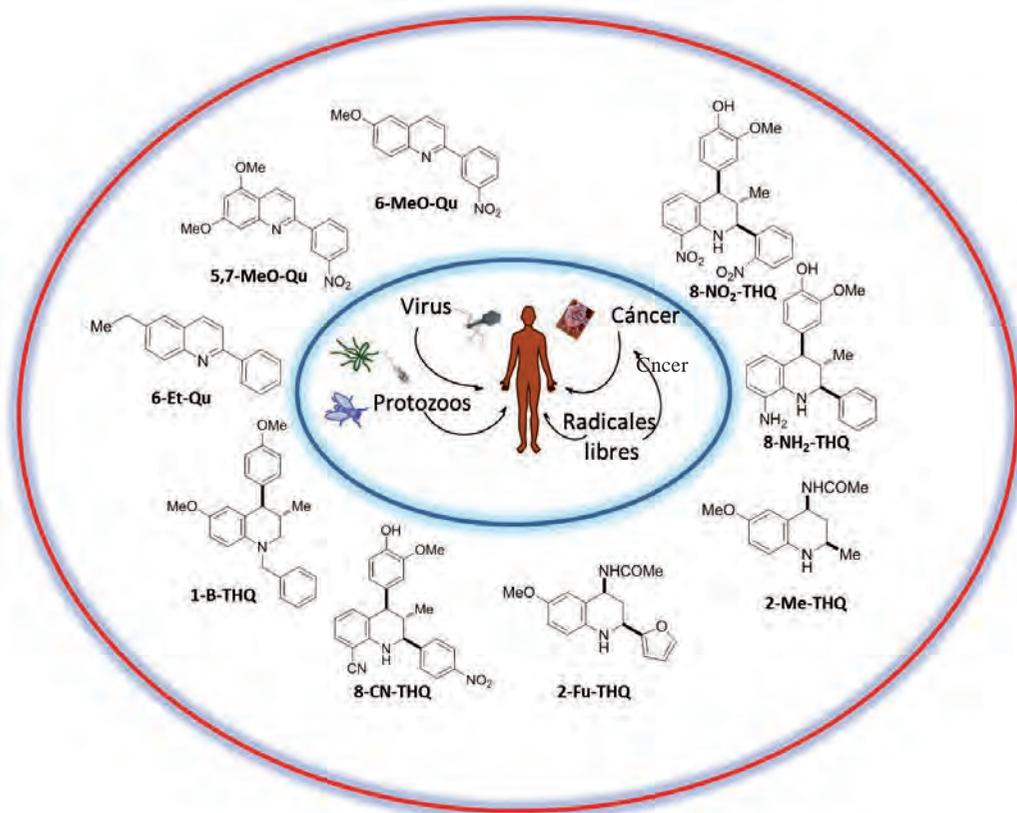


Figura 4. Desarrollo de nuevos agentes antiparasitarios y anticancerígenos.

La actividad antioxidante se relaciona con numerosas enfermedades (trastornos cerebrales, aterosclerosis y cáncer), en cuyas patologías, los radicales libres pueden estar implicados. Utilizando el ensayo de la capacidad

antioxidante equivalente Trolox® (TEAC), nuevas moléculas tetrahydroquinolinas 2-Fu-THQ y 2-Me-THQ (Fig. 4) han descubierto en nuestro laboratorio. Éstas son potentes inhibidores de radicales libres, con

valores de TEAC igual o mayor que la de antioxidantes conocidos, tal como α -tocoferol (Kouznetsov et al., 2011; Merchán et al., 2013).

Las 2-(3-nitrofenil)quinolinas 6-MeO-Qu y 5,7-MeO-Qu (Fig. 4) mostraron propiedades antivirales frente al virus del síndrome de la inmunodeficiencia humana (VIH), realizando el test del MTT y en el ensayo de virus recombinantes. La inhibición de la transcripción del VIH de estas moléculas ocurre vía mecanismo de la activación del forbolmiristato acetato en linfocitos primarios; el factor nuclear B y la especificidad de la proteína-1 parecen ser los factores de transcripción más importantes involucrados en su acción (Bedoya et al., 2010).

Con estos excelentes resultados recién logrados, otros modelos de metabolitos secundarios del reino vegetal, y otras herramientas sintéticas se introdujeron en nuestra investigación actual.

2. Procesos de cicloadición [3+2], reacción 1,3- dipolar de dos y/o tres componentes.

El significado sintético y farmacológico de los compuestos fenólicos (fenilpropenoides) y los alcaloides indólicos sigue siendo importante y actual en el desarrollo de nuevos fármacos. El sistema de anillos de dihidroindeno y dihidrofurano, que es una subunidad estructural de fenilpropenoides, y el sistema de C-3-espiro-2-oxiindol están presentes en un gran número de compuestos de origen natural. Estos sistemas biológicamente importantes pueden ser ensamblados utilizando la reacción de cicloadición [3+2] dipolar como se demuestra en la siguiente investigación.

