

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**SEMISÍNTESIS Y BIOEVALUACIÓN DE DERIVADOS DE PRODUCTOS NATURALES  
MAYORITARIOS OBTENIDOS A PARTIR DE PLANTAS DE USO ETNOMÉDICO:  
*LIGUSTICUM PORTERI Y HETEROTHECA INULOIDES***

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

M. EN C. JOSÉ LUIS GONZÁLEZ ÁVILA

DR. EDUARDO GUILLERMO DELGADO LAMAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., AGOSTO, 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO:**

Presidente: Dr. Manuel Jiménez Estrada

Vocal: Dr. Francisco Hernández Luis

Vocal: Dra. Laura Patricia Álvarez Berber

Vocal: Dr. José Gustavo Ávila Zárraga

Secretario: Dr. Marcos Hernández Rodríguez

Esta tesis fue desarrollada en el laboratorio 1C del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la tutoría del Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas.

M. en C. José Luis González Ávila

El sustentante

Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas

Tutor principal

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente al Instituto de Química, por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas y a la Coordinación de Estudios de Posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el otorgamiento de beca para realización de estudios de doctorado (número de becario 294731).

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico por el apoyo otorgado a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (proyecto IG200318).

Al Dr. Guillermo Delgado, por haberme permitido formar parte de su grupo y por la asesoría, la orientación, el apoyo y la guía que me brindó.

A los miembros del comité tutor, Dra. María Isabel Aguilar Laurents y Dr. Marcos Hernández Rodríguez por sus continuas aportaciones, consejos y críticas siempre constructivas para el desarrollo del proyecto.

A los miembros del jurado del examen de grado, doctores Manuel Jiménez Estrada, Francisco Hernández Luis, Laura Patricia Álvarez Berber y José Manuel Ávila Zárraga por sus atinados comentarios a este trabajo.

Igualmente, a los investigadores que formaron parte de los jurados del examen de candidatura y tutelar ampliado, por sus aportaciones siempre atendibles y constructivas.

Al Dr. Marco A. Cerbón Cervantes, por las facilidades otorgadas para la realización de las pruebas biológicas, y a su alumna, M. en C. Karol Almeida Aguirre, por el asesoramiento y la ayuda técnica, así como en la contribución en la discusión que ambos aportaron.

A la M. en C. Teresa Rodríguez-Apan y al Dr. José Luis Rodríguez Chávez por su contribución en el desarrollo de las pruebas de sensibilización de la resistencia.

A los doctores Carlos A. Méndez-Cuesta y Rodrigo Aguayo por su instrucción y apoyo en la realización de los estudios de acoplamiento molecular.

Al personal académico del Instituto de Química asignado a los laboratorios de servicios espectroscópicos, espectrométricos y cristalográficos. A Ángeles Peña, Elizabeth Huerta, María Isabel Chávez, Héctor Ríos, Rubén Gaviño, Javier Pérez-Flores, Rocío Patiño, Beatriz Quiroz, Nuria Esturau, Rubén A. Toscano y Simón Ortega-Hernández.

A los compañeros del laboratorio (en sus integraciones actual y anteriores), especialmente a la Dra. Alejandra León Cabrera, M. en C. Fabiola López Huerta, y Dr. José Luis Rodríguez Chávez, por el apoyo, la discusión, los consejos y el constante aporte durante el trabajo de experimentación.

A mi hermana y mi mamá, por el apoyo incondicional.



Publicaciones derivadas de este trabajo:

**Structural Reassignment of *rel*-(3'Z,3R,6R,7R,3a'R,6'R)-3,8-Dihydrodiligustilide and the Activity of Diligustilide and 3,8-Dihydro- and 3,8,7',7a'-Tetrahydrodiligustilides as Progestins**

Ávila, J. L.; Almeida-Aguirre, E. K. P.; Méndez-Cuesta, C. A.; Toscano, R. A.; Cerbón-Cervantes, M. A.; Delgado, G. *Organic Letters* **2019**, *21*, 7460 -7465.

doi: 10.1021/acs.orglett.9b02762

(Este trabajo fue seleccionado para su inclusión en un número virtual especial (Highlights of Organic Chemistry in Latin-America) de la revista *Organic Letters* (en proceso, 4 de agosto del 2020), ya que se consideró como un artículo relevante de un tema o de una región determinada).

**Chemo-sensitizing activity of natural cadinanes from *Heterotheca inuloides* in human uterine sarcoma cells and their in silico interaction with ABC transporters**

Rodríguez-Chávez, J. L.; Méndez-Cuesta, C. A.; Ramírez-Apan, T.; Egas, V.; Ávila, J. L.; Neira-González, A.; Hernández, T.; Espinosa-García, F. J.; Delgado, G. *Bioorganic Chemistry* **2019**, *91*, 103091.

doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103091

En preparación:

**Synthesis of dimeric cadinanes and some analogues**

Durante el doctorado se publicó la siguiente revisión científica:

**Phthalides: Distribution in Nature, Chemical Reactivity, Synthesis, and Biological Activity.**

León, A.; Del-Ángel, M.; Ávila, J. L.; Delgado, G. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* **2016**, *104*, 127 -246

Presentaciones institucionales y en congresos:

***Semisíntesis de dicadalenol, un dímero de sesquiterpenos con actividad antiinflamatoria***

Ávila, J. L.; Delgado, G. Presentado en **Seminario departamental de Productos Naturales del Instituto de Química (UNAM)**, Ciudad de México, México, febrero, 2018

***Aproximaciones semisintéticas a dicadalenol y algunos análogos***

Ávila, J. L.; Delgado, G. Presentado en **Quimiunam 2018**, Ciudad de México, México, agosto, 2018

***Structural correction of a dimeric phthalide with progesterone-like activity***

Ávila, J. L.; Delgado, G. Presentado en **30th International Symposium on the Chemistry of Natural Products (IUPAC)**, Atenas, Grecia, 25-29 noviembre, 2018

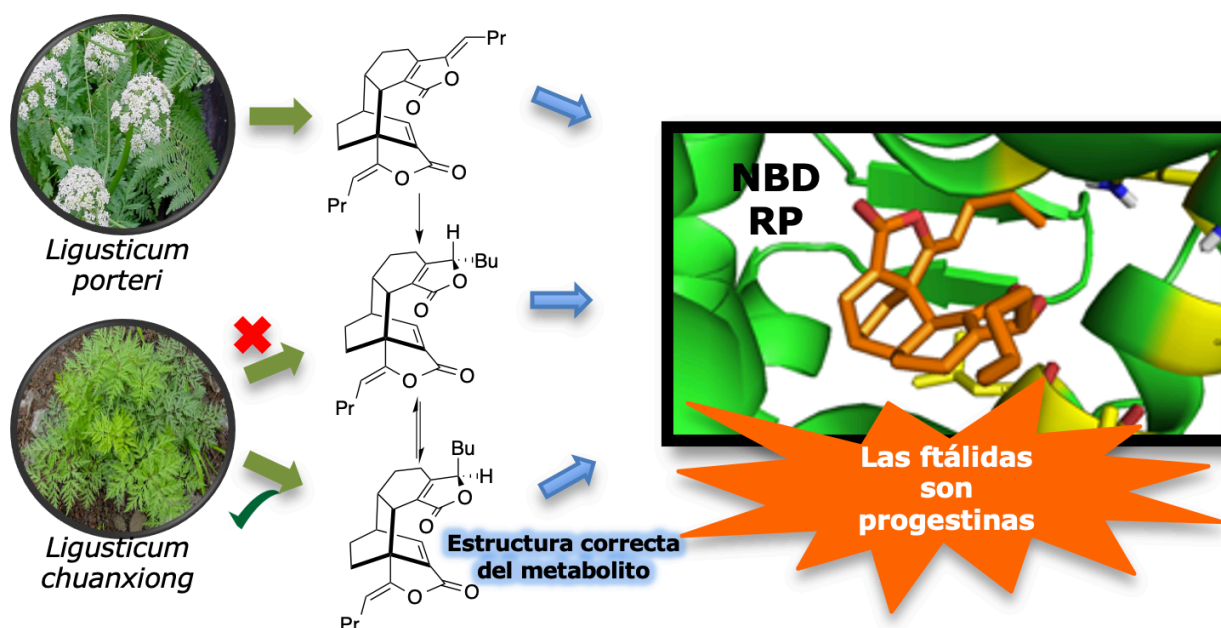
***Semisynthetic approaches to dicadalenol and some analogues***

Ávila, J. L.; Delgado, G. Presentado en **30th International Symposium on the Chemistry of Natural Products (IUPAC)**, Atenas, Grecia, 25-29 noviembre, 2018

## RESUMEN / ABSTRACT

Se llevó a cabo el aislamiento de diligustílida y otras ftálicas a partir de la especie vegetal *Ligusticum porteri*. Se prepararon otras ftálicas partiendo de ese compuesto. Por medio del análisis espectroscópico de los compuestos sintetizados, se reasignó la estructura de un metabolito aislado previamente de *L. chuanxiong*, con una potente actividad como progestina, de acuerdo con lo informado en la literatura. Se evaluó la actividad como progestina de diligustílida y sus derivados por medio de ensayos de proliferación celular, microscopía de inmunofluorescencia, así como por medio de estudios de acoplamiento molecular. De acuerdo con los resultados, las ftálicas semisintéticas preparadas tienen potencial actividad como progestina y una de ellas tuvo actividad mayor en relación con la ftálica natural aislada previamente.

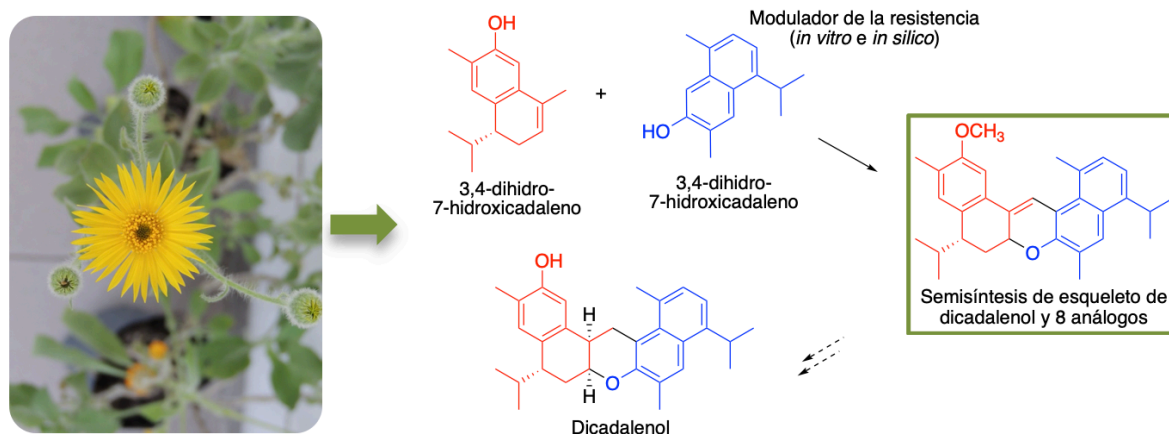
Diligustilide and other phthalides were isolated from the plant species *Ligusticum porteri*. Some phthalides were prepared starting from the former. The stereochemical reassignment of a metabolite from *L. chuanxiong*, which had a potent activity as progestin in agreement to previous reports, was achieved through spectroscopic analysis. The activity as progestins of diligustilide and its derivatives were evaluated by means of cell-proliferation assays, immunofluorescence microscopy as well as molecular docking analysis. According to our results, the prepared semisynthetic phthalides have potential activity as progestins and one of them had a greater activity in comparison to that of the previously isolated natural phthalide.





Se llevó a cabo un estudio de la reactividad de dos cadinanos (7-hidroxicadalenol, y 3,4-dihidro-7-hidroxicadalenol) obtenidos de *Heterotheca inuloides* con el objetivo de avanzar hacia la síntesis de el esqueleto y análogos de dicadalenol, un disesquiterpenoide aislado de la misma especie vegetal con una actividad antiinflamatoria sobresaliente, en comparación con el control. De las metodologías intentadas, sólo la condensación de 2-naftoles (7-hidroxicadalenos) con carbonilos  $\alpha,\beta$ -insaturados, catalizada por la mezcla de ácido fenilborónico y ácido acético, fue exitosa para la obtención de los compuestos deseados. Los resultados experimentales permitieron proponer una ruta biogénica para la formación de dicadalenol. Adicionalmente, se evaluó la actividad moduladora de la resistencia de algunos cadinanos *in vivo* líneas celulares de sarcoma uterino mediante, así como *in silico*. Estos resultados mostraron que 3,4-dihidro-7-hidroxicadalenol es capaz de revertir la resistencia.

A study on the reactivity of two cadinanes (7-hydroxycadalenol and 3,4-dihydro-7-hydroxycadalenol) isolated from *Heterotheca inuloides* was performed as an approach to the synthesis of the skeleton and some analogs of dicadalenol, a disesquiterpenoid isolated from the same species, which had a noteworthy anti-inflammatory activity, in comparison to that of the control. Among the attempted methodologies, only that consisting in the condensation of 2-naphthols (7-hydroxycadalenols) and  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyls, catalysed by phenyl boronic acid and acetic acid mixture, was successful. These results allowed the proposal of a biogenetic route for dicadalenol. Additionally, the modulating activity of multi-drug resistance of some cadinanes was evaluated *in vivo* in uterine sarcoma cells as well as *in silico*. The results showed that 3,4-dihydro-7-hydroxycadalenol is able to revert resistance.



## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	15
2. ANTECEDENTES .....	17
2.1. Metabolitos de <i>Ligusticum porteri</i> .....	17
2.2. Metabolitos de <i>Heterotheca inuloides</i> .....	23
2.3. Resistencia a múltiples fármacos.....	27
3. JUSTIFICACIÓN .....	30
4. OBJETIVOS .....	32
5. HIPÓTESIS .....	33
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	34
6.1. Dihidroiligustílida.....	34
6.2. Semisíntesis del esqueleto de dicadalenol .....	45
6.2.1. Obtención de análogos de dicadalenol .....	60
6.2.2. Propuesta biogénica de la formación de dicadalenol.....	65
6.3. Actividad moduladora de la resistencia a múltiples fármacos .....	68
7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....	73
8. SECCIÓN EXPERIMENTAL .....	75
8.1. Procedimientos químicos generales.....	75
8.1.1. Aislamiento de productos naturales.....	75
8.2. Reacciones .....	76
8.2.1. Metabolitos de <i>L. porteri</i> .....	76
8.2.2. Metabolitos de <i>H. inuloides</i> .....	79
8.3. Ensayos biológicos .....	91
8.3.1. Cultivo de células .....	91
8.3.2. Ensayos de viabilidad celular .....	91
8.3.3. Microscopía de inmunofluorescencia (MIF) .....	92
8.3.4. Estudio de modulación de la resistencia en células de sarcoma uterino resistentes.....	93
8.4. Estudio de acoplamiento molecular.....	94
9. REFERENCIAS .....	96
PUBLICACIÓN .....	108

ESPECTROS.....	i
----------------	---

## Tablas de contenido

### Figuras

Figura 1. Algunas ftálicas aisladas de plantas de la familia Apiaceae .....	18
Figura 2. Sitios reactivos de ( <i>Z</i> )-ligustílida ( <b>1</b> ).....	19
Figura 3. Dímeros lineales de ( <i>Z</i> )-ligustílida ( <b>1</b> ) .....	20
Figura 4. Metabolitos de <i>Heterotheca inuloides</i> .....	24
Figura 5. Modelo de estructura de gp-P. ....	28
Figura 6. Impedimento estérico para la hidrogenación de los enlaces C3'-C8' y C7'-C7a' de <i>rac-5</i> . 36	
Figura 7. Interacción observada en experimento NOE unidimensional entre H3 y H7 de <i>rac-10</i> ....	37
Figura 8. Vista ortep de <i>rac-10</i> .....	37
Figura 9. Ligantes con que fue cocrystalizado el RP en las estructuras con 4APU y 3ZR7 (OrgA) y 1ZUC (tanaproget).....	43
Figura 10. Visualización de resultados de acoplamiento molecular entre <b>10</b> y RP.....	45
Figura 11. Propuesta de estado de transición de la reacción catalizada por PhB(OH) <sub>2</sub> .....	58
Figura 12. Análogos de dicadalenol. ....	61
Figura 13. Análisis de la configuración de los diastereómeros mayoritarios de los productos.....	62
Figura 14. Representación de las diferentes conformaciones del anillo de ciclohexeno en <b>85</b> .....	65
Figura 15. Cadinanos y controles usados en los ensayos de modulación de la resistencia. ....	70
Figura 16. Interacción de los cadinanos en la estructura de gp-P.....	71
Figura 17. Interacción de <b>42</b> con la gp-1 (MDR1) .....	71
Figura 18. Interacción de gp-P con <b>88b</b> . ....	72
Figura 19. MIF de células T47D marcadas con fosfo-RP-294.....	93
Figura 20. Interacciones de <i>rac-5</i> y <i>rac-37</i> con RP (4APU).....	95

Esquema 1. Adiciones de nucleófilos a (Z)-ligustílida ( <b>1</b> ) .....	20
Esquema 2. Cicloaductos [ $\pi 2 + s \pi 2_s$ ] de (Z)-ligustílida ( <b>1</b> ) .....	21
Esquema 3. Cicloaductos de Diels-Alder de (Z)-ligustílida ( <b>1</b> ) .....	21
Esquema 4. Reactividad de diligustílida ( <i>rac</i> - <b>5</b> ) y reasignación estructural de <b>35</b> .....	22
Esquema 5. Hidrogenación catalítica de diligustílida ( <i>rac</i> - <b>5</b> ) .....	22
Esquema 6. Reactividad de <b>40</b> y <b>42</b> .....	25
Esquema 7. Preparación de análogo de éter de <b>42</b> ( <b>63</b> ) y síntesis total de <b>40</b> .....	26
Esquema 8. Preparación de inuloidina ( <b>43</b> ) .....	26
Esquema 9. Estereoquímica de la hidrogenación de <i>rac</i> - <b>5</b> .....	35
Esquema 10. Obtención del epímero de <i>rac</i> - <b>10</b> ( <i>rac</i> - <b>67</b> ) .....	38
Esquema 11. Propuesta de formación biogenética de <i>ent</i> - <b>67</b> .....	39
Esquema 12. Análisis retrosintético para la obtención de <b>49</b> .....	46
Esquema 13. Alternativa de paso clave en la formación de dicadalenol con reacción de Diels-Alder .....	47
Esquema 14. Alternativa de paso clave en la formación de dicadalenol con C-alkilación 1,4 .....	47
Esquema 15. Alternativa de paso clave en la formación de dicadalenol con adición 1,2 .....	47
Esquema 16. Mecanismo de la adición 1,4 de 2-naftol a perilaldehído .....	49
Esquema 17. Adición de <b>75</b> a <b>78</b> .....	50
Esquema 18. Propuesta de obtención de esqueleto de dicadalenol por reacción de Gilman .....	50
Esquema 19. Reacción entre 2-naftol y 3-metilen-2-norbornanona promovida por $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ .....	51
Esquema 20. Nuevo análisis retrosintético para obtención de dicadalenol .....	52
Esquema 21. Reacciones de protección de <b>42</b> .....	53
Esquema 22. Reacción entre 2-naftol ( <b>74</b> ) y perilaldehído ( <b>85</b> ) .....	54
Esquema 23. Posible reacción entre <b>83</b> y <b>40</b> .....	58
Esquema 24. Propuesta de estereoselectividad con epoxidación seguida de reducción .....	59
Esquema 25. Reacción entre <b>43</b> y <b>85'</b> .....	59
Esquema 26. Biogénesis de dicadalenol .....	68

## Tablas

Tabla 1. Energías de afinidad calculadas entre ftálidas diméricas y estructuras de RP. ....	44
---	----

Tabla 2. Reacción de 2-naftol con crotonaldehído .....	48
Tabla 3. Optimización de protección de <b>42</b> .....	53
Tabla 4. Condiciones para la oxidación alílica de <b>81a</b> . .....	54
Tabla 5. Ensayos para llevar a cabo la reacción entre <b>40</b> y <b>85</b> .....	55
Tabla 6. Intentos adicionales de reacción entre <b>40</b> y <b>85</b> .....	55
Tabla 7. Comparación de condiciones de la reacción entre <b>85</b> y <b>40</b> en presencia de PhB(OH) <sub>2</sub> . .....	57
Tabla 8. Modificación de la IC <sub>50</sub> de doxorubicina ( <b>105</b> ) y mitoxantrona ( <b>106</b> ) por los cadinanos probados.....	69

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS DE USO COMÚN

ADTR- Análisis directo en tiempo real.