Como se sabe, el eugenol y el anetol son los componentes mayoritarios de los respectivos AEs de plantas *Eugenia caryophyllus* y *Illicium verum*, aceites económicamente importantes para el desarrollo de las industrias perfumística y farmacéutica. Sin embargo, sus dímeros con la estructura de dihidroindeno, igual de importantes biológicamente, se encuentran esparcidos en pocas cantidades en el mundo vegetal. Por eso, resulta más fácil prepararlos por síntesis en el laboratorio que aislarlos de las plantas. El AE obtenido de la corteza del árbol de *Croton malambo* (fam. Euphorbiaceae) posee actividad citotóxica, proapoptótica y actividad antiinflamatoria (Jaramillo et al., 2007; Jaramillo et al., 2010). Su principal componente es el metileugenol, un agente repelente que regula las interacciones planta –herbívoro (Tan y Nishida, 2012).

Haciendo énfasis en los beneficios estructurales de estos fenilpropanoides, se desarrolló un proceso eficiente de construcción de modelos lignánicos tipo dihidroindeno, dando prioridad al uso de los principios de la química

verde. De este modo, se preparó un catalizador recuperable, con características ácidas y soportado en sílica, el $\text{SiO}_2\text{-O-SO}_3\text{H}$ que permitió la obtención de dímeros del *trans*-anetol y del *trans*-isoeugenol (Kouznetsov y Merchán Arenas, 2009). La síntesis formal del dímero de metileugenol se realiza en mismas condiciones de reacción utilizando el AE de *Croton malambo* con su componente mayoritario, metileugenol (Fig. 5). Cabe notar que con una simple manipulación de la reacción de acilación el AE de clavo y de su componente mayoritario, el eugenol se convirtió en el metileugenol.

En busca de nuevas moléculas inhibidoras de radicales libres análogas a los fenilpropanoides fenólicos, se modificó la estructura del eugenol y su isómero, el isoeugenol. Por simples modificaciones químicas (hidrogenación, hidroximetilación básica, hidroximetilación ácida y dimerización) se preparó la siguiente serie del dihidroisoeugenol, hidroximetileugenol, 4-(1,3-dioxanil)fenol y γ -diisoeugenol. Todas estas moléculas presentaron una alta actividad como inhibidores de los radicales libres. En particular, el γ -diisoeugenol y 1,3-dioxanilfenol fueron las moléculas más activas, superando la vitamina E (Merchán et al., 2011) (Fig. 6).

Los mismos AEs y sus constituyentes fenólicos se pueden utilizar en la construcción de dihidrofuranos polifuncionalizados (Fig. 7). Estas moléculas dihidrofuránicas contienen en su estructura una unidad $\text{C}_6\text{-C}_3$, característica de neolignan dihidrofuránicos, tal es la licarina A y (-)- α -acuminatina. Estas últimas mostraron actividad anticancerígena contra la línea celular HL-60 y una potente actividad antioxidante (Charlton, 1998).

Usando PEG 400 y catalizador ácido ($\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$) en la reacción formal de cicloadición [3+2], se prepararon *trans*-dihidrobenzo[*b*]furan-5-oles. El isoeugenol y/o anetol y la benzoquinona fueron utilizados en esta síntesis (Fig. 7) (Kouznetsov et al., 2008).

El PEG 400 es considerado como uno de los medios de reacción inocuos y se emplea generalmente como vehículo para la administración de fármacos en el organismo. Por esta razón, la utilización de este disolvente en la reacción de cicloadición se considera verde y adecuado para la construcción de los *trans*-2,3-dihidrobenzo[*b*]furan-5-oles.

De otro lado, los alcaloides indólicos representan una parte importante del estudio de los productos naturales, incluyendo los alcaloides del sistema de C-3-espiro-2-oxiindol construido a partir del núcleo de la isatina, producto comercial y económicamente asequible (Fig. 8). Los derivados espiro-pirrolidínicos son la familia más conocida y abundante de este tipo de alcaloides, donde