APF- Ácido polifosfórico.

c- Señal cuádruple.

°C- Grado Celsius.

c.c.f.- Cromatografía en capa fina.

CI<sub>50</sub>- Concentración inhibitoria media

COSY- Espectroscopia de Correlación (Correlation Spectroscopy).

d- Señal doble.

DAED- diacetato de etilendiamonio.

dd- Señal doble de dobles.

ddd- Señal doble de doble de dobles.

dt- Señal doble de triples.

LBD- *Ligand binding domain*, dominio de unión del ligante.

δ- Desplazamiento químico.

DEPT- Aumento sin distorsión por transferencia de polarización (Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer).

DIPEA- Diisopropiletilamina.

DMDO- Dimetildioxirano.

*e.d.*- exceso diastereomérico

EM- Espectrometría de masas.

EMAR- Espectrometría de masas de alta resolución

EtOH- Etanol.

gp-P- Glucoproteína P.

HMBC- Correlación Heteronuclear de Múltiples Enlaces (Heteronuclear Multiple Bond Correlation).

Hz- Hertz.

Hex- Hexano.

h- Señal hepteto.

*J*- Constante de acoplamiento.

L- Litro.

m- Multiplete.

MHz- Megahertz.

mL- Mililitro.

MOM- Metoximetileno.

NOESY- *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy* (espectroscopia de efecto nuclear Overhauser).

p- Penteto (señal quintuple).

PDB- *Protein Data Bank*

pf- Punto de fusión.

ppm- Partes por millón.

*rd*- relación diastereomérica

RMN- Resonancia magnética nuclear.

RMN <sup>1</sup>H- Resonancia magnética nuclear de hidrógeno.

RMN <sup>13</sup>C- Resonancia magnética nuclear de carbono 13.

RP- Receptor de progesterona.

fosfo-RP-294- Receptor de progesterona fosforilado en el residuo serina-294.  
s- Singulete.  
sext- sexteto  
THF- tetrahidrofurano.  
TMS- Tetrametilsilano.  
TBS- Terbutildimetilsililo.

## 1. INTRODUCCIÓN

La utilización de productos naturales y sus derivados ha impactado significativamente en la vida humana, por ejemplo, al ser empleados como fármacos<sup>1,2</sup> o con usos agrícolas.<sup>3</sup>

Una diferencia con los compuestos completamente sintéticos estriba en que los productos naturales (entendidos como metabolitos secundarios de los seres vivos) se ubican en una región diferente del espacio químico. Esto es así porque las características estructurales de los productos naturales y los derivados que se pueden obtener partiendo de ellos, se encuentran diferenciadas de los compuestos completamente sintéticos. Ejemplos de estas diferencias se encuentran en el número de centros estereogénicos, de heteroátomos, o de ciclos (cantidad y tipo) que poseen ambas clases de compuestos.<sup>2,4-7</sup>

Por lo tanto, es relevante tener conocimiento de la reactividad de los productos naturales y de su preparación, no sólo desde un punto de vista estrictamente básico, sino que tal conocimiento es fundamental en la obtención de derivados de interés con aplicaciones para diversos fines, como los que se han mencionado previamente.

A la fecha, es sabido que la complejidad de los sistemas biológicos deriva en una alta sensibilidad de respuesta a variaciones estructurales de moléculas huéspedes, incluso frente a cambios aparentemente mínimos en la estereoquímica.<sup>8</sup> De esa manera, las propiedades farmacológicas, farmacocinéticas y toxicológicas de estereoisómeros pueden ser muy diferentes. El impacto de la estructura en la actividad biológica se ha visto reflejado en casos extremos, como el de la talidomida, empleada como antiemético para mujeres embarazadas, que tuvo como consecuencia teratogénesis en los fetos; sin embargo, también hay otros ejemplos menos drásticos, como el de citolapram, en el que los dos enantiómeros tienen efecto antidepresivo, pero el enantiómero *S*- es el más activo; o casos sin importancia, como el de ipalcrim, un antibacteriano cuyos dos enantiómeros poseen la misma actividad.<sup>9,10</sup>

De cualquier manera, la identificación de la estructura de un compuesto y la correcta asociación con su actividad biológica es una labor fundamental, dada la selectividad que existe en



los organismos vivos; además del interés en el conocimiento de la estructura, actividad, reactividad y síntesis de los productos naturales, que tiene impacto en distintas áreas.

En este trabajo se llevó a cabo la exploración de la reactividad de productos naturales selectos así como preparación de derivados y su evaluación biológica. Las especies vegetales que producen estos metabolitos selectos son apreciadas en la etnomedicina del país.

Se realizaron transformaciones de una ftálica de *Ligusticum porteri*, y se preparó, a partir de ésta, otra ftálica natural aislada de *L. walichii*, la cual posee actividad como progestina, corrigiendo la estructura con la que fue originalmente informada por Yong y colaboradores.

Adicionalmente, se obtuvo una serie de derivados de sesquiterpenos obtenidos de *Heterotheca inuloides*, análogos de un disesquiterpenoide encontrado en esa planta con una actividad antiinflamatoria destacada, aportando conocimiento original sobre la ruta en que podría ocurrir su biogénesis, además de contribuir al entendimiento de la reactividad particular de este tipo de sesquiterpenos.

## 2. ANTECEDENTES

Las plantas conocidas como oshá y árnica mexicana son dos especies vegetales valoradas en el país por su uso medicinal tradicional. En los siguientes apartados se hará una breve descripción de los usos de esas plantas, sus componentes químicos, así como la estructura, reactividad y bioactividad de estos.

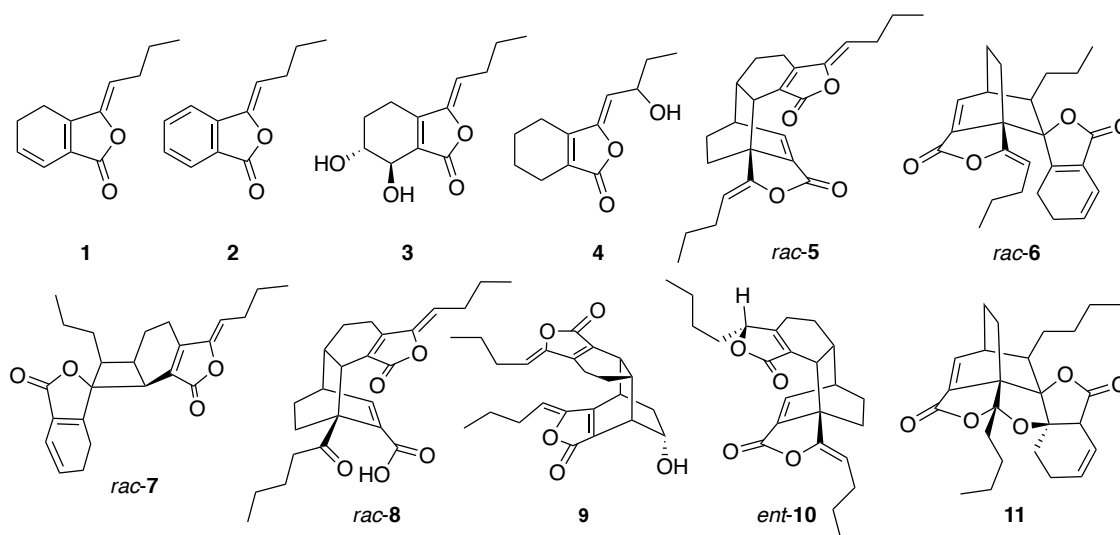
### 2.1. Metabolitos de *Ligusticum porteri*

*Ligusticum porteri* (Apiaceae), conocida como oshá, chuchupate, yerba del cochino, entre otros nombres, es una planta utilizada en la medicina tradicional de los rarámuris en el norte de México y por otras etnias en el sur de Estados Unidos.<sup>11-13</sup> Se emplea en diversas preparaciones para el tratamiento de diarrea, cólicos y otros padecimientos gastrointestinales, así como para padecimientos de vías respiratorias, como resfriado, bronquitis y neumonía, e incluso en el tratamiento de diabetes.<sup>13</sup>

Otras especies de esta familia son utilizadas en la medicina tradicional alrededor del mundo, por ejemplo, *L. chuanxiong*, empleada en China en preparaciones contra la migraña, derrames cerebrales, y accidentes cardiovasculares, entre otros; *L. sinense*, también es empleada en la medicina tradicional china para resfriado y aliviar el dolor; y *L. officinale*, que se usa en Japón como remedio para la anemia.<sup>14</sup>

Los metabolitos secundarios marcadores de ciertos grupos de plantas la familia Apiaceae son las ftálicas, un tipo de compuestos con esqueleto de isobenzofuranona, que pueden ser monoméricos o diméricos (homo- o hetero- diméricos). Las ftálicas monoméricas aisladas de plantas de la familia Apiaceae generalmente se encuentran sustituidas en la posición 3 –aunque las provenientes de hongos y de otras fuentes naturales no necesariamente tienen ese tipo de sustitución–; mientras que las ftálicas diméricas pueden provenir de cicloadiciones  $[\pi 2_s + \pi 2_s]$  o  $[\pi 4_s + \pi 2_s]$ .<sup>15-17</sup> Incluso hay ejemplos escasos de ftálicas triméricas derivadas también de este tipo de cicloadiciones.<sup>18</sup>

De *L. porteri* se han aislado ftálicas como (*Z*)-ligustílida (**1**), (*Z*)-butilidenftálica (**2**), senkyunólidas I (**3**) y F (**4**) y las ftálicas diméricas diligustílida (*rac*-**5**), toquinólida B (*rac*-**6**), riligustílida (*rac*-**7**).<sup>19-22</sup> De otras especies de la familia también se han aislado los compuestos **1**–*rac*-**7** y otras ftálicas, como walichílida (**8**) de *L. wallichii*;<sup>23</sup> chuanxiongólida A (**9**) y *ent*-**10** de *L. chuanxiong*;<sup>24,25</sup> chaxiongnólida B (**11**) de *L. sinense* cv. *chaxiong*.<sup>26</sup> (Ver Figura 1).



**Figura 1.** Algunas ftálicas aisladas de plantas de la familia Apiaceae

Los resultados de los estudios de la bioactividad de las ftálicas obtenidas de plantas de la familia Apiaceae con uso etnomédico, sugieren la posible existencia de correspondencia entre la actividad de estos metabolitos y los usos tradicionales de esas plantas.

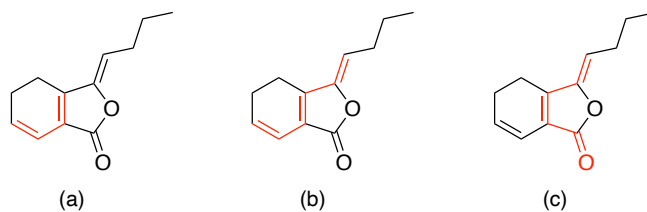
En cuanto al uso para padecimientos gastrointestinales, se ha encontrado que las ftálicas **1** y **4** poseen actividad relajante del músculo liso;<sup>22</sup> **1** y **3** tienen actividad antinociceptiva;<sup>27</sup> por otro lado, la ftálica *rac*-**5** tiene actividad gastroprotectora.<sup>28</sup>

El uso de *L. porteri* para el tratamiento de diabetes puede tener relación con la actividad hipoglucémica y antihiper glucémica de sus extractos, así como la actividad antihiper glucémica de butilidenftálica (**2**).<sup>29</sup>

La actividad sedante de los compuestos **1** y **4** podría guardar relación con el uso ritual que se le atribuye a esa planta.<sup>22</sup>

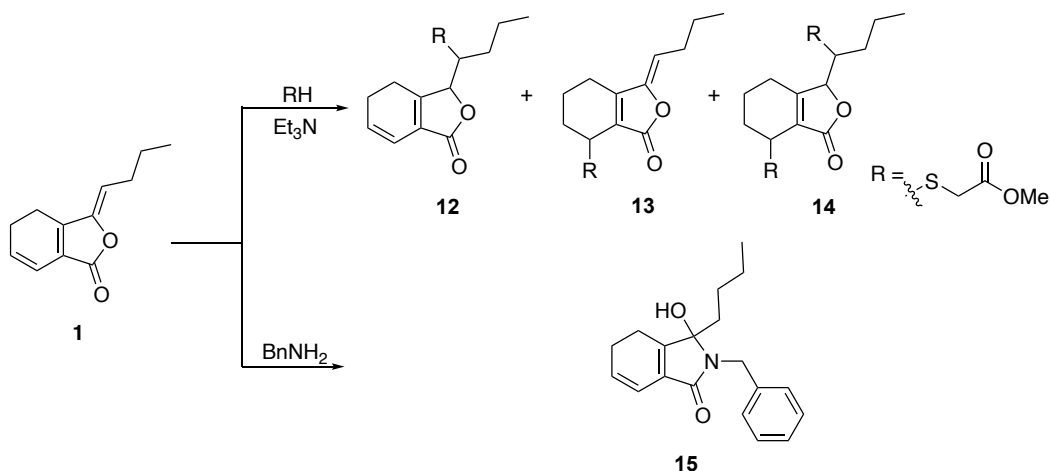
Para encontrar una posible explicación sobre el empleo de la planta *L. chuanxiong* para ciertas condiciones ginecológicas, se hizo un estudio biodirigido de sus constituyentes químicos, con base en su bioactividad progestacional. Un hallazgo importante fue la actividad destacada de **10**, determinada por medio de un ensayo de gen reportero. En este, se observó que la ftálida interactúa con el receptor de progesterona con una concentración efectiva media semejante a la de progesterona. A pesar del hallazgo significativo en términos de su actividad, existe duda sobre la asignación estructural del compuesto bioactivo, debido a que la misma estructura se le asignó a un compuesto preparado previamente por semisíntesis (*vide infra*),<sup>25</sup> pero las constantes espectroscópicas de ambos compuestos difieren, sugiriendo la asignación incorrecta para uno u otro compuesto.

En cuanto a la reactividad de ftálidas, (*Z*)-ligustílida (**1**) ha sido ampliamente estudiada. A partir de la observación de su estructura, se encuentra que tiene varias posibilidades de reactividad: un ciclohexadieno conjugado (Figura 2a), un trieno conjugado (Figura 2b), un carbonilo  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturado, dentro de un anillo de  $\gamma$ -lactona con metileno exocíclico (Figura 2c), lo que la hace propensa a reaccionar de diferentes maneras y explica su reactividad.



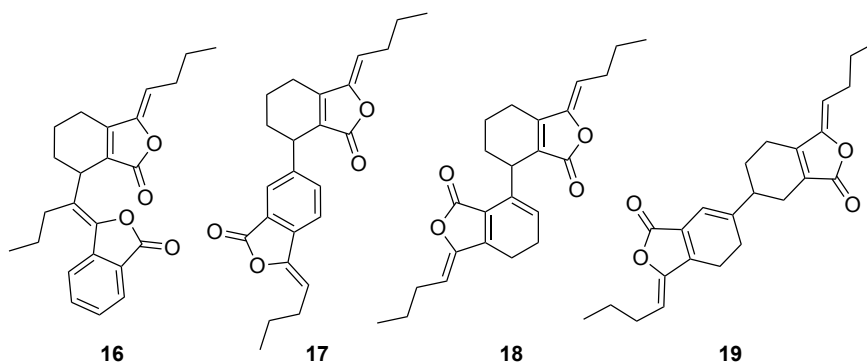
**Figura 2.** Sitios reactivos de (*Z*)-ligustílida (**1**)

La reactividad como electrófilo de **1** fue analizada (Esquema 1) y se encontró que reacciona según la blandura del nucleófilo empleado. El tioglicolato de metilo se adiciona a los dobles enlaces conjugados para obtener los productos **12-14**; mientras que bencilamina, un nucleófilo más duro, se adiciona al carbonilo de **1** (también un electrófilo más duro), para la obtención de la lactama **15**.<sup>30</sup>



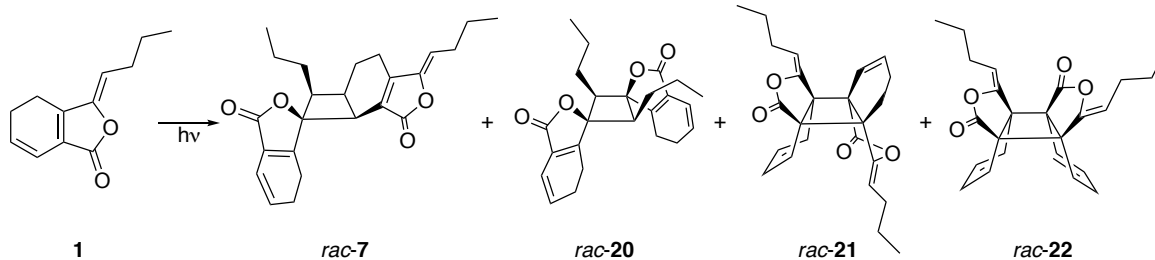
**Esquema 1.** Adiciones de nucleófilos a (*Z*)-ligustílida (**1**)

La presencia de un ciclohexadieno homoanular conjugado, y de dobles enlaces, hacen al compuesto **1** propenso a llevar a cabo cicloadiciones de Diels-Alder. Las ftálicas diméricas *rac-5* y *rac-6* se han obtenido al someter ese compuesto a reacción en condiciones térmicas.<sup>31,32</sup> Por otro lado, cuando la reacción se intentó en presencia de ácidos de Lewis se obtuvieron las ftálicas diméricas “lineales” **16-19** (mostradas en la Figura 3), en lugar de los cicloaductos esperados. Es decir, los ácidos de Lewis favorecieron adiciones por medio de mecanismos iónicos, en lugar de catalizar la cicloadición  $[\pi 4_s + \pi 2_s]$ .<sup>33</sup>



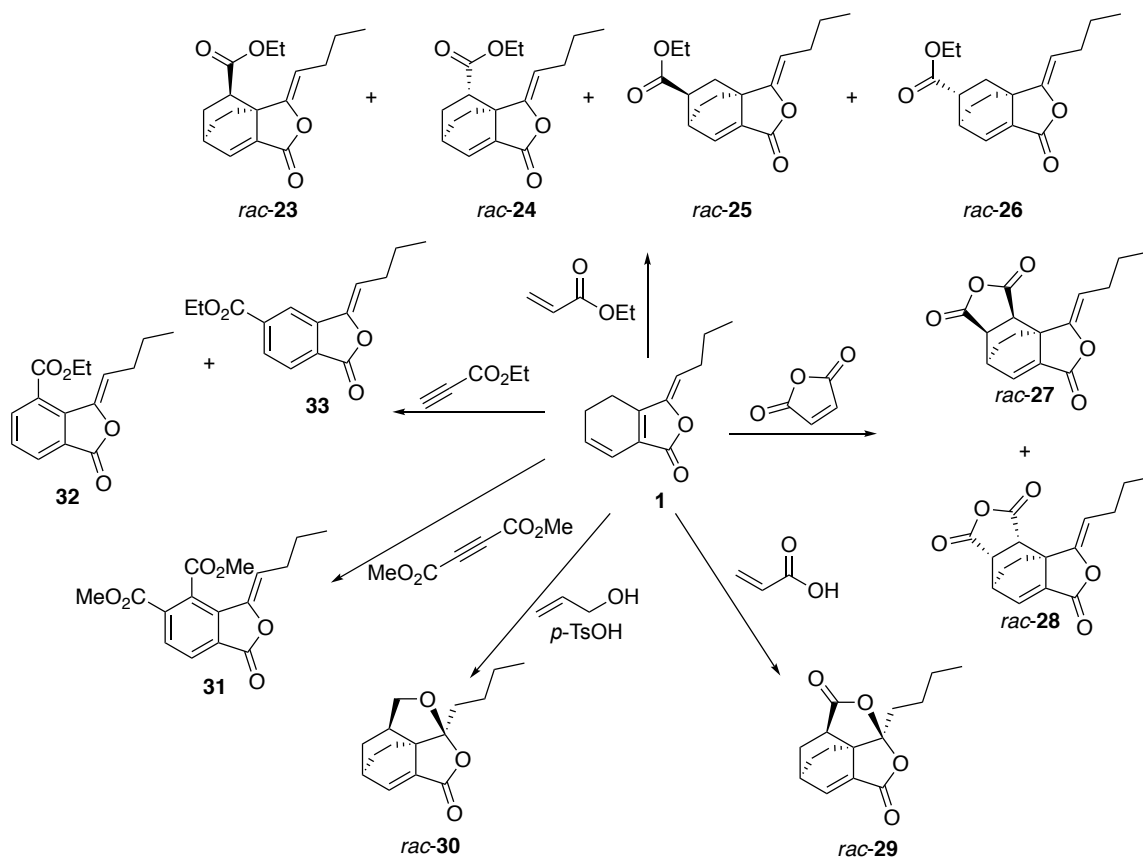
**Figura 3.** Dímeros lineales de (*Z*)-ligustílida (**1**)

Por otro lado, los dobles enlaces también han permitido la obtención de las ftálicas *rac-7* y *rac-20- rac-22*, por medio de cicloadiciones tipo  $[\pi 2_s + \pi 2_s]$  en condiciones fotoquímicas, como se muestra en el Esquema 2.<sup>34</sup>



**Esquema 2.** Cicloaductos  $[\pi 2 + s \pi 2_s]$  de (*Z*)-ligustílida (**1**)

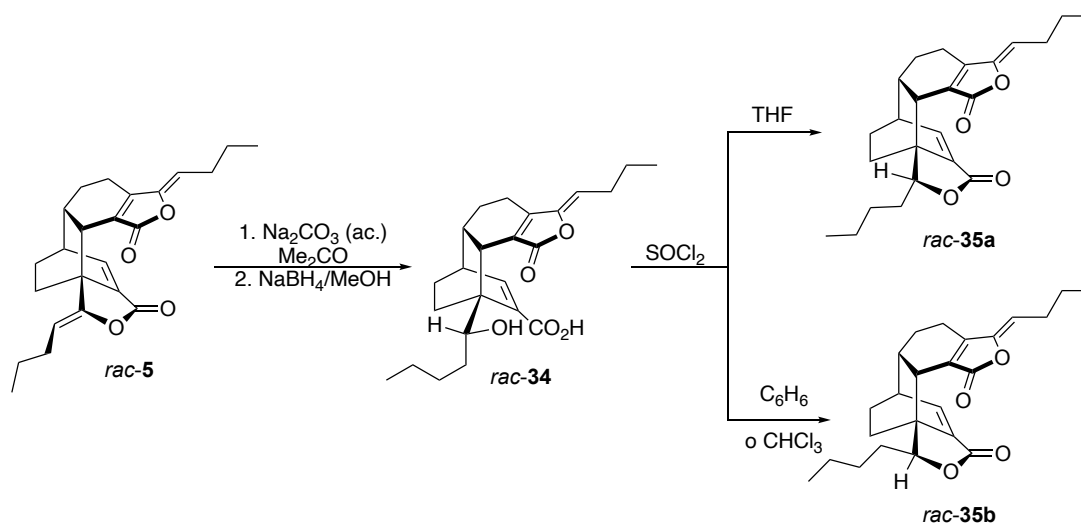
En condiciones térmicas, se obtuvieron los cicloaductos  $[\pi 4_s + \pi 2_s]$ : las ftálidas naturales *rac-5* y **6**, cuando **1** reacciona como dieno y dienófilo y los productos **23–33** cuando se le hace reaccionar con otros dienófilos (Esquema 3).<sup>31,32</sup>



**Esquema 3.** Cicloaductos de Diels-Alder de (*Z*)-ligustílida (**1**)

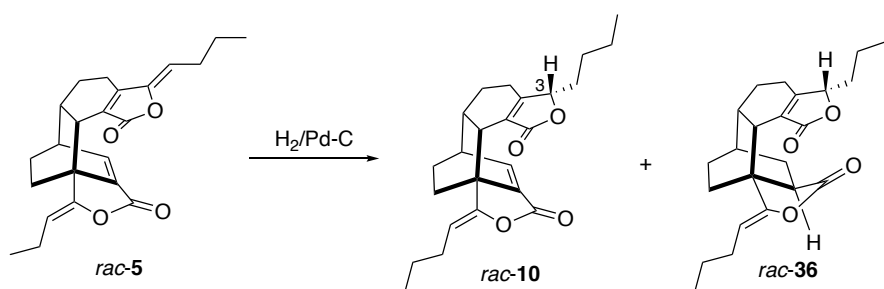
La reactividad de las ftálidas diméricas también se ha estudiado. Por ejemplo, se llevó a cabo la hidrólisis, reducción y deshidratación dependiente del disolvente de la ftálida *rac-5*,<sup>19,32</sup> lo que

permitió una reducción estereodiferenciada, ya que en estas condiciones sólo uno de los dos dobles enlaces de las cadenas laterales de la ftálica se redujo, lo que condujo a la identificación de la estructura correcta de un metabolito de *L. wallichii*, que corresponde a **35a**; además, cambiando el disolvente empleado para la ciclación, fue posible obtener su epímero (ver Esquema 4).<sup>35</sup>



**Esquema 4.** Reactividad de diligustílida (*rac-5*) y reasignación estructural de **35**

Por otro lado, se pudo reducir selectivamente 1 de los 4 dobles enlaces por medio de la hidrogenación catalítica de diligustílida (**5**), obteniendo *rac-10* (70 %), y *rac-36* (10 %) debido a una reducción subsecuente (Esquema 5). Es notable que, posteriormente, la estructura de **10** se le asignó a un compuesto aislado de *L. chuanxiong* y se encontró que posee una actividad progestacional notable, del mismo orden de magnitud que la progesterona (*vide supra*).<sup>25</sup> Sin embargo, las constantes espectroscópicas del producto natural y del producto de semisíntesis difieren, lo que es indicativo de que una de las dos estructuras fue incorrectamente asignada.



**Esquema 5.** Hidrogenación catalítica de diligustílida (*rac-5*)

De ese modo, resulta que a la misma estructura se han atribuido diferentes constantes espectroscópicas, por lo que la estructura del producto natural y el producto semisintético no se encuentran claramente definidas. Es importante mencionar que la diferencia más notable es la señal del hidrógeno enlazado a C3, que se encuentra desplazado a  $\delta_H$  4.80 para el producto natural, mientras que la señal correspondiente del producto semisintético está en  $\delta_H$  4.54, por lo que es probable que estos compuestos sean epímeros en C3.

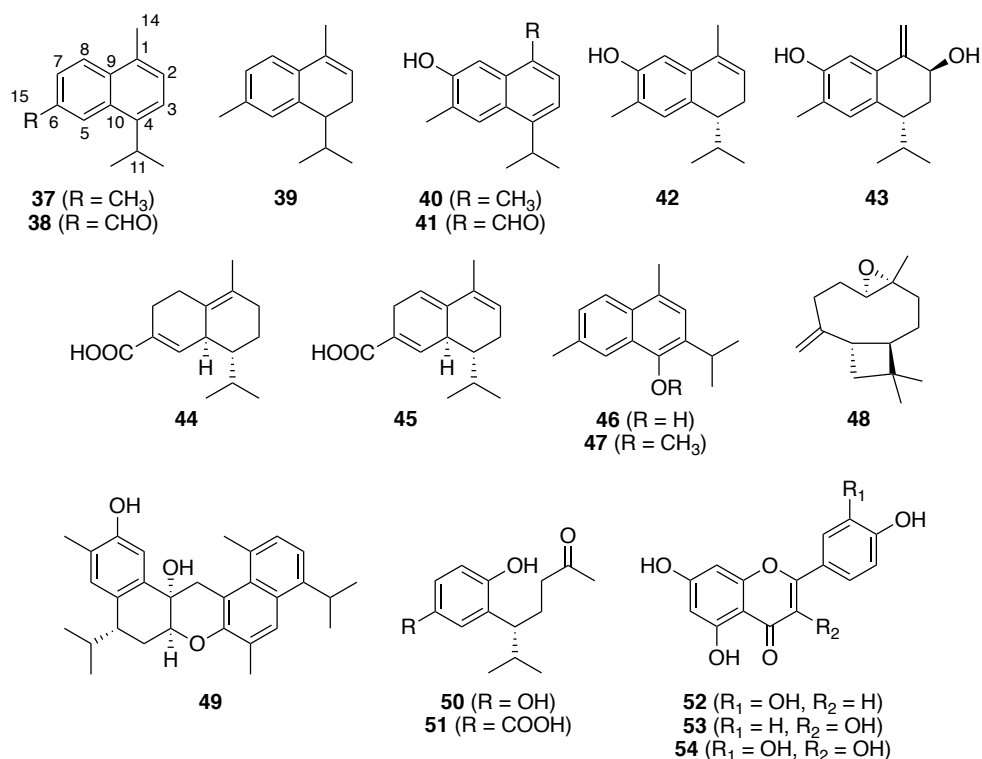
Es interesante notar que algunas ftálicas diméricas fueron preparadas por semisíntesis, incluso antes de haber sido aisladas como producto natural, por ejemplo, chaxiognólida B (**11**)<sup>26,36</sup> y **22**.<sup>34,37</sup>

## 2.2. Metabolitos de *Heterotheca inuloides*

*Heterotheca inuloides* (Asteraceae) es una planta que pertenece al complejo conocido como “árnica mexicana” y su uso tradicional es muy variado. Ejemplos de ello es el uso para el tratamiento de heridas externas y sin curar, internas y postoperatorias, padecimientos gastrointestinales, dolores musculares, entre otros.<sup>38,39</sup>

Esta especie es una fuente de una diversidad importante de fitoquímicos.<sup>39</sup> Se han aislado principalmente sesquiterpenos como cadaleno (**37**), ácido 15-cadalenoico (**38**), calacoreno (**39**), 7-hidroxicadaleno (**40**), 7-hidroxicadelan-14-al (**41**), 3,4-dihidro-7-hidroxicadaleno (**42**), inuloidina (**43**), ácido (4*R*,10*S*)- $\delta$ -cadinen-15-oico (**44**), ácido (4*R*,10*S*)-3,4,7,10-tetrahidrocadalen-15-oico (**45**), 4-hidroxiisocadaleno (**46**), 4-metoxiisocadaleno (**47**) y epóxido de  $\beta$ -cariofileno (**48**).<sup>40-45</sup> También se han aislado el sesquiterpeno dimérico dicadalenol (**49**)<sup>44</sup> y los secocadinanos **50** y **51**;<sup>46</sup> además de flavonoides, como luteolina (**52**), kampferol (**53**) y quercetina (**54**), y triterpenos. Los compuestos **40**, **42** y **54** son metabolitos mayoritarios de *H. inuloides*.





**Figura 4.** Metabolitos de *Heterotheca inuloides*

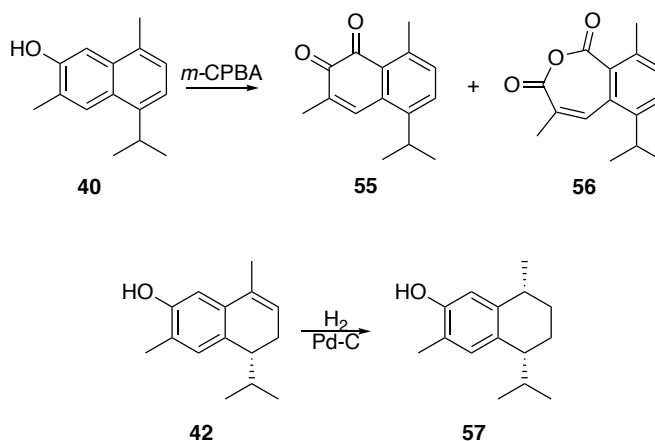
Es conveniente aclarar que la estructura de **49** se informó como su enantiómero en la publicación original,<sup>44</sup> sin embargo, en este trabajo se utiliza la representación de la Figura 4, considerando que posteriormente se ha hallado que los cadinanos aislados de *H. inuloides* tienen configuración 4*R* (es decir, tienen orientación del isopropilo *alfa*).<sup>45,47,48</sup>

Estos compuestos han mostrado tener actividad antioxidante por quelación con metales de transición,<sup>49</sup> citotóxica,<sup>50</sup> anti *Helicobacter pylori*.<sup>51</sup>

Es destacable la actividad antinociceptiva de 3,4-dihidro-7-hidroxicadalenol (**42**), probada en la prueba de formalina. En la primera fase del ensayo, **42** fue más potente (CE<sub>30</sub> = 73.8 ± 29.5 microgramos/pata) y efectivo que el control (diclofenaco), que no mostró actividad; en la segunda fase, ambos compuestos tuvieron actividad comparable.<sup>52</sup> Por otro lado, la actividad antiinflamatoria de algunos metabolitos de *H. inuloides* fue probada en el modelo de inflamación auricular murina inducida por ATF, y se encontró que dicadalenol (**49**) (DE<sub>50</sub> = 0.11 mg/ oreja) tuvo mayor efecto inhibitorio del edema que el control (indometacina 0.18 mg/oreja).<sup>44</sup> Estos hallazgos muestran una

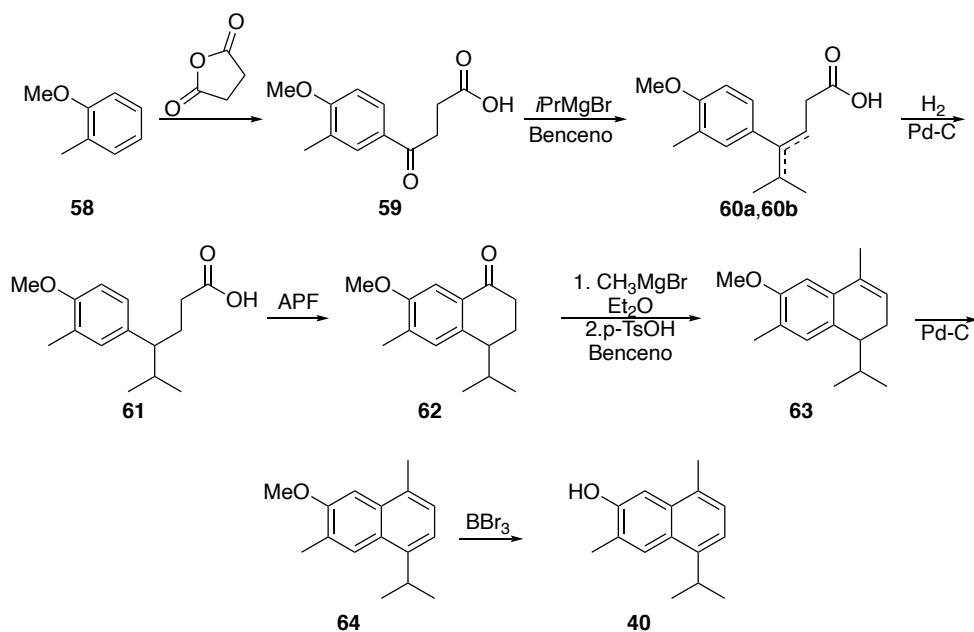
posible correlación entre el uso tradicional de esta planta y las actividades biológicas de sus metabolitos.