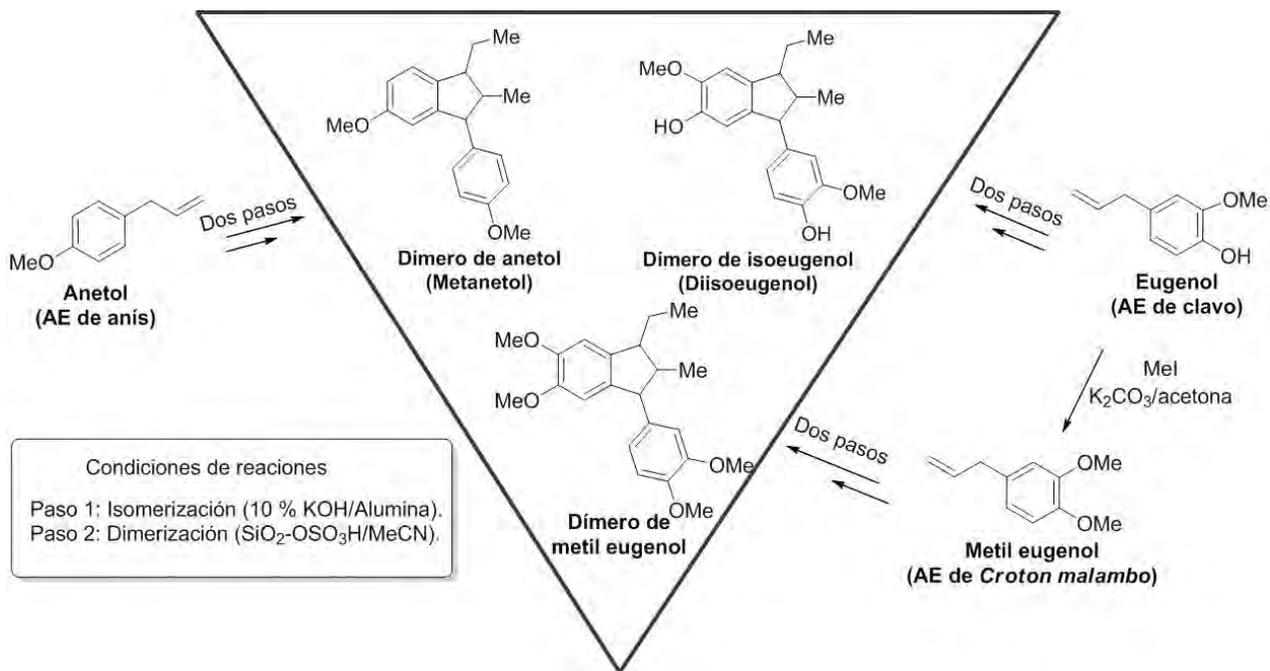


Figura 5. Desarrollo de dihidroindenos usando AEs y sus constituyentes fenólicos como reactivos renovables.

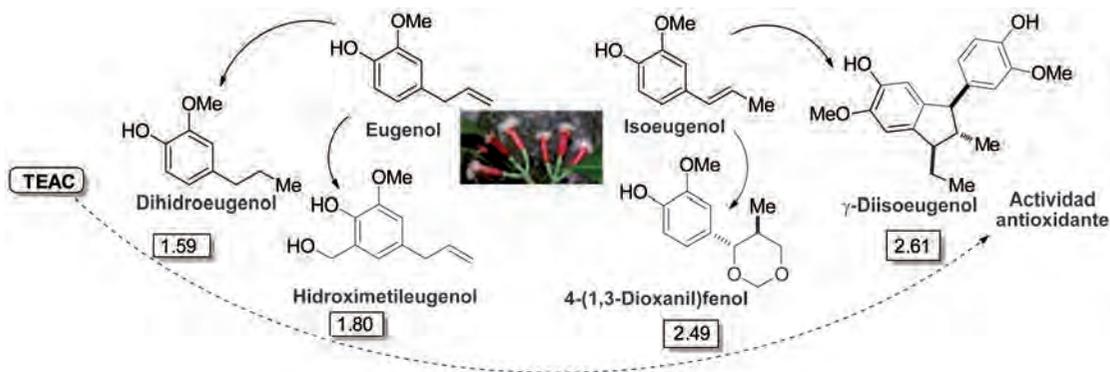


Figura 6. Manipulaciones químicas del eugenol e isoeugenol hacia moléculas antioxidantes.

se destaca la horsfilina, un agente analgésico aislado de la planta *Horsfieldia superba*. La (+)-retronecina, a su vez, es un compuesto orgánico heterocíclico donde dos anillos de cinco miembros se encuentran unidos por un nitrógeno común.

El esqueleto de la pirrolizidina constituye la estructura central de un grupo de alcaloides que se pueden encontrar en más de 6000 plantas, por ejemplo, en *Senecio douglasii*. Debido a su importancia biológica, se prepararon nuevas series de moléculas heterocíclicas con el sistema de C-3-espiro-2-oxiindol generando diversidad molecular de naturaleza indólica (Fig. 8). Estas moléculas son de

gran importancia para la química orgánica y la química medicinal, debido a su abundancia en varios productos naturales de interesante arquitectura molecular.

La construcción del sistema de C-3-espiro-2-oxiindol, donde los esqueletos de la isatina y pirrolizina se unen vía el carbono espiro, se realizó con facilidad mezclando tres componentes en un medio verde (agua con carbonato de propileno – C.P.). Este ejemplo es interesante por que se forman simultáneamente tres nuevos enlaces y cinco centros estereogénicos incluyendo un átomo cuaternario (espiro-átomo) en un solo paso (Fig. 8) (Puerto Galvis y Kouznetsov, 2013).

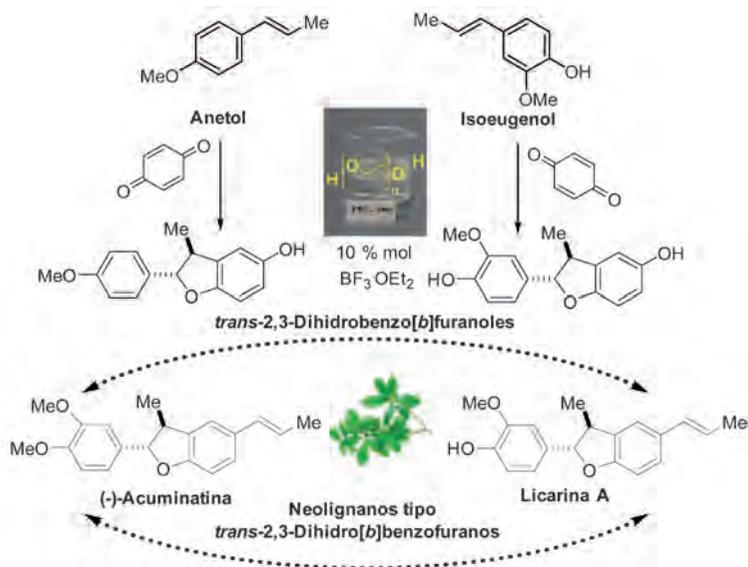


Figura 7. Síntesis de 2,3-dihidrobenzo[b]furan-5-oles usando medios de reacción verdes.