La reactividad de los cadinanos de *H. inuloides* se ha estudiado (ver Esquema 6). Se han preparado algunos compuestos semisintéticos: la dicetona **55** y el anhídrido **56** por oxidación de **40** con ácido *m*-cloroperbenzoico;<sup>50</sup> y el compuesto **57** a partir de hidrogenación de **42**,<sup>53</sup> así como ésteres y carbamatos derivados de estos productos naturales.<sup>54</sup>



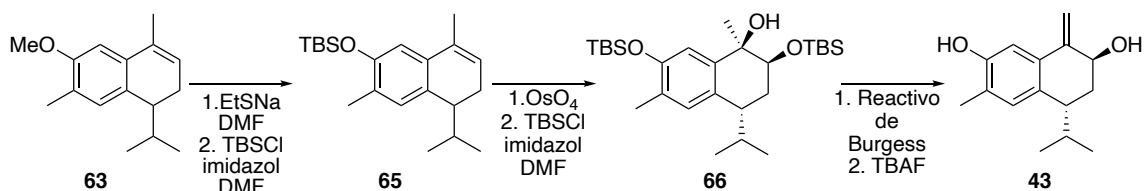
**Esquema 6.** Reactividad de **40** y **42**

El eter metílico racémico **63** se preparó por medio de una acilación de *O*-metilanol (**58**) con anhídrido succínico, dando el cetoácido **59**, que fue alquilado y deshidratado mediante la reacción Grignard, para formar la mezcla de ácidos **60a** y **60b** (que difieren sólo por la localización del doble enlace). Esta mezcla se hidrogenó y el ácido **61** fue ciclado, dando lugar al compuesto **62**, que después de una alquilación y una deshidratación, resultó en el cadinano protegido **63**. A partir de éste se obtuvo **40** por deshidrogenación y desprotección.<sup>55</sup> Esta secuencia de reacciones se ilustra en el Esquema 7.



**Esquema 7.** Preparación de análogo de éter de **42** (**63**) y síntesis total de **40**

Como se puede observar en el Esquema 8, partiendo también de **63** se obtuvo inuloidina (**43**): primero se obtuvo el cadinano protegido con TBS (**65**), que se dihidroxiló y protegió para tener **66**; el diastereómero adecuado fue deshidratado y desprotegido para dar **43**.<sup>48</sup>



**Esquema 8.** Preparación de inuloidina (**43**)

A pesar de la diversidad de estudios que se han llevado a cabo sobre la reactividad de los sesquiterpenos, los compuestos mayoritarios de *H. inuloides*, 7-hidroxicadalenol (**40**) y 3,4-dihidro-7-hidroxicadalenol (**42**), no se han utilizado para la preparación de dicadalenol (**49**), no obstante que se puede observar que éste es un aducto modificado de aquellos compuestos; además, **49** no ha sido reaislado ni sintetizado, por lo que el estudio de sus propiedades biológicas o de sus análogos tampoco se ha continuado.

Sobre este compuesto es importante mencionar que, además de su bioactividad destacada en el ensayo de inflamación en modelo auricular murino, es uno de los pocos ejemplos de disesquiterpenos del tipo cadinanoide, con una arquitectura molecular muy particular que lo hace aún menos común. De esa manera, los estudios tendientes a su preparación merecen ser realizados por su interés sintético, además del posible aporte que pudieran realizar desde el punto de vista biogénico.

### **2.3. Resistencia a múltiples fármacos**

La resistencia a múltiples fármacos es un problema de salud pública que deriva en dificultad para el tratamiento de cáncer y de diversas enfermedades infecciosas causadas por microorganismos.<sup>56,57</sup>

Existen una variedad de mecanismos por medio de los cuales las células y agentes patógenos pueden desarrollar resistencia, por ejemplo, mutación del receptor del fármaco, su metabolismo, disminución de su consumo, aumento de su eflujo (transporte desde el interior hacia el exterior celular).<sup>56,58</sup>

Los dos últimos mecanismos mencionados se basan en la disminución de la concentración intracelular del fármaco, que en última instancia se traducen en una menor toxicidad, puesto que en esas condiciones el microorganismo o célula está en condiciones de disminuir la apoptosis, reparar el ADN y detoxificarse. Es por eso que disminuir el eflujo del fármaco es una de las principales estrategias para lidiar con la resistencia.<sup>56,58</sup>

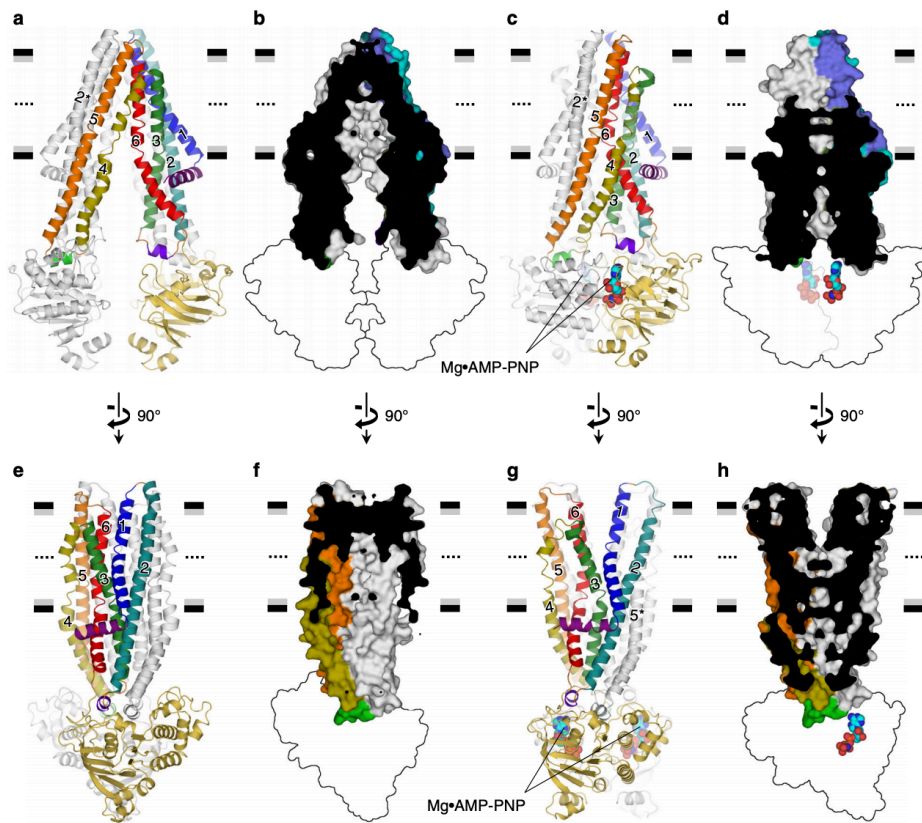
Para el transporte de sustancias desde o hacia el interior de las células existen cuatro tipos de proteínas, entre las que se encuentran las bombas dependientes del ATP. Un subtipo de estas proteínas son las proteínas ABC (*ATP binding cassette*), que dependen de la unión de ATP en ciertos dominios para que se lleve a cabo su función de transporte.<sup>59</sup>

Estas proteínas tienen, en general, una estructura formada por dominios transmembranales (TMD) y dominios a los que se une el ATP (NBD). El sustrato es expulsado a través de canales

formados por los dominios transmembranales, una vez que se producen cambios conformacionales promovidos por la unión e hidrólisis de ATP. Se clasifican en subfamilias en función del número y tipo de sus dominios TMD y NBD.<sup>57,59</sup>

La glucoproteína P (gp-P o MDR1, *Multidrug Resistance Protein 1*) es un transportador que pertenece a la subfamilia B de los ABC, que se ha asociado con la resistencia a múltiples fármacos y cuya regulación es una de las principales estrategias para combatir la resistencia basada en el eflujo de fármacos.<sup>57-59</sup>

Como se muestra en la Figura 5, la MDR1 está integrada por dos TMD y dos NBD.



**Figura 5.** Modelo de estructura de gp-P.

(a, b, e y f) Muestra el canal formado por la proteína abierto hacia el citoplasma. (c, d, g y h) Se muestra la proteína en conformación abierta hacia el espacio extracelular. Ilustración tomada de Kato 2019.

Esencialmente, el funcionamiento de la gp-P consiste en que basalmente el canal formado por sus TMD se encuentran cerrados en la parte extracelular; en presencia de un sustrato, hay un cambio conformacional (dependiente de ATP y de la presencia del catión  $Mg^{2+}$ ) que deriva en la apertura del canal en su parte exterior, permitiendo la expulsión del sustrato.<sup>57-60</sup>

Existen reportes de diversos productos de origen natural que modulan la resistencia mediada por gp-P.<sup>61,i</sup>

También se ha informado sobre una gran variedad de sesquiterpenos que disminuyen la resistencia en células y microorganismos, por medio de la inhibición de la gp-P.<sup>62-65</sup> Incluso, hay estudios que demuestran que ciertos sesquiterpenos diméricos del tipo cadinano revirtieron la resistencia a doxorrubicina en células MCF-7 resistentes, lo que hace viable el estudio de sesquiterpenos de *H. inuloides* y sus análogos en la búsqueda de agentes moduladores de la resistencia a múltiples fármacos.

---

<sup>i</sup> En el laboratorio se inició la exploración de esta propiedad de una variedad de productos naturales. Los resultados preliminares han indicado que algunos cadinanos poseen actividad sobresaliente.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La diversidad vegetal es una fuente importante de productos naturales, cuyo estudio es pertinente en un país considerado megadiverso, como México, para el adecuado aprovechamiento de sus recursos.

El conocimiento de la estructura, reactividad y síntesis de los productos naturales, es relevante considerando la variedad estructural a la que se puede tener acceso partiendo de ellos, e igualmente relevante su impacto en otras áreas, como el desarrollo de metodología sintética, e incluso, además de la química básica, en la industria, como la farmacéutica, la agrícola, de alimentos, de cosméticos, etcétera.

Por otro lado, es importante asociar correctamente la estructura de los compuestos con su bioactividad, considerando a la alta especificidad que existe en el fenómeno de reconocimiento molecular (huésped - receptor) en la maquinaria bioquímica de los seres vivos, particularmente para usos terapéuticos.

En ese sentido, es de interés la correcta identificación de la estructura de la ftálica con actividad progestacional destacada que se mencionó con anterioridad (presumible estructura *rac-10*, Esquema 5, pág. 18), debido a la sensibilidad de los sistemas biológicos (proteínas) a los cambios estereoquímicos de las estructuras huéspedes. Por lo tanto, para asignar adecuadamente la actividad de la ftálica y la estructura del compuesto bioactivo, es conveniente llevar a cabo la experimentación conducente a confirmar o corregir la estructura de la ftálica bioactiva.

De la misma manera, se consideró conveniente realizar la preparación de análogos de dicadalenol (**49**), un compuesto natural aislado de *H. inuloides* con actividad antiinflamatoria destacada, partiendo de otros productos naturales, y eventualmente conocer el cambio en la actividad biológica en función de los cambios estructurales, permitiendo un avance, en lo posible, en la optimización de un compuesto activo.

En otro orden de ideas, considerando la relevancia del problema de la resistencia a fármacos en células cancerosas y el potencial de los productos naturales para revertirla, es conveniente llevar a cabo una exploración de este tipo de actividad de productos naturales selectos, así como de los análogos que se obtengan, en la búsqueda de nuevos agentes que logren sensibilizar células resistentes a múltiples fármacos.



#### 4. OBJETIVOS

Generar conocimiento sobre la química y bioactividad de productos naturales de dos especies utilizadas en la medicina tradicional mexicana (*L. porteri* y *H. inuloides*) y derivados, mediante los siguientes objetivos particulares:

- Aislar diligustólida (*rac-5*) de *L. porteri* y 7-hidroxicadalenol (**40**) y 3,4-dihidro-7-hidroxicadalenol (**42**), presentes en *H. inuloides*.
- Explorar la reactividad química de los compuestos naturales *rac-5*, **40** y **42**.
- Semisintetizar el esqueleto del producto natural dicadalenol (**49**) partiendo de **40** y **42**.
- Obtener otros análogos de dicadalenol para obtener diversidad estructural, empleando reacciones similares a las de la obtención del esqueleto del producto natural.
- Realizar la hidrogenación catalítica de *rac-5* para reestudiar la estereoquímica de la reacción.
- Llevar a cabo la aclaración estructural del compuesto de hidrogenación y el aislado de *L. chuanxiong* por medio de semisíntesis.
- Explorar la actividad *in vitro* e *in silico* de las ftálicas semisintéticas obtenidas a partir de *rac-5* como progestinas y correlacionar ambos resultados.
- Llevar a cabo una exploración *in vitro* (con células de sarcoma uterino resistentes) e *in silico* de la actividad de productos naturales selectos y derivados en la modulación de la glucoproteína P.

## 5. HIPÓTESIS

- a. En relación con las ftálicas de *L. porteri*.

El compuesto *rac*-**10** fue obtenido por medio de hidrogenación catalítica de diligustílida (aislada de *L. porteri*), cuyo curso estereoquímico indica que su estructura es correcta; además, las diferencias en las señales de RMN <sup>1</sup>H con el producto natural informado de *L. chuanxiong*. Por lo tanto, es posible que este compuesto natural corresponda al epímero en C3 de **10**. Además, dada la semejanza estructural entre los dos compuestos mencionados, es posible que éste también posea actividad biológica progestacional.

- b. En relación con los cadinanos de *H. inuloides*.

Debido a que del análisis retrosintético del dicadalenol (**49**) se observa que es un compuesto formado por la condensación de derivados de **40** y **42**, aislados de *H. inuloides*, es posible la preparación del esqueleto de dicadalenol y sus análogos partiendo de los metabolitos mayoritarios de la planta (**40** y **42**).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Dihidrodiligustílida

Se llevó a cabo el fraccionamiento de material vegetal de *L. porteri* (8.1 kg) de acuerdo con el procedimiento previamente descrito en la literatura<sup>22</sup> y se obtuvo una mezcla (17.1 g) de (*Z*)-ligustílida (**1**), (*Z*)-butilidenftálida (**2**), y los compuestos puros diligustílida (*rac*-**5**, 1.6 g), toquinólida B (*rac*-**6**, 5.8 g) y riligustílida (*rac*-**7**, 3.7 g).

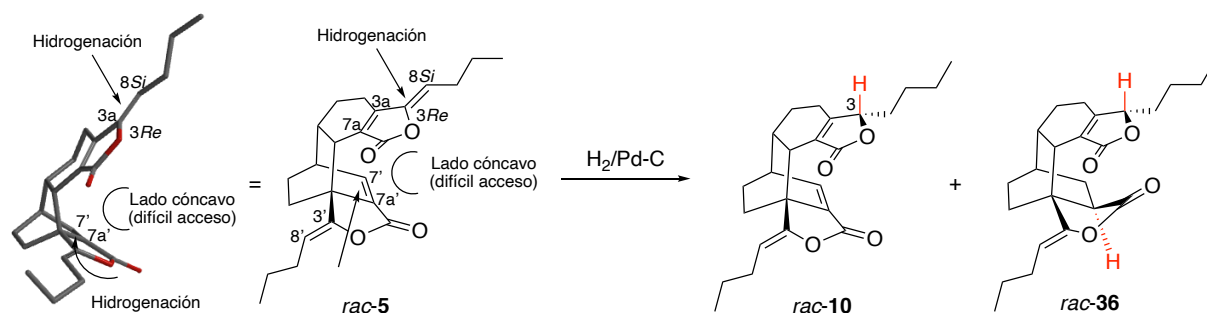
La hidrogenación catalítica de la ftálida dimérica *rac*-**5** se llevó a cabo previamente en este grupo, obteniendo los derivados dihidro- y tetrahidrohidrogenados.<sup>19</sup> En relación con el dihidroderivado, se informaron sus constantes espectroscópicas; específicamente en RMN <sup>1</sup>H, se informó una señal múltiple en  $\delta_H$  4.54, correspondiente al hidrógeno unido al carbono base de oxígeno C3.

Entonces, la asignación estructural de *rac*-**10** fue llevada a cabo en 1988 por este grupo de investigación y es contraria al reporte del grupo de Yong en 2006. Por lo que estudios espectroscópicos con RMN modernos pueden aclarar esta inconsistencia en la literatura, cuya relevancia es más significativa, tomando en consideración la actividad del producto natural.

De modo que, con el objetivo de llevar a cabo la aclaración estructural, en este trabajo se reestudió la reacción de hidrogenación catalítica (Pd-C 10%) de *rac*-**5**. Se observó que la reacción dio lugar a dihidrodiligustílida (*rac*-**10**) y tetrahidrodiligustílida (*rac*-**36**) (Esquema 9).

La estereoquímica de la adición de los productos obtenidos se explica debido a que las estereocaras de los dobles enlaces que se hidrogenan (C3-C8 y C7'-C7a') no son igualmente accesibles. Efectivamente, la hidrogenación, que se lleva a cabo por contacto, ocurre por las caras (3*Re*, 8*Si*) y (7'*Si*, 7a'*Si*), que apuntan hacia la parte convexa de la molécula. Las otras caras de ambos enlaces se encuentran en la concavidad que se forma por la fusión del biciclo [2,2,2] con una unidad de ftálida, lo que impide el contacto con la superficie del catalizador heterogéneo.

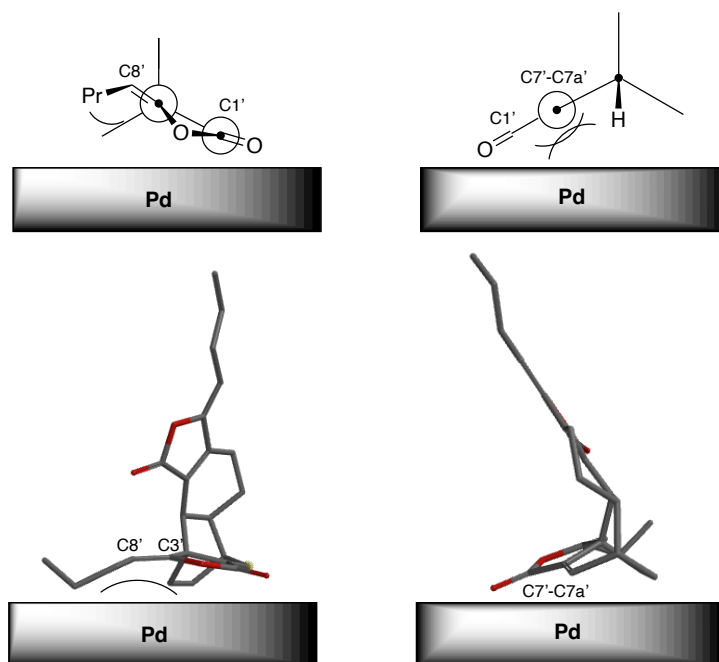
La hidrogenación procede de con total diastereoselectividad. Esto se explica por la disposición espacial de los ciclos unidos al biciclo central [2.2.2]. Estos forman una estructura curva con una parte cóncava, difícil de acceder y la otra convexa, de fácil aproximación. Lo anterior se ilustra en el Esquema 9.



**Esquema 9.** Estereoquímica de la hidrogenación de *rac-5*

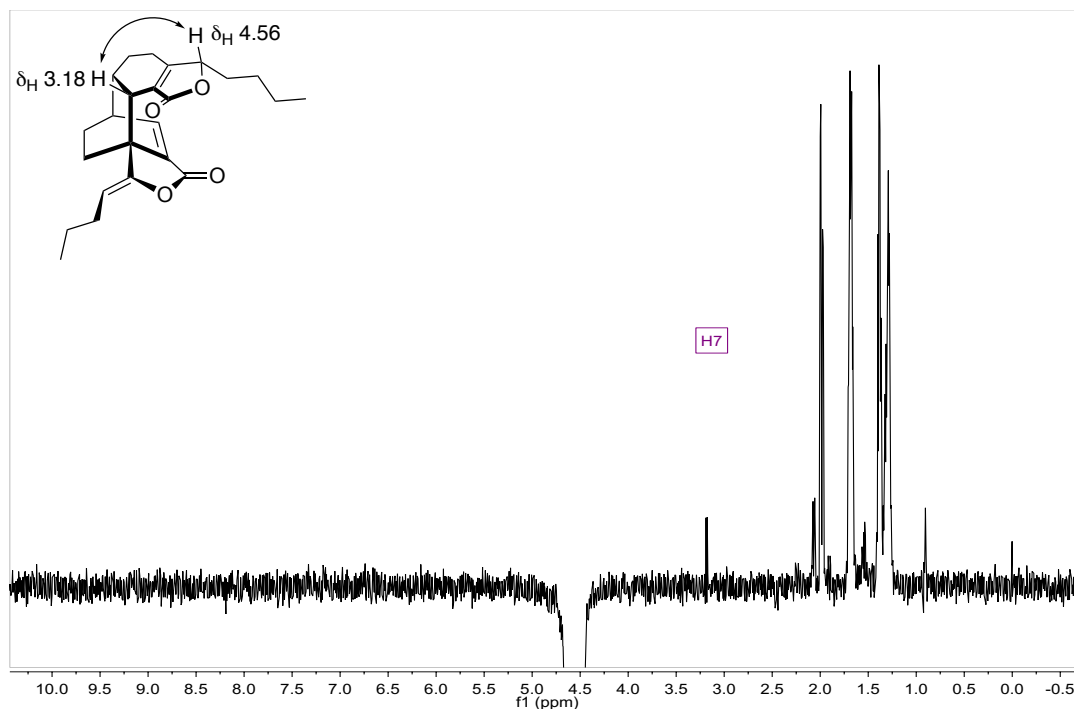
La mayor reactividad del doble enlace C3-C8, en relación con el C7'-C7a', se puede explicar debido a la mayor disponibilidad espacial de aquél. Es decir, la olefina C7'-C7a' se encuentra en el biciclo [2.2.2], que se encuentra fusionado por un lado con el otro monómero de la ftálica y con un anillo de lactona, por lo que estos sustituyentes adicionales ocasionan mayor impedimento para el contacto necesario para que se lleve a cabo la hidrogenación. En ese mismo orden de ideas, el enlace C3-C8 es exocíclico y el C7'-C7a' es endocíclico, lo que también hace más reactivo al primero, por disponibilidad. Adicionalmente, el aporte electrónico por resonancia del oxígeno de la lactona aumenta la densidad electrónica del mismo enlace, aumentando su reactividad hacia la hidrogenación; mientras que el enlace C7'-C7a' está desactivado por la conjugación con el carbonilo, lo que también disminuye su reactividad hacia la hidrogenación.

Por otro lado, los dobles enlaces C3a-C7a y C3'-C8' no se hidrogenaron. El primero, por ser tetrasustituido; y la baja reactividad del último se puede atribuir a la protección ocasionada por el biciclo [2,2,2], que impide el acercamiento del doble enlace a la superficie metálica. Esta disposición se ilustra esquemáticamente en la Figura 6.



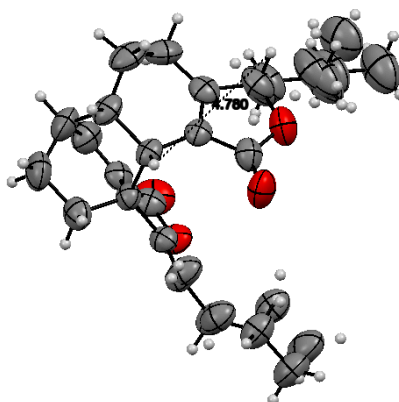
**Figura 6.** Impedimento estérico para la hidrogenación de los enlaces C3'-C8' y C7'-C7a' de *rac-5* (en proyecciones simplificadas de Newman y con diagrama de tubo)

La estereoquímica del compuesto hidrogenado *rac-10* se comprobó por medio del análisis de los datos de RMN. Se observó que hay interacción por NOE entre los hidrógenos unidos a C3 y C7, al irradiar selectivamente la señal en  $\delta_H$  4.56, lo que incrementa la intensidad de la señal en  $\delta_H$  3.18.



**Figura 7.** Interacción observada en experimento NOE unidimensional entre H3 y H7 de *rac-10*

Adicionalmente, por cristalografía de rayos X de monocristal, se pudo confirmar que la configuración relativa de los centros estereogénicos formados en la hidrogenación catalítica es la que se sugirió, como se muestra en la Figura 8, correspondiente a la estructura de *rac-10*, en la que se pudo asignar la configuración relativa de los estereocentros, y se observó que los hidrógenos enlazados a C7 y C8 apuntan hacia el mismo lado de la molécula, con una distancia de 4.780 Å entre ellos (véase Figura 8).



**Figura 8.** Vista ortep de *rac-10*

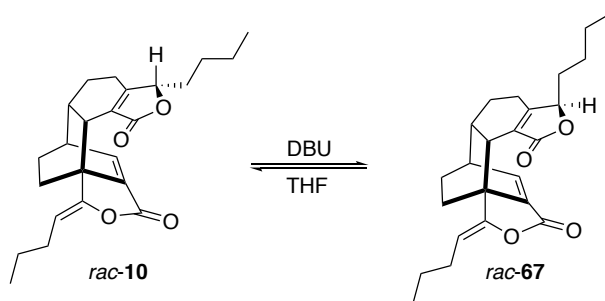
Al confirmar que al compuesto semisintético *rac-10*, obtenido previamente en nuestro-grupo, por hidrogenación catalítica de diligustílida, se le asignó la estructura correcta, quedaba por elucidar la estructura que correspondía al producto natural de *L. chuanxiong*.

Las señales en RMN atribuidas a ambos compuestos son esencialmente coincidentes, excepto por la de los hidrógenos unidos a C3 ( $\delta_H$  4.56 para el producto semisintético y  $\delta_H$  4.80 para el producto natural); así como las de los carbonos C4 y C8 ( $\delta_C$  22.4 y 32.2, para el dihidroderivado y  $\delta_C$  31.1 y 26.3 para el producto natural).

Es por eso que la hipótesis más plausible y lógica es que el producto natural aislado de *L. chuanxiong* fuera epímero en C3 del dihidroderivado *rac-10*.

Se aprovechó la acidez del hidrógeno unidos a C3 en la lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada de *rac-10*, como consecuencia de la vinilología con un hidrógeno  $\alpha$  a un carbonilo, para llevar a cabo su epimerización con una base no nucleofílica en un medio anhidro para lograr la obtención del epímero.

Al equilibrar por 24 h el compuesto *rac-10* en presencia de DBU en THF a reflujo (Esquema 10), se logró llevar a cabo la epimerización del compuesto, obteniendo el epímero en una relación 1:4, de acuerdo con el espectro de RMN  $^1H$  del crudo de reacción y al rendimiento del producto aislado obtenido.



**Esquema 10.** Obtención del epímero de *rac-10* (*rac-67*)

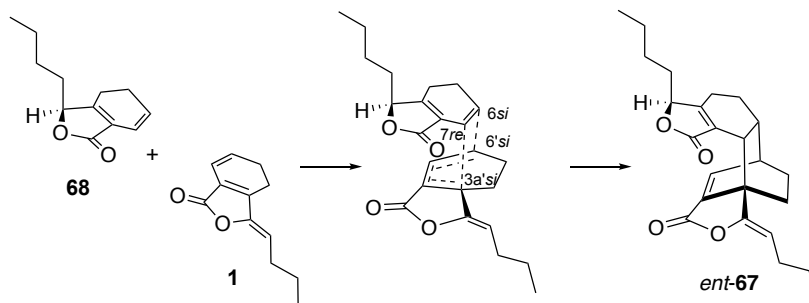
Las señales en RMN del epímero obtenido (*rac-67*) fueron coincidentes con los del producto natural de *L. chuanxiong*, por lo que se corrobora la hipótesis de que fue ese el compuesto el que se aisló de la planta (aunque, presumiblemente, enantioméricamente puro).

Se llevaron a cabo ensayos experimentales de desplazar el equilibrio hacia la formación del compuesto *rac-67*, por medio de uso de un reactor de microondas cerrado. Al aumentar la temperatura desde 100 hasta 170 °C (en pasos de 10 en 10 °C) y con tiempo de reacción hasta 45 min, no varió la proporción relativa de los epímeros. Al intentar la adición a 180 °C, se observó la formación de dos productos de menor polaridad, correspondientes a (*Z*)-ligustílida (**1**) y *rac*-senkyunólida A (*rac-68*) (Esquema 11) –lo que se supo por comparación con muestras auténticas de esos compuestos, obtenidas en nuestro laboratorio, resultado de la reacción retro Diels–Alder.

Estas evidencias permiten deducir la configuración absoluta de la ftálida dimérica de *L. chuanxiong*: como se mencionó anteriormente, este compuesto fue aislado presumiblemente como compuesto enantioméricamente puro,<sup>25</sup> a diferencia de otras ftálidas diméricas, aunque sólo se determinó su configuración relativa como (3'*Z*,3'*R*,6'*R*,3*R*,6*R*,7*R*).

Sin embargo, con los ensayos de hidrogenación de diligustílida, así como la epimerización del dihidroderivado, se observó que la configuración relativa de ese compuesto no podía ser la informada, pues esa corresponde al producto semisintético de hidrogenación. En ese sentido, el producto natural debía tener la configuración relativa (3'*Z*,3'*R*,6'*R*,3*S*,6*R*,7*R*).

Considerando que el producto proviene de una cicloadición de Diels–Alder entre (*Z*)-ligustílida (**1**) y senkyunólida A (**68**), la cual sólo se ha aislado como producto natural con configuración absoluta 3*S*, entonces el producto natural dimérico debería tener esa configuración absoluta en C3; además, la aproximación *endo-β* debe ser la favorecida, tanto por factores estéricos como electrónicos, de modo que el producto natural aislado de *L. chuanxiong* debe ser (3'*Z*,3'*R*,6'*R*,3*S*,6*R*,7*R*)-3,8-dihidro-[6,6'.3,7a']-diligustílida.



**Esquema 11.** Propuesta de formación biogénica de *ent-67*.



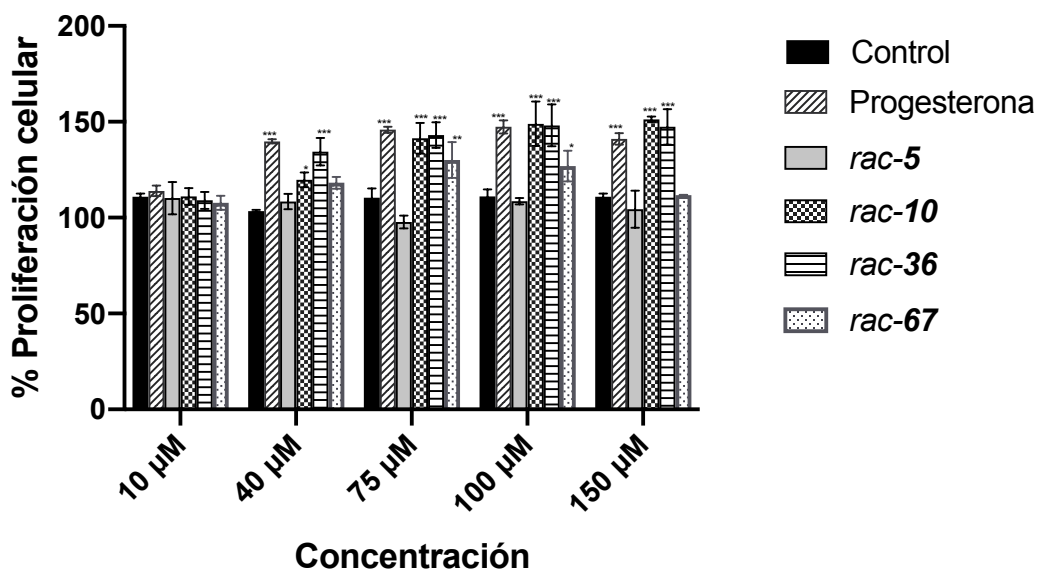
Con la evidencia de la estructura correcta del compuesto de *L. chuanxiong* (*ent-67*), se estudió la actividad como progestinas de diligustílida y sus hidroderivados.

Con el propósito de estudiar la actividad de las ftálicas como progestinas, se determinó el cambio en la proliferación celular en células T47D, se hicieron estudios microscopía de inmunofluorescencia y de acoplamiento molecular entre esos compuestos y el receptor de progesterona.

La proliferación de la línea celular T47D incrementa cuando se le suministra una progestina en periodos cortos de tiempo;<sup>66-69</sup> por lo tanto, si las ftálicas probadas actuaran como progestinas, deberían provocar un incremento en la proliferación de las células T47D. De modo que, la observación de este efecto sería una prueba indirecta de la actividad agonista del RP.

Por lo tanto, se determinó el cambio en la proliferación celular inducido por las ftálicas. Se observó que el tratamiento con dihidrodiligustílida (*rac-10*), *epi*-dihidrodiligustílida (*rac-67*) o tetrahidrodiligustílida (*rac-36*) produjo un aumento en la proliferación de las células T47D a partir de 40  $\mu\text{M}$ , con un efecto más pronunciado a 75 y 100  $\mu\text{M}$ ; por otro lado, el tratamiento con diligustílida (*rac-5*), no provocó una diferencia significativa de la proliferación celular con respecto al control. De esta manera, se observa por ejemplo, el porcentaje de proliferación en las células T47D tratadas con las ftálicas *rac-10*, *rac-36* y *rac-67* (a 75  $\mu\text{M}$ ) es de  $141.5 \pm 8.0$ ,  $143.0 \pm 6.6$  y  $130.1 \pm 9.3$ ; mientras que para progesterona fue  $145.8 \pm 1.6$  y para el control  $110.4 \pm 4.8$ . Esto indica que las ftálicas mencionadas tienen un efecto similar en la proliferación celular de las células T47D y por lo tanto, que pueden tener actividad como progestinas.