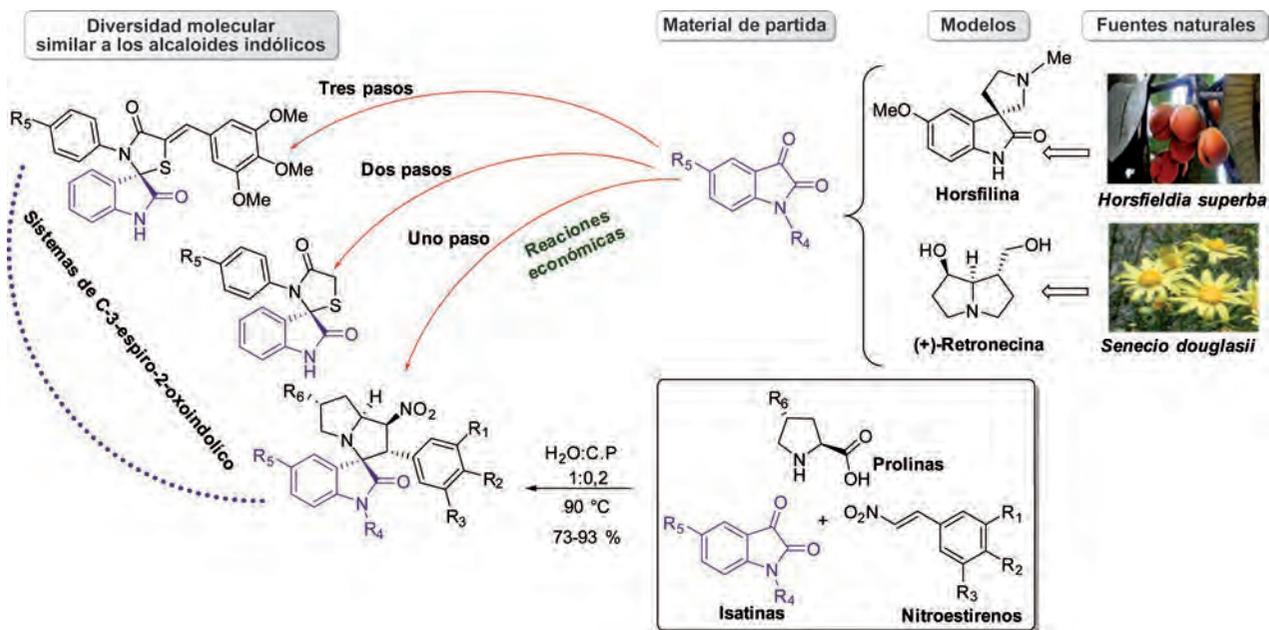


Figura 8. Modelos de alcaloides y generación de compuestos indólicos.

3. Estudios farmacológicos: pequeños peces, moléculas orgánicas y grandes esperanzas.

El desarrollo y descubrimiento de nuevos fármacos implica la realización de numerosos ensayos *in vivo* e *in vitro* para la identificación del compuesto más promisorio. Este compuesto-líder debe ser sometido a rigurosas pruebas de toxicidad y farmacocinética antes de ser evaluado en ensayos clínicos. Sin embargo, muchas de estas pruebas

pre-clínicas no aseguran el éxito de estas moléculas en los subsecuentes estudios clínicos. La correlación directa entre los modelos animales y los humanos es obstaculo principal para la generación de nuevos fármacos. Lo anterior constituye uno de los principales retos de la farmacología y la química medicinal. Últimamente, el pez Cebra (*Danio rerio*), un vertebrado de 4-5 cm de longitud, se ha convertido en un modelo atractivo y

muy importante. Este modelo ha contribuido en varios aspectos bio-farmacológicos importantes, tales como la identificación de dianas farmacológicas, modelos de enfermedades, descubrimiento de los compuestos-líderes y su toxicología. Esto se debe a la alta homología genética con los humanos: estos peces comparten más del 85 % con humanos, la gran similitud entre tejidos y órganos y la presencia de repuestas biológicas similares cuando se “estimulan” con moléculas pequeñas (Stern y Zon, 2003).

Comparando con los estudios farmacológicos tradicionales de las ratas, los conejos y primates, este modelo tiene varias ventajas, a saber: a) los embriones y larvas del pez Cebra son de tamaño pequeño (1-1,5 mm) son transparentes durante las primeras etapas de desarrollo; b) su embriogénesis finaliza durante las primeras 24 horas de vida; y c) su desarrollo ocurre fuera del útero de la madre. Todo eso ayuda su inspección visual y estudio como un sistema individual. Adicionalmente, su alta fertilidad (una pareja de adultos puede llegar a producir de 400-600 embriones) permite evaluar una gran cantidad de moléculas en cuestión de días (Rubinstein, 2003).

La técnica de los bioensayos en modelo del pez Cebra puede ser representada gráficamente en la Figura 9. La claridad óptica del embrión hace posible la visualización de una amplia variedad de cambios funcionales y morfológicos sin matar, diseccionar ni manipular los embriones. La necrosis puede ser fácilmente detectada como opacidad anormal en el embrión. Los defectos en el sistema circulatorio, tales como hemorragias, también pueden ser evaluados fácilmente (Stern y Zon, 2003).