## Proliferación de células T47D



El receptor de progesterona (RP) es un factor de transcripción del grupo de los receptores nucleares, que en presencia de sus sustratos (hormonas), desarrollan su actividad transcripcional. Hay tres isomorfos: PR-A (94 kDa), PR-B (116 kDa) y PR-C (60 kDa). Los isomorfos A y B son los que tienen actividad transcripcional y el primero de ellos es el responsable, entre otras funciones, del desarrollo uterino.<sup>70,71</sup>

La hormona del RP es la progesterona y los compuestos que tienen actividad agonista sobre este receptor se llaman progestinas.<sup>72</sup>

Hay varios sitios de fosforilación del RP. El nivel de fosforilación es variable, en función de la presencia o ausencia de progesterona o progestinas. El sitio Ser294 es particularmente sensible a la presencia de progestinas; es decir, basalmente no se encuentra fosforilado a altos niveles, pero en presencia de progestinas, la fosforilación del sitio incrementa considerablemente, aumentando consecuentemente la traslocación hacia el núcleo y la dimerización del RP. De modo que, la detección de RP fosforilado en el sitio Ser294 (fosfo-RP-294), es indicativo de la presencia de progestinas.<sup>70,71,73</sup>

En ese orden de ideas, se empleó microscopia de inmunofluorescencia, para fosfoRP-294 y su localización intracelular. Si se observa un incremento de la fosforilación y un incremento de la localización en el núcleo, es otra prueba de la actividad como progestina de un compuesto.

Se encontró que, con tratamiento con dihidrodiligustílida (*rac-10*), la localización del fosfoRP-294 es eminentemente perinuclear, similar a lo que se observó con progesterona, lo que indica que se promueve la traslocación hacia el núcleo; mientras que tanto para el control negativo como para *rac-5*, la localización de la proteína era principalmente citoplasmática. Los compuestos *rac-36* y *rac-67* mostraron una situación intermedia entre ambos extremos observados, al menos al tiempo al que se llevó a cabo el estudio.

El corolario de esas observaciones es que los compuestos antes mencionados, excepto *rac-5*, son agonistas del RP (progestinas).

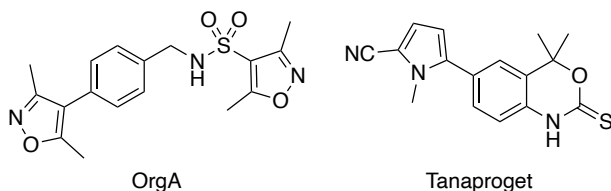
Esos resultados experimentales se vieron reforzados por medio un estudio de acoplamiento molecular, que se realizó entre cada uno de los enantiómeros de las ftálicas **5**, **10**, **37** y **69** con el RP.

En el estudio teórico se observó que todas las ftálicas se unen a la proteína en el sitio activo, de manera similar a la que lo hace progesterona y otros ligantes (ver Tabla 1). Es destacable que todos los ligantes se unieron en el sitio activo y que las energías en todo caso fueron similares. Esos resultados fueron semejantes usando dos programas diferentes (AutoDock 4.2 y AutoDock Vina), lo que aumenta la confiabilidad del resultado teórico, que muestra la afinidad de los ligantes por RP.

En un primer momento, se utilizó la estructura con clave de identificación en el *Protein Data Bank* (PDB) 4APU, que corresponde al complejo de los cristales del dominio de unión del ligante (LBD, *ligand binding domain*) en los fragmentos 678-933 con el compuesto “OrgA”.<sup>74</sup> El hecho de que los cuatro compuestos (y sus enantiómeros) hubieran tenido interacción con el sitio activo de la estructura 4APU del RP, con dos programas diferentes, hizo pensar en la necesidad de estudios adicionales con otras estructuras.

Por esa razón, se eligieron también las estructuras con clave de identificación en el PDB 3ZR7<sup>75</sup> y 1ZUC,<sup>76</sup> para verificar que los cálculos obtenidos no fueran falsos positivos. En estos casos, los estudios de cristalización, al igual que para 4APU, emplearon plásmidos de *Escherichia coli* para expresar y purificar el NBD del RP. Los ligantes usados para cocrystalizar el RP fueron “OrgA” para

la estructura 3ZR7 y tanaproget para 1ZUC (ver Figura 9). Tal como se halló con la estructura con clave PDB 4APU, los ligantes se unieron en la misma bolsa en que lo hace la progesterona, ligante natural de la proteína y las energías de unión no difirieron tanto entre sí (por programa y por estructura del RP), como se muestra en la Tabla 1.

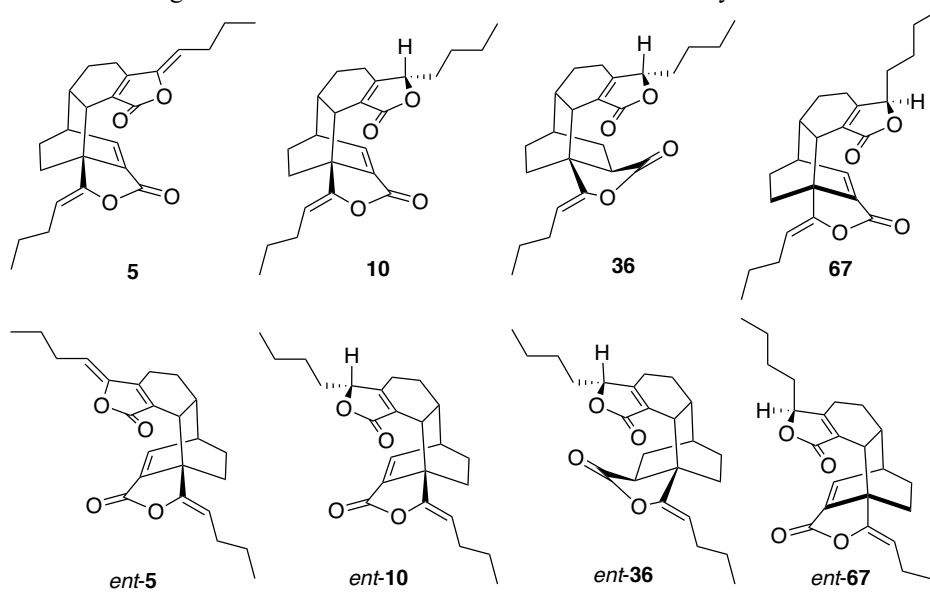


**Figura 9.** Ligantes con que fue cocrystalizado el RP en las estructuras con 4APU y 3ZR7 (OrgA) y 1ZUC (tanaproget)

Por lo tanto, se estima que la coincidencia en el sitio en que las ftálicas se unieron con el RP para las tres estructuras empleadas de RP son evidencia de la capacidad de esos compuestos para actuar como progestinas.

Una particularidad que se observó es que el compuesto **10**, aunque no mostró la mayor energía de afinidad relativa hacia el RP, tuvo un tipo de interacción S-O, con el residuo Met 756 (este tipo de interacciones que aunque parecieran *prima facie* contraintuitivas, no son infrecuentes y se muestran en amarillo en la Figura 10).<sup>77</sup> Se ha encontrado que interacciones con este residuo del sitio activo pueden ser determinantes para el correcto acomodo enzima-ligante, y por tanto, para la interacción entre ambos.<sup>75</sup> Además, ese resultado teórico coincide con la buena actividad del racemato *rac*-**10**.

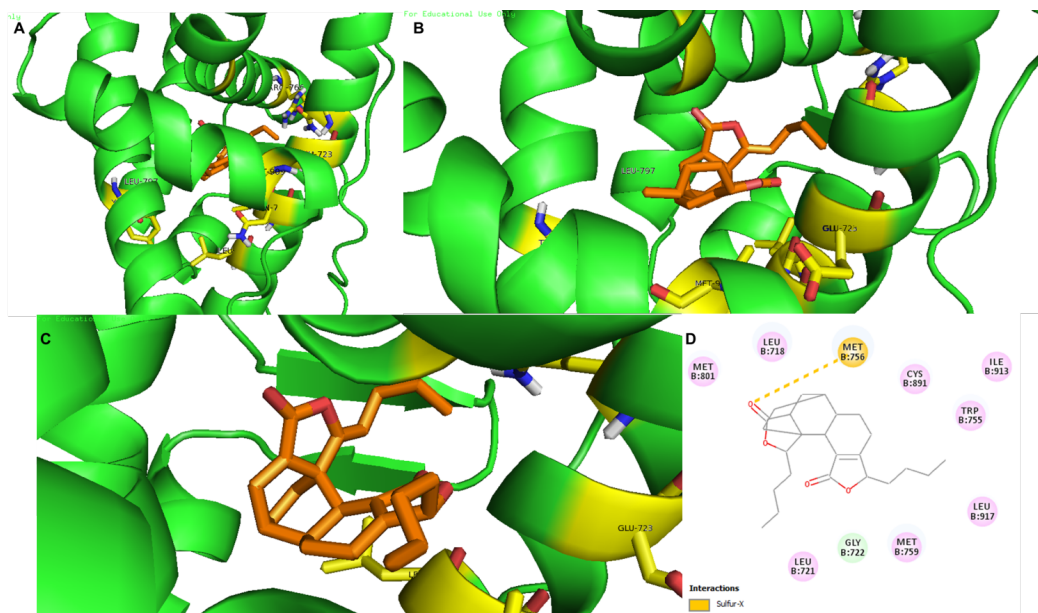
**Tabla 1.** Energías de afinidad calculadas entre ftálicas diméricas y estructuras de RP.



comp	- $\Delta G$ (kcal/mol)					
	4APU		3ZR7		1ZUC	
	AD4	VINA	AD4	VINA	AD4	VINA
<b>5</b>	10.44	4.9	11.24	6.9	10.56	4.6
<b>10</b>	10.99	4.7	10.76	6.2	10.05	4.7
<b>36</b>	10.61	5.1	10.98	5.8	9.88	3.9
<b>67</b>	11.10	4.8	11.33	6.5	11.67	7.4
<i>ent-5</i>	10.71	4.9	10.96	6.5	9.81	5.0
<i>ent-10</i>	10.97	4.7	10.88	6.2	10.43	3.7
<i>ent-36</i>	10.79	4.6	10.87	6.7	9.46	3.7
<i>ent-67</i>	11.04	4.7	10.77	7.1	10.45	4.0
Progesterona	11.14	5.3	22.48	7.6	24.27	10

Nota: Se muestran las energías de afinidad (negativas) en kcal/mol de cada enantiómero de las cuatro ftálicas, con cada una de las tres estructuras cristalizadas del RP (4APU, 3ZR7 y 1ZUC), calculados con AutoDock 4.2 (AD4) y AutoDock Vina (VINA)

En general, los resultados obtenidos mediante docking son evidencia adicional de la posible actividad como progestinas de las ftálicas derivadas de diligustílida, esto es ambos enantiómeros de **10**, **37** y **67** (y en particular, por lo mencionado en el párrafo que antecede), aunque son insuficientes para mostrar las variaciones debidas a la estereoquímica, por lo que estudios más profundos deberían ser llevados a cabo en este aspecto.

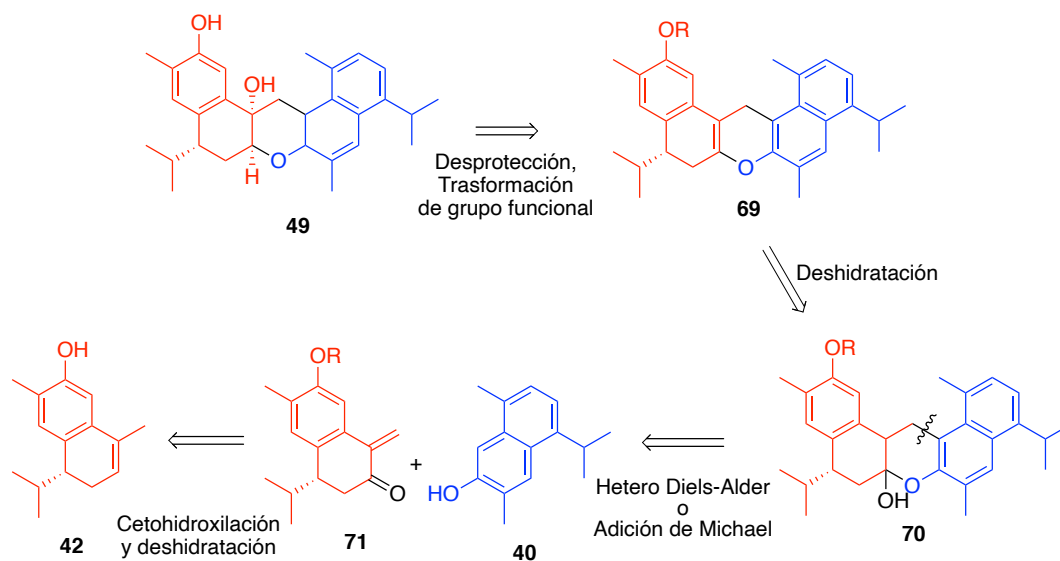


**Figura 10.** Visualización de resultados de acoplamiento molecular entre **10** y RP. (A-C): Simulaciones tridimensionales; D: representación bidimensional, mostrando la interacción sulfuro-oxígeno (destacada en color amarillo).

La relevancia de encontrar nuevas opciones de progestinas de origen vegetal, es su uso en terapias de reemplazamiento hormonal durante la menopausia, contra síndrome premenstrual, como anticonceptivos y como tratamiento de la infertilidad (aunque estos dos últimos usos suenan antitéticos, de acuerdo a la condición particular que genere la infertilidad, y en función del momento y cantidad de progestina empleada se promueve una u otra actividad), dados los efectos secundarios perjudiciales de las progestinas esteroidales.<sup>78–83</sup>

## 6.2. Semisíntesis del esqueleto de dicadalenol

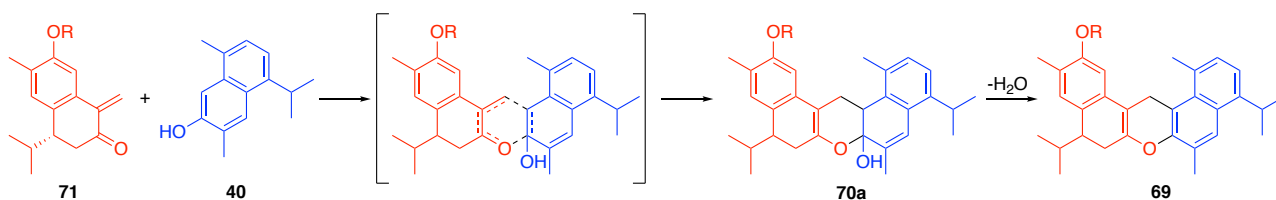
Con el objetivo de estudiar la reactividad de los sesquiterpenos aislados de *H. inuloides*, así como obtener un compuesto con el esqueleto de dicadalenol (**49**) y algunos análogos, cuya actividad antiinflamatoria se estudiaría, se planteó el siguiente esquema retrosintético (Esquema 12):



**Esquema 12.** Análisis retrosintético para la obtención de **49**

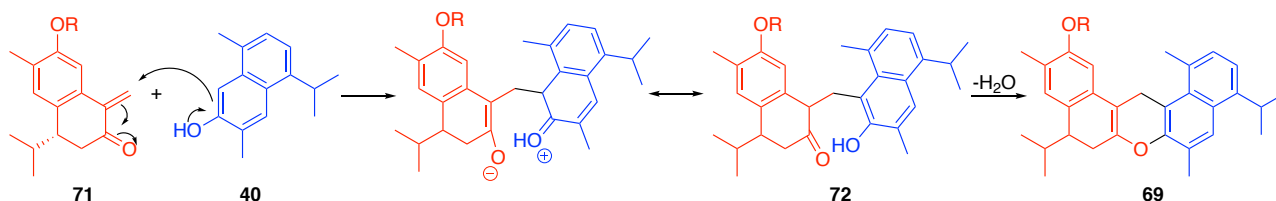
Retrosintéticamente, dicadalenol (**49**) provendría de la hidratación y desprotección del compuesto **69**, que a su vez viene de la deshidratación del alcohol **70**. Éste ya tiene el mismo esqueleto que el compuesto natural. La formación de **70** es la transformación clave en este esquema, que se sugiere que puede ocurrir por medio de varias alternativas: una reacción hetero Diels-Alder; una formación de hemicetal y deshidratación; o bien, una adición tipo Michael seguida de ciclación entre 7-hidroxicadalenol (**40**) y la enona **71** (que se obtendría de la cetohidroxilación seguida de deshidratación del compuesto natural protegido 3,4-dihidro-7-hidroxicadalenol, **42**). Esta cetona –a la que se podría llamar inuloidona– es el compuesto de oxidación del producto natural inuloidina (**43**), y es por lo tanto posible que se forme como metabolito en la planta y además que sea intermediario en la biosíntesis de dicadalenol.

Si procediera mediante una reacción hetero Diels-Alder, el sistema carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado del compuesto **71** reaccionaría como dieno y el enlace  $\pi$  C6-C7 de **40** como el dienófilo (que tiene mayor carácter de doble enlace), para dar lugar a un hidroxidihidropirano (**70a**), que se deshidrataría para que el fragmento proveniente de **40** recuperara la aromaticidad. Esta opción se muestra en el Esquema 13



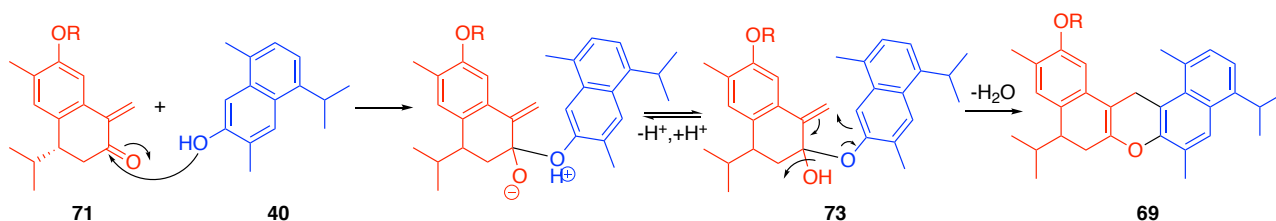
**Esquema 13.** Alternativa de paso clave en la formación de dicadalenol con reacción de Diels-Alder

Si la reacción procediera por una C-alkilación por adición conjugada de C6 (de **40**) al carbono electrofílico C14 (del compuesto hipotético **71**), después de ese ataque y equilibrios ácido base, se llevaría a cabo la adición intramolecular 1,2 en **72** del hidroxilo al carbonilo, lo cual después de una deshidratación originaría el mismo pirano (ver Esquema 14).