Figura 9. Larvas de pez cebra (*Danio rerio*) de 6 días post-fertilización y esquema general de bioensayos en el modelo pez Cebra.

Hoy en día, las investigaciones que utilizan este modelo se expanden hacia áreas como la neurociencia, farmacología, investigaciones clínicas (esencialmente cardiovasculares) y química medicinal (el desarrollo de agentes quimioterapéuticos). Este hecho se ve reflejado en el marcado incremento en las publicaciones asociadas al pez Cebra en años recientes (Taylor et al., 2010; Letamendia et al., 2012; ReddyGuduruet al., 2013; Basu y Sachidanandan, 2013).

Gracias a la simpleza y eficacia del proceso de síntesis, nuestro grupo pudo disponer de una quimioteca de moléculas y logró desarrollar e implementar por primera vez en Colombia un modelo *in vivo*. El modelo de embriones del pez Cebra es rápido, económico, con pocos conflictos éticos y sus resultados son de alta confiabilidad y reproducibilidad. Todo eso incrementa las probabilidades de éxito de futuros ensayos clínicos. Es así, como el modelo del pez Cebra se convierte en una herramienta útil para la farmacología y la química medicinal en el diseño, desarrollo y descubrimiento de nuevos fármacos, tal y como lo demuestran los resultados que se expondrán a continuación.

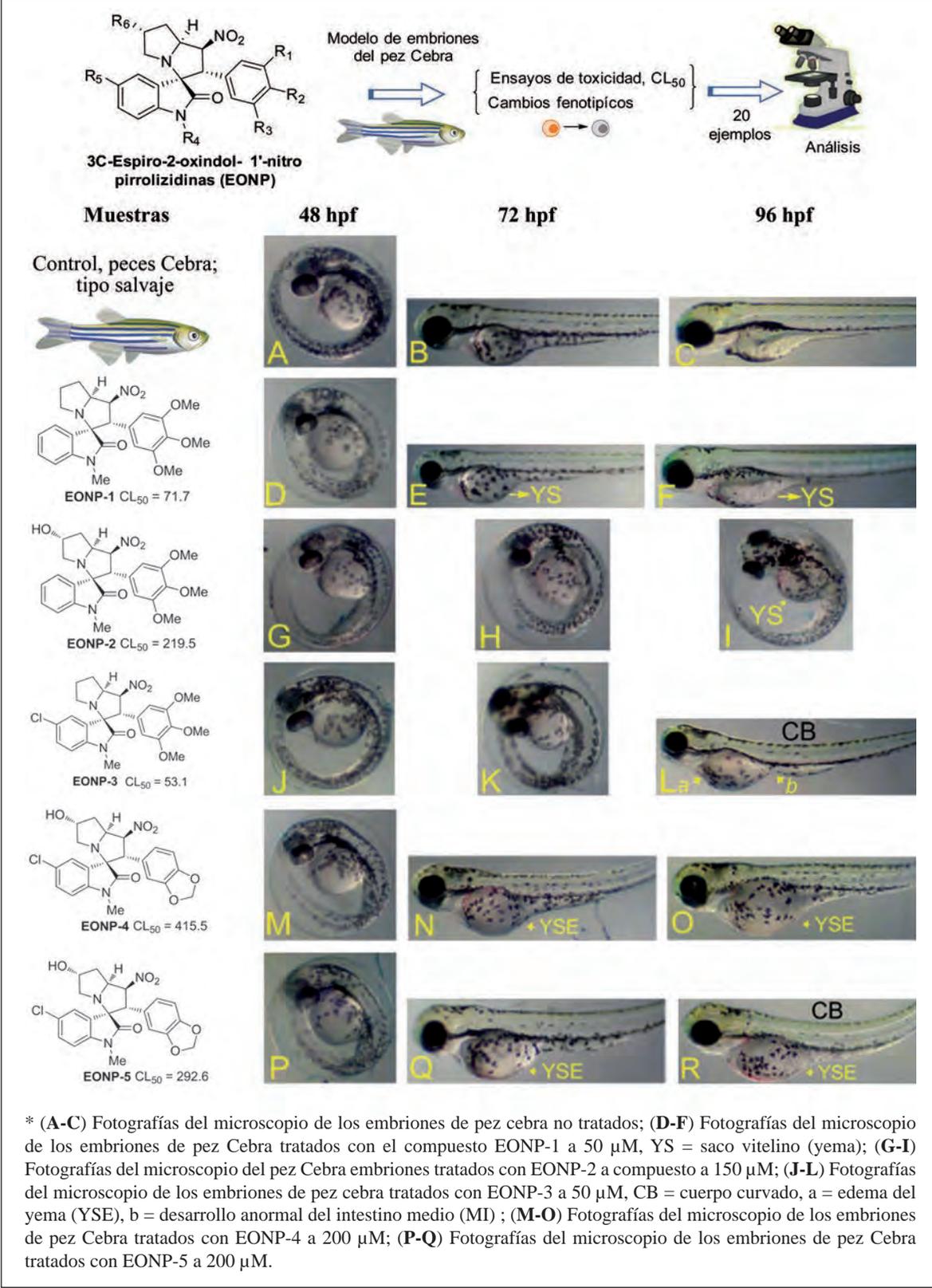
Habiendo obtenido y caracterizado una nueva biblioteca de veinte miembros basados en el sistema de la 3C-espiro-2-oxindol-1'-nitropirrolizidina que fue construido por medio de reacción “one-pot” de tres componentes (diversas prolinas, isatinas y nitroesterenos) (Fig. 8), se realizaron los ensayos de su toxicidad (concentración letal - CL_{50} , $\mu\text{mol/L}$) en embriones del pez Cebra identificando varias moléculas tóxicas, la EONP-1 y la EONP-3, y varias moléculas no tóxicas, la EONP-2, EONP-4 y EONP-5 (Tabla 1) (Puerto Galvis y Kouznetsov, 2013).