**Esquema 14.** Alternativa de paso clave en la formación de dicadalenol con C-alkilación 1,4

Un tercer escenario posible, mostrado en el Esquema 15, sería la adición 1,2 del hidroxilo de 7-hidroxicadalenol (**40**) a la cetona protegida de inuloidona (**71**), para formar el hemiacetal **73**. El hidroxilo de este podría ser desplazado por medio de una sustitución nucleofílica intramolecular y, después de perder un protón, generaría el pirano **69**.

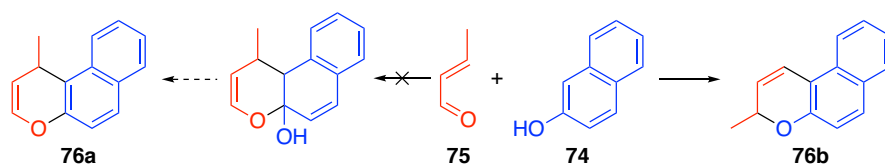


**Esquema 15.** Alternativa de paso clave en la formación de dicadalenol con adición 1,2

Para poner a prueba el denominado paso clave, es decir, en el que se obtiene la conectividad C-C y C-O necesaria, se llevaron a cabo varias pruebas, utilizando como reactivos modelo 2-naftol (**74**) y crotonaldehído (**75**), variando las condiciones (ver Tabla 2).



**Tabla 2.** Reacción de 2-naftol con crotonaldehído



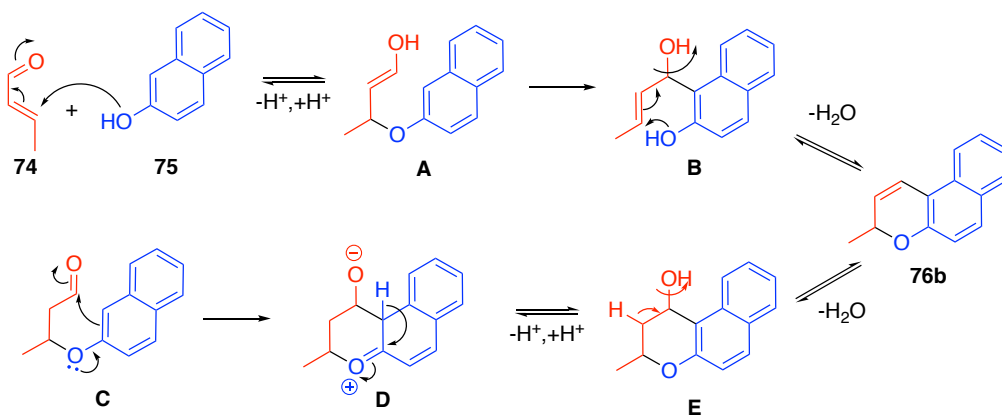
	2-Naftol (74, mmol)	Crotonaldehído (75, mmol)	<i>p</i> -TsOH (mmol)	Condiciones	Observaciones <sup>α,β,c</sup>
1	0.50	1.21	0.51	15 min, 150 °C, hexano, MW	a
2	0.50	2.05	0.50	15 min, 130 °C, hexano, MW	a
3	0.52	2.05	0.49	15 min, 100 °C, hexano, MW	a
4	0.47	2.05	0.48	15 min, 80 °C, hexano, MW	a
5	0.56	2.05	0.53	15 min, 100 °C, hexano, MW	a
6	0.00	2.05	0.47	4 h, 170 °C, hexano, tubo sellado	a
7	2.03	1.21	0.00	96 h, 110 °C, benceno	b
8	2.03	1.21	0.00	15 min, 230 °C, hexano, MW	b
9	1.00	4.10	0.00	7 días, 110 °C, tubo sellado	c
10	1.00	8.21	0.00	7 días, 110 °C, tubo sellado	c

a: mezcla compleja; b: no hay reacción; c: regioisómero **76b** en bajo rendimiento. MW: microondas

Para favorecer la reacción, esta se llevó a cabo en tubo sellado con hexano como disolvente y *p*-TsOH en cantidades estequiométricas como promotor de la reacción (experimentos 1-5). Se recuperó 2-naftol y se obtuvo una mezcla compleja de descomposición (polimerización) de **76**, lo que se comprobó al someter a calentamiento este compuesto con *p*-TsOH en ausencia de 2-naftol (experimento 6).

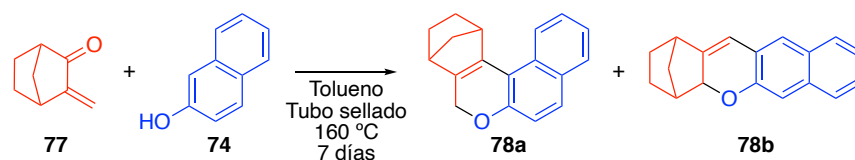
También se intentó llevar a cabo la reacción por medio de cicloadición, calentando **74** y **75** en benceno en tubo sellado (experimento 7) o microondas (experimento 8), sin que hubiera transformación de las materias primas. Al aumentar la temperatura y el tiempo de reacción en tubo sellado, llevándola a cabo por 7 días a 160 °C, se observó por medio del análisis de los datos de RMN que, en lugar de obtener **76a**, se obtiene el regioisómero de **76b**, cuya formación se esperaría por la reacción de cicloadición (experimento 9); la formación de **76a** tampoco se observó al aumentar la cantidad de equivalentes de crotonaldehído, que no mejoró el rendimiento en la formación de **76b** (experimento 10). A pesar de esta observación, se observó la selectividad del enlace 1,2 del naftol para reaccionar preferentemente con el carbono β y no con el del carbonilo.

La propuesta para explicar la reacción se muestra en el Esquema 16: a pesar de la ausencia de catalizador, debido a la alta temperatura y al tiempo largo de reacción, ocurre una adición 1,4 del oxígeno del naftol **74** a **75**, generando el intermediario **A**. Éste puede sufrir un reordenamiento molecular para formar el alcohol alílico **B**, que por medio de una reacción S<sub>N</sub>2' formaría **76b**; o bien, el intermediario **A** podría también tautomerizar al aldehído **C**, que a través de una reacción de Friedel-Crafts formaría **D**, y su tautómero **E** daría lugar, después de una deshidratación, a **76b**.



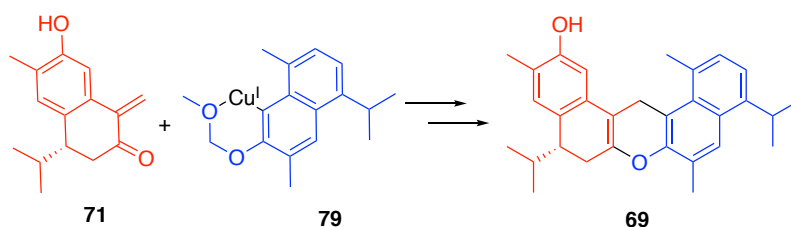
**Esquema 16.** Mecanismo de la adición 1,4 de 2-naftol a perilaldehído

Para aumentar la reactividad mediante cicloadición de Diels-Alder, se utilizó 3-metilen-2-norbornanona (**77**), debido a que este heterodieno tiene la ventaja de que la enona se encuentra en posición *s-cis* fija. No obstante, se obtuvieron resultados similares al reemplazar crotonaldehído **75** por **77**, y someterlo a calentamiento con **74** en tubo sellado durante 7 días en benceno (Esquema 17).



**Esquema 17.** Adición de **75** a **78**

En vista de los resultados anteriores, se pensó que sería factible forzar la reactividad para la adición de Michael deseada por medio de una adición del reactivo de Gilman<sup>84-87</sup> **79** a la enona **71**. Para esto sería necesario proteger el 2-naftol preparando su éter metoximetilénico (MOM). Se pensó que la protección con el grupo funcional MOM tiene la ventaja adicional de favorecer la *orto*-litiación (con BuLi), para que con una transmetalación se obtuviera el arilcuprato de litio (ver Esquema 18); además de que las condiciones ácidas necesarias para la desprotección podrían favorecer la ciclación sin necesidad de pasos adicionales.



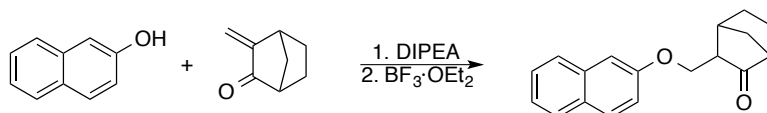
**Esquema 18.** Propuesta de obtención de esqueleto de dicadalenol por reacción de Gilman

Nuevamente se emplearon reacciones modelo para explorar esta propuesta. La protección de 2-naftol se llevó a cabo de manera cuantitativa. Pero los intentos de llevar a cabo la *o*-alquilación fueron infructuosos, recuperándose la materia prima. Este resultado puede deberse a que el reactivo de Gilman obtenido por la protección con el grupo MOM puede reducir su reactividad, debido a las interacciones de oxígeno con Cu (mediante la presumible formación de un ciclo como el que se muestra en el Esquema 18), y un mayor impedimento estérico para que el carbanión ataque al nucleófilo.

Considerando la regioselectividad de la adición del naftol en adiciones 1,4 a carbonilos  $\alpha,\beta$ -insaturados es por la adición del oxígeno, se planteó la posibilidad de que se llevara a cabo la adición de **74** a una cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada mediante la formación de un hemiacetal y luego ciclación (tercera alternativa para el paso determinante, descrita en párrafos precedentes, Esquema 15). Para forzar esa reactividad, se pensó en obtener la base conjugada del naftol (**74**), por lo que se trató con DIPEA en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y posteriormente se añadió la enona. Luego de tres horas, se notó que en el seno de la reacción no había materia prima y en su lugar aparecía un producto más polar, pero después de llevar a cabo el proceso de purificación, que incluyó una extracción en medio ácido, se obtuvieron las materias primas intactas, lo que podría deberse a la formación del hemiacetal deseado, que en el medio ácido de purificación (gel de sílice) se hidrolizó regenerando las materias primas.

Por lo anterior, se repitió la reacción, pero en lugar de terminarla, se añadió  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  como agente deshidratante y se dejó reaccionar por 24 h a temperatura ambiente, y se encontró nuevamente que la reacción ocurrida es una adición 1,4- del hidroxilo del naftol a la enona, de modo que la adición de los ácido o bases añadidos no favoreció el tipo de reactividad deseada (

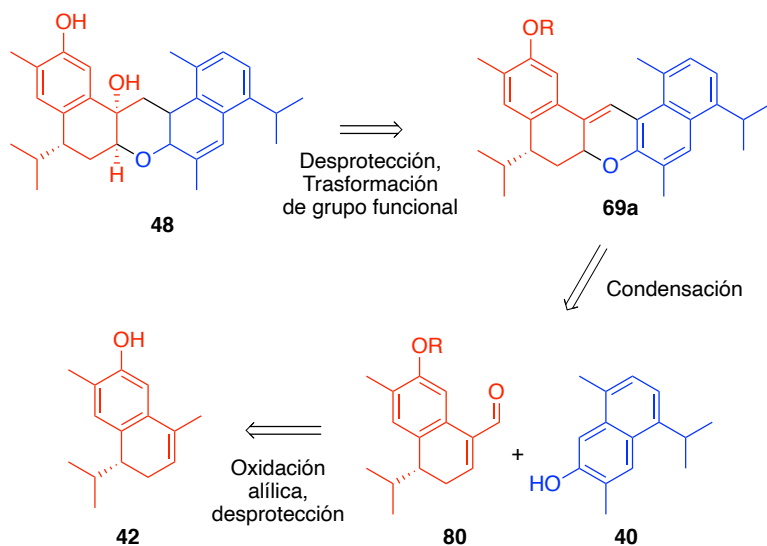
Esquema 19).



**Esquema 19.** Reacción entre 2-naftol y 3-metilen-2-norbornanona promovida por  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$

Los resultados descritos permiten concluir que la reactividad de los naftoles frente a las enonas es una *O*-alquilación mediante una adición tipo Michael, y en las condiciones ensayadas no fue posible forzar a que ocurriera la *C*-alquilación necesaria, por lo que se decidió abandonar el esquema retrosintético original.

Sin embargo, estas observaciones también permitieron replantear la ruta retrosintética, aprovechando la reactividad observada, con base en la cual se propuso el siguiente esquema (Esquema 20):



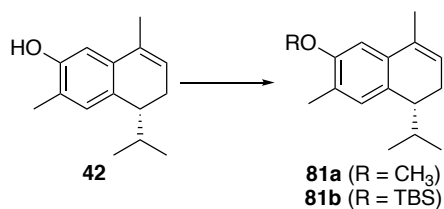
**Esquema 20.** Nuevo análisis retrosintético para obtención de dicadalenol

Esta nueva retrosíntesis se encuentra sustentada en la reactividad observada (adición 1,4 de hidroxilos a carbonilos  $\alpha,\beta$ -insaturados), que puede ser aprovechada cambiando la posición del sistema carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado, de modo que ahora el enlace C-O se formaría por adición del oxígeno del cadinano al carbono  $\beta$  del sistema insaturado (ubicado ahora en el carbono 2 del cadinano dihidrogenado) y el enlace C-C se formaría por una alquilación tipo Friedel-Crafts (por ataque del carbono 8, *orto* al oxígeno, de uno de los cadinanos, al carbonilo 14). Esto se lograría mediante la sustitución de la enona **71** por el enal **80**, para reaccionar con **40**.

Es decir, en el nuevo esquema, de acuerdo con las observaciones anteriores, el compuesto con el esqueleto de dicadalenol (**69a**) tendría el doble enlace conjugado con los dos sistemas aromáticos y se formaría en un solo paso de condensación, por medio de la adición 1,4 del hidroxilo de **40** al aldehído protegido **80** (obtenido por protección y oxidación alílica del producto natural **42**), seguida de la ciclación, de acuerdo con las observaciones previas.

Para la aplicación de esta metodología sintética, era necesario obtener el producto protegido **80**, por lo que se llevó a cabo, en una primera etapa, la protección del producto natural **42** (Esquema 21), con metilo (por reacción con diazometano o con sulfato de dimetilo, obteniendo **81a**) y con TBS (por reacción con imidazol y TBSCl para dar lugar a **81b**), observándose mayor rendimiento en la obtención de **81a** usando  $\text{Me}_2\text{SO}_4$ , además de que experimentalmente su preparación fue más sencilla

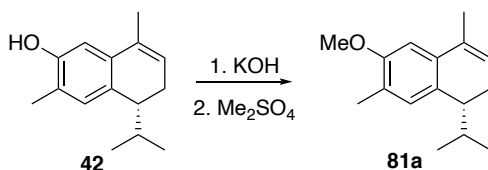
y una exploración preliminar de la reacción de oxidación alílica con  $\text{SeO}_2$ , permitió observar que era más limpia la reacción cuando se protege con metilo.



**Esquema 21.** Reacciones de protección de **42**.

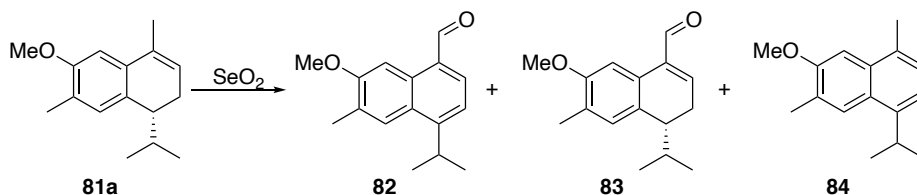
Una vez que se eligió la utilización del producto protegido **81a**, se optimizó la reacción y se decidió llevar la alquilación con  $\text{Me}_2\text{SO}_4$ , logrando hasta 91 % de rendimiento al tratar **42** con  $\text{KOH}$  y después adicionar  $\text{Me}_2\text{SO}_4$  y calentar en el reactor de microondas a 150 °C por 15 min, como se muestra en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Optimización de protección de **42**



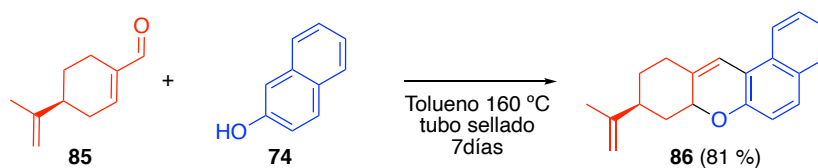
Ensayo	Condiciones	Rendimiento
1	Calentamiento a reflujo por 2 h	70 %
2	Calentamiento en microondas a 150 °C por 15 min	91 %

Posteriormente, se llevó a cabo la reacción de oxidación de **81a** con  $\text{SeO}_2$  en diferentes condiciones (Tabla 4). Se observó que en todos los casos se forman los productos 7-metoxicadalen-14-al (**82**), 3,4-dihidro-7-metoxicadalen-14-al (**83**) y 7-metoxicadalen (**84**), siendo éste en todos los casos mayoritario. Se llevó a cabo la reacción en distintas condiciones, y de acuerdo con los experimentos de RMN  $^1\text{H}$ , se obtiene **83** en mayor proporción (en relación con otras condiciones) cuando **81a** se sometió a reacción con  $\text{SeO}_2$  en una relación molar 1:5 durante dos horas en  $\text{EtOH-H}_2\text{O}$  9:1.

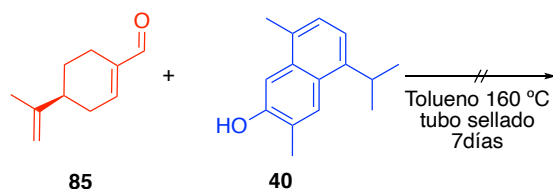
**Tabla 4.** Condiciones para la oxidación alílica de **81a**.

Ensayo	7 (mmol)	SeO <sub>2</sub> (mmol)	Condiciones	Observaciones
1	0.093	0.187	EtOH-H <sub>2</sub> O 9:1 reflujo	Se forman 3 productos.
2	0.093	0.467	EtOH-H <sub>2</sub> O 9:1 reflujo	Mejor proporción de <b>83</b> (hasta 30.9 %).
3	0.093	0.186	Dioxano, HCOOH, reflujo	Casi exclusivamente <b>84</b> .
4	0.093	0.014	EtOH, TBHP 0.23 mmol, temperatura ambiente, 24 h.	No hay reacción.