Una vez que se determinó la CL_{50} para esta serie, se inició el análisis de los cambios fenotípicos, es decir el estudio de cómo se manipulan sutilmente la actividad y la expresión normal de los genes endógenos y proteínas.

Este estudio se realizó en un rango de concentraciones por debajo del valor de CL_{50} , y los fenotipos inducidos por las moléculas en los embriones de pez cebra, se analizaron a las 48, 72 y 96 horas después de la fertilización (hpf, hours post fertilization). Durante el análisis se observó el retraso del desarrollo, cuerpos curvados (CB, *curved bodies*), edemas graves, edema en el saco vitelino (YS, *big yolk sac* o YSE), desarrollo anormal del intestino medio (MI). Los efectos descritos fueron los principales fenotipos visuales observados para esta serie, y dependen del compuesto administrado (Tabla 1). Los resultados sugieren que el suministro de nutrientes y hormonas, contenidas en el YS al sistema circulatorio es lento y se inducen varios daños al hígado.

Tomando como punto de partida los resultados encontrados, se iniciaron ensayos de actividad antiviral frente a herpes virus, antimicóticos y citotóxicos, con el fin de establecer

Tabla 1. Nueva librería y el esquema de los bioensayos *in vivo* con los embriones del pez Cebra.*



los posibles mecanismos de acción, e identificar nuevos targets biológicos implicados en el desarrollo embrionario de los vertebrados.

Conclusiones y perspectivas futuras

Los aceites esenciales de diversas plantas aromáticas tropicales desempeñan un papel importante en el desarrollo de las ciencias naturales. A lo largo de la historia de la civilización humana, éstos se utilizaron para fines medicinales, farmacológicos, en aromaterapia y con fines culinarios. Hoy en día, es evidente que la biomasa vegetal, incluidos los aceites esenciales no sólo son una fuente de energía y alimento, sino también una fuente para los reactivos de la química fina. Los aceites esenciales son mezclas muy variables y complejas de metabolitos, tienen componentes aislables y son de carácter renovable.

La gran ventaja de trabajar con aceites esenciales, es que la mayoría de ellos se destilan en un solo paso, ofreciendo sus componentes valiosos rápidamente. Por otra parte, algunas plantas tropicales aromáticas crecen rápidamente y dan una gran fracción de aceite esencial (hasta 2 - 10%), por lo tanto, si se tiene una planta que produce una alta cantidad del aceite esencial, hasta un 10%, y cuyo componente principal (o mejor, un componente único) alcanza hasta el 55%, hay una gran posibilidad de utilizar este aceite como reactivo en síntesis química, para la obtención de nuevos productos con un mayor valor añadido, por ejemplo, con propiedades biológicas, farmacológicas, etc.

Sobre esta base, el interés por los aceites esenciales como reactivos de química fina se incrementará en el futuro. No sólo las moléculas aromáticas que se encuentran en los aceites esenciales pueden ser usadas en la preparación de diversos productos, sino también los compuestos terpénicos, otros componentes principales de estos aceites esenciales con interesantes estructuras.

La diversidad química de las funcionalidades en los compuestos fenólicos, y en los terpenos, ha generado la amplia diversidad estructural presente en los numerosos productos naturales conocidos. Con la atención fija en los procedimientos sintéticos de carácter verde, no sería sorprendente encontrar más aplicaciones sintéticas a los componentes mayoritarios de los aceites esenciales.

Se espera que esta pequeña reseña ayude a los lectores a inspirarse, y a realizar nuevos descubrimientos e innovaciones transformando químicamente los aceites esenciales, unos reactivos económicos, accesibles y renovables.

El descubrimiento de fármacos involucra un proceso complejo de ensayos bioquímicos, celulares y pruebas de validación en modelos animales, teniendo como último peldaño la validación en seres humanos; este proceso toma típicamente

de 12 a 15 años y varios millones de dólares antes que el fármaco alcance el mercado. El cribado de compuestos químicos de bajo peso molecular, la identificación de los cambios fenotípicos y el respectivo reconocimiento de su(s) diana(s) biológica(s) en los organismos vivos usados como modelos, representa una poderosa alternativa en la identificación de compuestos líderes, al combinar un proceso de cuantiosos pasos en unos pocos.

Dado que numerosos procesos biológicos no pueden ser recreados en cultivos celulares, y que el metabolismo de los compuestos podría ser profundamente diferente para un organismo entero, la utilización de los peces Cebrá surge como un modelo biológico versátil, que permite eliminar muchos de los inconvenientes y disminuir los costos asociados a los ensayos biológicos iterativos.

Los avances en la comprensión de los sistemas biológicos, se debe a la sabia aplicación de los principios y técnicas de la química orgánica. La perturbación que causan las moléculas pequeñas en los sistemas biológicos, permite encontrar una valiosa y detallada información acerca del funcionamiento de los sistemas vivos desde una perspectiva molecular.

Por lo tanto, la química orgánica sintética juega un papel de iniciador en el descubrimiento biológico, diseñando rutas sintéticas y metodologías eficientes para la construcción y optimización de sistemas moleculares que pretenden alcanzar una alta analogía estructural con las moléculas descubiertas en la naturaleza, reconocidas por ser efectivas en el tratamiento de diversas enfermedades.

Agradecimientos

Se agradece a Colciencias (RC-432-2004, RC-245-2011, RC-0572-2012 y RC-0346-2013) por la ayuda financiera de este trabajo, a la UIS por la autorización del disfrute de año sabático (Contrato 4/2013) y a mis colegas y estudiantes cuyos nombres aparecen en los artículos de nuestro Grupo de investigación.

Referencias

- Basu, S., Sachidanandan, C.** (2013), "Zebrafish: A Multifaceted Tool for Chemical Biologists", *Chem. Rev.*, 113, 7952-7980.
- Bedoya, L.M., Abad, M.J., Astudillo Saavedra, L., Gutiérrez, C.M., Kouznetsov, V.V., Alcami, J., Bermejo, P.** (2010), "Quinoline-based Compounds as Modulators of HIV Transcription Through NF- κ B and SP-1 Inhibition", *Antiviral Res.*, 87, 338-344.
- Bomparta, D., Núñez-Durán, J., Daniel Rodríguez, D., Kouznetsov, V.V., Meléndez Gómez, C.M., Sojo, F., Arvelo, F., Visbal, G., Alvarez, A., Serrano-Martínez, X., García-Marchán, Y.** (2013), "Anti-leishmanial Evaluation of C2-aryl Quinolines. Mechanistic Insight on Bioenergetics and Sterol Biosynthetic Pathway of *Leishmania braziliensis* Parasite", *Bioorg. Med. Chem.*, 21, 4426-4431.

- Corma, A.; Iborra, S.; Velty, A.** (2007), "Chemical Routes for the Transformation of Biomass into Chemicals", *Chem. Rev.*, 107, 2411-2502.
- Charlton, J. L.** (1998), "Antiviral Activity of Lignans", *J. Nat. Prod.*, 61, 1447-1451.
- Fonseca-Berzal, C., Merchán Arenas, D.R., Romero Bohórquez, A.R., Escario, J.A., Kouznetsov, V.V., Gómez-Barrío, A.** (2013), "Selective Activity of 2,4-Diaryl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines on *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes and Amastigotes Expressing β -Galactosidase", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 23, 4851-4856.
- Jaramillo C, B.E.; Duarte, E.; Muñoz, K.; Stashenko, E.** (2010), "Composición Química Volátil del Aceite Esencial de *Croton malambo* H. Karst. Colombiano y Determinación de su Actividad Antioxidante", *Rev. Cubana PlantMed.*, 15, 133-142.
- Jaramillo C., B.E., Olivero T., J., Muñoz, K.** (2007), "Composición Química Volátil y Toxicidad Aguda (CL₅₀) Frente a *Artemia salina* del Aceite Esencial del *Croton malambo* Colectado en la Costa Norte Colombiana", *Scientia et Technica*, 33, 299-302.
- Kokate, C.K., Purohit, A.P., Gokhale, S.B.** (2005), "A text book of Pharmacognosy", NiraliPrakashan, Pune, pp. 3-15.
- Kordali, S., Kotan, R., Mavi, A., Cakir, A.** (2005), "Determination of the Chemical Composition and Antioxidant Activity of the Essential Oil of *Artemisia dracunculoides* L. and of the Antifungal and Antibacterial Activities of Turkish *A. dracunculoides*, *A. absinthium* and *santonium* Essential Oil", *J. Agric. Food Chem.*, 53, 9452-9458.
- Kouznetsov, V.V., Meléndez Gómez, C.M., Luna Parada, L.K., Bermudez, J.H., Vargas Méndez, L.Y., Muñoz Acevedo, A.** (2011), "Efficient Synthesis and Free-Radical Scavenging Capacity of New 2,4-Substituted Tetrahydroquinolines Prepared via BiCl₃-Catalyzed Three-Component Povarov Reaction, Using N-Vinylamides", *Mol. Divers.*, 15, 1007-1016.
- Kouznetsov, V.V., Merchán Arenas, D.R.** (2009), "First Green Protocols for the Large-Scale Preparation Of γ -Diisoeugenol and Related Dihydro(1H)indenes via Formal [3+2] Cycloaddition Reactions", *Tetrahedron Lett.*, 50, 1546-1549.
- Kouznetsov, V.V., Merchán Arenas, D.R., Rojas Ruiz, F.A., Vargas Méndez, L.Y.** (2013), "Rational Design of New Molecules of Biological Significance from Phenolic Constituents of Some Tropical Plants as Renewable Materials" en "Chemistry and Pharmacology of Naturally Occurring Bioactive Compounds", Taylor & Francis, Chapter 6, pp. 146-172.
- Kouznetsov, V.V., Merchán Arenas, D.R., Romero Bohórquez, A.R.** (2008), "PEG-400 as Green Reaction Medium for Lewis Acid-Promoted Cycloaddition Reactions with Isoeugenol and Anethole", *Tetrahedron Lett.*, 49, 3097-3100.
- Kouznetsov, V.V., Merchán Arenas, D.R., Romero Bohórquez, A.R.** (2012), "Transformaciones Químicas de los Compuestos Aromáticos "C₆-C₃" y "C₆-C₁" en: "Plantas Aromáticas y Aceites Esenciales: Estudio y Aplicaciones", UIS, Bucaramanga, Colombia, pp. 245-270.
- Merchán Arenas, D.R., Martínez Bonilla, C.A., Kouznetsov, V.V.** (2013), "Aqueous SDS micelle-promoted acid-catalyzed domino ABB' imino Diels-Alder reaction: a mild and efficient synthesis of privileged 2-methyl-tetrahydroquinoline scaffolds", *Org. Biomol. Chem.*, 11, 3655-3663.
- Merchán Arenas D.R., Muñoz Acevedo A., Vargas Méndez L.Y., Kouznetsov V.V.** (2011), "Scavenger activity evaluation of the clove bud essential oil (*Eugenia caryophyllus*) and eugenol derivatives employing ABTS "decolorization", *Sci. Pharm.*, 79, 779-791.
- Muñoz, A., Sojo, F., Merchán Arenas, D.R., Kouznetsov, V.V., Arvelo, F.** (2011), "Cytotoxic Effects of New *Trans* 2,4-Diaryl-R-3-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines and their Interaction with Antitumoral Drugs Gemcitabine and Paclitaxel on Cellular Lines of Human Breast Cancer", *Chem. Biol. Interact.*, 189, 215-221.
- Letamendia, A., Quevedo, C., Ibarbia, I., Virto, J.M., Holgado, O., Izpisua Belmonte, J.C., Callol-Masso, C.** (2012), "Development and Validation of an Automated HighThroughput System for Zebrafish In Vivo Screenings", *PLOS One*, 7, e36690, available online: www.plosone.org.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Bretscher, A., Ploegh, H., Matsudaira, P.** (2008), "Molecular Cell Biology"; W.H. Freeman, Basingstoke, UK, pp. 1-3.
- Olivero-Verbel, J., González-Cervera, T., Güette-Fernandez, J., Jaramillo-Colorado B., Stashenko, E.** (2010), "Chemical composition and antioxidant activity of essential oils isolated from Colombian plants", *Brazilian J. Pharm.*, 20, 568-574.
- Puerto Galvis, C.E., Kouznetsov, V.V.** (2013), "Regio- and Stereoselective Synthesis of Spirooxindole 1'-Nitro Pyrrolizidines with Five Concurrent Stereocenters under Aqueous Media and their Bioprospection Using the Zebrafish (*Danio rerio*) Embryo Model", *Org. Biol. Chem.*, 11, 7372-7386.
- Reddy Guduru, S.K., Chamakuri, S., Chandrasekar, G., Kitambi, S.S., Arya, P.** (2013), "Tetrahydroquinoline-Derived Macrocyclic Toolbox: The Discovery of Anti-angiogenesis Agents in Zebrafish Assay", *ACS Med. Chem. Lett.*, 4, 666-670.
- Rojas Ruiz, F.A., Vargas Méndez, L.Y., Kouznetsov, V.V.** (2011), "Challenges and Perspectives of Chemical Biology, a Successful Multidisciplinary Field of Natural Sciences", *Molecules*, 16, 2672-2687.
- Rubinstein, A.L.** (2003), "Zebrafish: from Disease Modeling to Drug Discovery", *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.*, 6, 218-223.

- Schreiber, S.** (2000), "Target-Oriented and Diversity-Oriented Organic Synthesis in Drug Discovery", *Science*, 287, 1964-1969.
- Simić, A., M. Soković, M.D., Ristić, M., Grujić-Jovanović, S., Vukojević, J., Marin, P.D.** (2004), "The chemical composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities", *Phytotherapy Res.*, 18, 713-717.
- Spadl, R., Spring, D., Bender, A.** (2008), "Diversity-Oriented Synthesis; a Spectrum of Approaches and Results", *Org. Biomol. Chem.*, 6, 1149-1158.
- Stern, H.M.; Zon, L.I.** (2003), "Cancer Genetics and Drug Discovery in the Zebra Fish", *Nat. Rev. Cancer.*, 3, 533-539.
- Tan, K.H., Nishida, R.** (2012), "Methyl Eugenol: Its Occurrence, Distribution, and Role in Nature, Especially in Relation to Insect Behavior and Pollination", *J. Insect Sci.*, 12, 56, available online: insectscience.org/12.56.
- Taylor, K.L., Grant, N.J., Temperley, N.D., Patton, E.E.** (2010), "Small molecule screening in zebrafish: an *in vivo* approach to identifying new chemical tools and drug leads", *Cell Communication and Signaling*, 8, 11, available online: <http://www.biosignaling.com/content/8/1/11>.
- Waldmann, H., Janning, P.** (2004), "*Chemical Biology. A Practical Course*", Wiley-VCH, Weinheim, pp. 1-3.
- Wang, G.W., Hu, W.T., Huang, B.K., Qin, L.P.** (2010), "Illiciumverum: A review on its botany, traditional use, chemistry and pharmacology", *J. Ethnopharmacol.*, 136, 10-20.
- Wender, P.A., Verma, V.A., Paxton, T.J., Pillow, T.H.** (2008), "Function-Oriented Synthesis, Step Economy, and Drug Design", *Acc. Chem. Res.*, 41, 40-49.