Una vez que se obtuvo el aldehído, se continuó con la exploración de la reacción de formación de pirano, con la conectividad del esqueleto de dicadalenol. El uso de reacción modelo –2-naftol (**74**) con crotonaldehído (**75**)– había sido exitoso y demostró la viabilidad de la metodología basada en el nuevo análisis retrosintético, por lo que se probó un modelo más cercano, empleando perilaldehído (**85**) como enal. Ésta se llevó a cabo por calentamiento durante 7 días en tubo sellado en tolueno a 140 °C, formándose el producto **86** (Esquema 22).

**Esquema 22.** Reacción entre 2-naftol (**74**) y perilaldehído (**85**)

El uso de las mismas condiciones se intentó con una reacción modelo más aproximada a la real, entre 7-hidroxicaleno (**40**) y perilaldehído (**85**). A pesar de variar la relación estequiométrica y adicionar fenotiazina (con el objetivo de impedir la descomposición por polimerización radicalaria del aldehído), no se observó que las materias primas reaccionaran (ver Tabla 5).

**Tabla 5.** Ensayos para llevar a cabo la reacción entre **40** y **85**

Ensayo	<b>40</b> (mmol)	<b>85</b> (mmol)
1	0.093	0.186
2	0.093	0.186 + 1.1 mg de fenotiazina
3	0.093	0.280
4	0.093	0.441

En consecuencia, se decidió utilizar un catalizador. Se ha observado que la adición 1,4 de naftoles y fenoles a compuestos carbonílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados puede ser catalizada por diacetato de etilendiamonio (DAED).<sup>88,89</sup> Por lo tanto, se intentó la reacción modelo nuevamente entre **75** y **85**, que procedió en 4.5 h con buen rendimiento.

No obstante, al intentar llevar a cabo la reacción entre 7-hidroxicaldeno (**40**) y perilaldehído (**85**), tampoco se llevó a cabo la adición deseada, recuperándose el producto natural intacto, a pesar de aumentar la temperatura, variar el disolvente,<sup>88,89</sup> la cantidad de catalizador,<sup>88,89</sup> y el tiempo de reacción, lo que se resume en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Intentos adicionales de reacción entre **40** y **85**

Ensayo	<b>40</b> (mmol)	<b>85</b> (mmol)	DAED	Condiciones
1	0.078	0.19	20 mol %	Tolueno, reflujo, 36 h.
2	0.086	0.19	10 mol %	CHCl <sub>3</sub> , reflujo, 36 h.
3	0.104	0.19	20 mol %	Tolueno, tubo sellado, 24 h, 130 °C.
4	0.098	0.19	10 mol %	CHCl <sub>3</sub> , tubo sellado, 24 h, 130 °C.
5	0.107	0.19	20 mol %	Tolueno, tubo sellado, 7 días, 130 °C.
6	0.097	0.19	10 mol %	CHCl <sub>3</sub> , tubo sellado, 7 días, 130 °C.

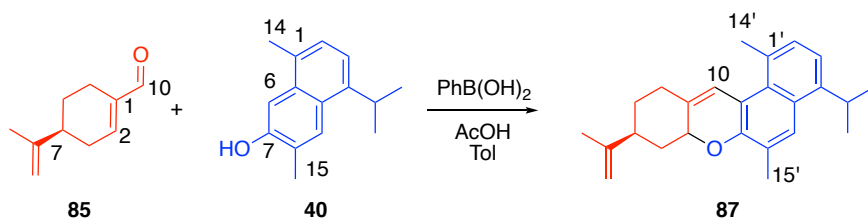


Cuando se llevó a cabo la reacción de **40** con aldehídos más reactivos, como crotonaldehído y 3-metilen-2-norbornanona, en presencia de DAED, tampoco hubo reacción, lo que es indicativo de que la sustitución (probablemente en C4 y C8) disminuye la reactividad del aldehído por factores estéricos que dificultan el ataque del hidroxilo al sistema carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado.

Se intentó aumentar la reactividad de **40**, desprotonando con una base (DBU o DIPEA). A pesar de lo anterior, el cadinano tampoco reaccionó con perilaldehído. El uso de otros ácidos de Lewis y Bronsted-Lowry ( $\text{BF}_3\text{-OEt}_2$  y *p*-TsOH) como catalizadores para aumentar la electrofilia de **85** tampoco fue fructífera, puesto que únicamente se descomponía el aldehído, sin que reaccionara con el producto natural. Con estas observaciones, se confirmó que 7-hidroxicadaleño (**40**) es menos reactivo que 2-naftol (**74**) debido a los sustituyentes adicionales.

Otra forma de promover la reacción de adición 1,4 de naftoles a carbonilos  $\alpha,\beta$ -insaturados, es la adición de  $\text{PhB(OH)}_2$ , en presencia de un ácido carboxílico empleando una trampa de Dean-Stark.<sup>90</sup> Presumiblemente, el ácido fenilborónico y el ácido acético forman el éster fenilborónico *in situ*, que cataliza la reacción por ser un ácido de Lewis. Convenientemente, como se muestra en la Tabla 7), la reacción entre **40** y **85** en relación equimolar se llevó a cabo, dando lugar al producto esperado (**87**) como una mezcla de diastereoisómeros (*cis/trans* 10:1.5), de acuerdo a lo observado por medio de los datos de RMN y EM (ensayo 1). Debe hacerse notar que ese producto es muy lábil y se transforma fácilmente, probablemente debido a la repulsión estérica entre metilo C14' y el metino C10 (análoga al efecto de tensión transanular o helicoidal, por los sustituyentes); además de que el doble enlace que se forma (C8-C14') también puede ser la causa de la alta reactividad del compuesto. La reacción se llevó a cabo también sin trampa de Dean-Stark, para observar si se logra aislar el producto hidroxilado intermediario; sin embargo, únicamente se nota menor formación del producto final (ensayo 2). Además, en microondas (sistema hermético que no permite la exclusión de agua del seno de la reacción), únicamente se recuperan las materias primas (ensayos 3 y 4). Estos resultados revelan la importancia de la eliminación de agua para la obtención del producto, y son un indicio de que el éster fenilborónico es la especie que cataliza la reacción, cuya formación disminuye al haber agua presente, y consecuentemente, el rendimiento también. Los intentos de utilizar agentes desecantes para evitar el efecto de agua (ensayos 5–8) no favorecieron la reacción; y al extender el tiempo de reacción, se comenzaron a observar subproductos (ensayo 9)

**Tabla 7.** Comparación de condiciones de la reacción entre **85** y **40** en presencia de PhB(OH)<sub>2</sub>.

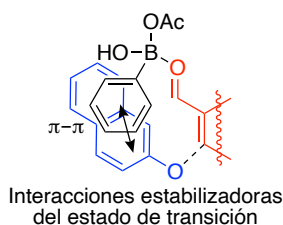


Ensayo	Condiciones	Observaciones
1	26 h, reflujo, trampa de Dean-Stark, N <sub>2</sub>	Se forma compuesto en bajo rendimiento (76 %).
2	26 h, reflujo, sin trampa de Dean-Stark, N <sub>2</sub>	Se forma compuesto, aparentemente menor rendimiento (c.c.f.)
3	Microondas, 170 °C, 100 W, 15 min	No hay reacción
4	Microondas, 190 °C, 150 W, 30 min	No hay reacción
5	Calentamiento a reflujo por 24 h en presencia de malla molecular	Adsorción de sustratos.
6	Calentamiento en microondas a 200 °C por 15 min, con malla molecular	No hay reacción; adsorción de sustratos.
7	Calentamiento en microondas a 200 °C por 30 min, con malla molecular	No hay reacción; adsorción de sustratos.
8	Calentamiento en microondas a 200 °C por 30 min en presencia de sulfato de sodio	No hay reacción
9	Calentamiento convencional, trampa, 4 días, N <sub>2</sub> .	Se obtiene producto; aparentemente, mayor descomposición (c.c.f)

El resultado de que los agentes desecantes no mejoren el rendimiento puede deberse a que el proceso de adsorción es desfavorecido a alta temperatura.

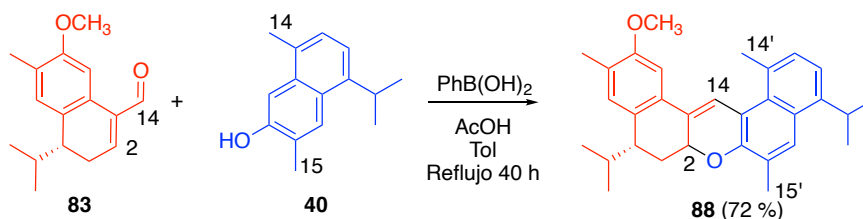
Por lo tanto, entre las condiciones intentadas, la reacción con calentamiento convencional y mediante el uso de una trampa de Dean-Stark, calentando a reflujo por 26 h, da el mejor resultado, obteniendo un rendimiento máximo (considerando producto purificado) de 76 %.

El hecho de que la formación del producto se observe solamente usando la mezcla  $\text{PhB(OH)}_2/\text{AcOH}$  como catalizador puede explicarse a que se forma un éster borónico que funciona como especie catalítica. Además de modificar la energía de los orbitales frontera, es probable que la presencia del anillo aromático tenga interacciones estabilizadoras secundarias  $\pi$ - $\pi$ , con el sistema aromático del sustrato, que facilitan la aproximación para los dos ataques nucleofílicos que se requieren, al disminuir la movilidad del enlace C-O del naftol, como ese muestra en la Figura 11.



**Figura 11.** Propuesta de estado de transición de la reacción catalizada por  $\text{PhB(OH)}_2$

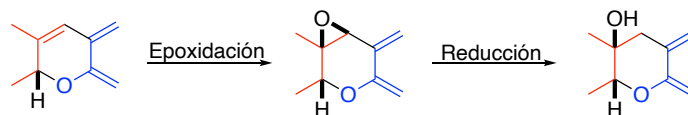
Lograda la reacción anterior, se intentó realizar la condensación entre 7-hidroxicadalenol (**40**) y 3,4-dihidro-7-metoxicadalen-14-al (**83**). Por medio de c.c.f y RMN, se observó la formación de un compuesto menos polar (como ocurrió en la reacción anterior) después de 40 h de reacción que corresponde a **88** (Esquema 23); sin embargo, el producto es más inestable y su aislamiento se dificulta dada la labilidad frente al ácido de este producto y su volatilidad. La mayor reactividad del producto podría obedecer al aumento de los factores estéricos (mayor repulsión estérica debido a la presencia de un anillo de benceno adicional) y electrónicos (mayor densidad electrónica en el doble enlace por el anillo de benceno) antes mencionados para **87**.



**Esquema 23.** Posible reacción entre **83** y **40**

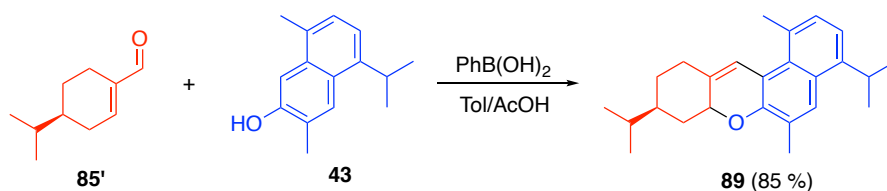
Para avanzar en la obtención de dicadalenol, se ensayó la hidratación del doble enlace de **88**. Como primeras alternativas, se intentó la hidratación directa del doble enlace por oximercuración-desmercuración o boración-oxidación, las cuales no dieron lugar al producto hidratado deseado.

Otra alternativa que se exploró fue la epoxidación del doble enlace, seguida de reducción. Es posible que de esa forma se lograría la estereoquímica deseada, puesto que la epoxidación ocurriría en la estereocara menos impedida (por el análisis de los modelos moleculares, la que está del mismo lado del hidrógeno en el átomo 2), por lo que el grupo hidroxilo quedaría en posición *cis* en relación con ese átomo de hidrógeno, como se representa en el Esquema 24.



**Esquema 24.** Propuesta de estereoselectividad con epoxidación seguida de reducción

El compuesto **88** es extremadamente inestable y para prepararlo es necesario obtener **83** (que se obtiene en rendimiento bajo y por lo tanto hay mucho consumo de materia prima), por lo que se empleó como modelo para la reacción de hidratación el compuesto **89** (derivado de la reacción de condensación entre **43** y **85'**, mostrada en el Esquema 25),<sup>ii</sup> que tiene la ventaja de ser aparentemente más estable en las condiciones empleadas, de acuerdo a observaciones experimentales, y se acerca más al compuesto deseado, ya que las diferencias estructurales (mayor sustitución de **41** en relación con 2-naftol) disminuyen la reactividad del compuesto, como se notó anteriormente.



**Esquema 25.** Reacción entre **43** y **85'**

<sup>ii</sup> Esta reacción intentó optimizarse por medio de uso de calentamiento con microondas en un sistema abierto, al cual se puede adaptar trampa de Dean-Stark; pero en las condiciones ensayadas, no hubo formación de producto.

La epoxidación de **89** (el cual se utilizó como producto crudo y puro) se intentó con ácido *m*-cloroperbenzoico, pero dio lugar a una mezcla compleja que se forma también en ausencia de este reactivo. El uso de un buffer de benzoato y el empleo de DMDO (generado *in situ* o justo antes de la reacción), tampoco permitieron la obtención del epóxido. Los resultados proporcionan evidencia de la alta reactividad del precursor olefínico **88** hacia la oxidación

Debido a la limitación en las cantidades disponibles de los productos naturales requeridos como materias primas, no fue posible la realización de ensayos adicionales, lo que impidió la obtención de dicadalenol en las condiciones de transformación de grupo funcional ensayadas. No obstante, el haber logrado la preparación del compuesto **88** con la conectividad molecular correcta correspondiente a la estructura objetivo, resulta un hallazgo significativo. Por otro lado, la labilidad hacia el ácido es una dificultad adicional para la purificación y caracterización de este compuesto (dada la acidez del gel de sílice, a pesar de que se desactivó con DIPEA)

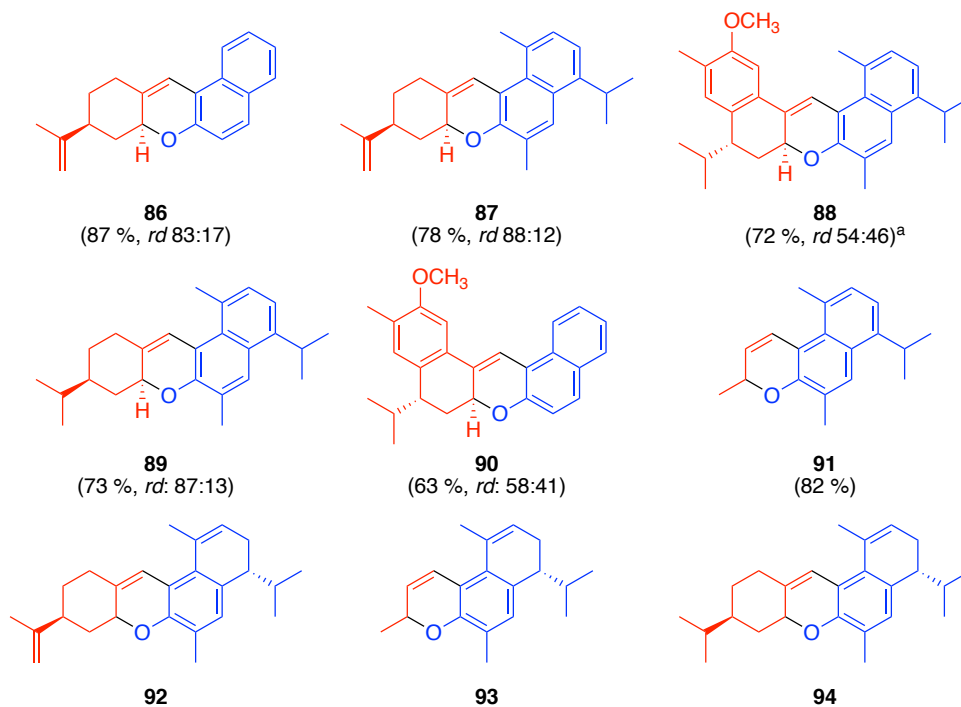
### 6.2.1. Obtención de análogos de dicadalenol

Una vez que se llevó a cabo la reacción de formación del producto **88** (que posee el esqueleto de dicadalenol, **50**), se obtuvieron compuestos análogos haciendo reaccionar los aldehídos con los naftoles correspondientes para obtener los compuestos **90-95**.<sup>iii</sup> En la Figura 12 se muestran los compuestos obtenidos, que se aislaron como mezclas diastereoméricas, mostrándose en la figura el rendimiento (que en general fue moderado a bueno) y el exceso diastereomérico correspondiente al diastereómero dibujado.

De ese modo, se sintetizaron nueve análogos (**87-92**), de dicadalenol (Figura 12). Se observó que la mayoría de estos compuestos son inestables frente al oxígeno y frente a ácidos, lo que inhibió la posibilidad de llevar a cabo bioensayos de su actividad.

---

<sup>iii</sup> Para obtener cantidades adicionales de 7-hidroxicalaleno (**40**), se aromatizó el compuesto 3,4-dihidro-7-hidroxicalaleno (**42**, también reaislado en el presente trabajo) con DDQ.



**Figura 12.** Análogos de dicadalenol.

<sup>a</sup>El tiempo de reacción para la obtención de este producto se aumentó de 26 a 48 h, en relación con los demás.

Se atribuye esa inestabilidad al doble enlace conjugado con el anillo aromático. La presencia de luz, de oxígeno y de ácido da lugar a productos más polares y coloridos, lo cual puede ser indicativo de polimerización radicalaria o catiónica.

Notablemente, los productos derivados de 3,4-dihidro-7-hidroxicadalenol (**92-94**) son aún más lábiles al ácido, al aire y/o a la luz, lo que ha derivado en la imposibilidad de caracterizarlos espectroscópicamente, pero sí detectarlos espectrométricamente.

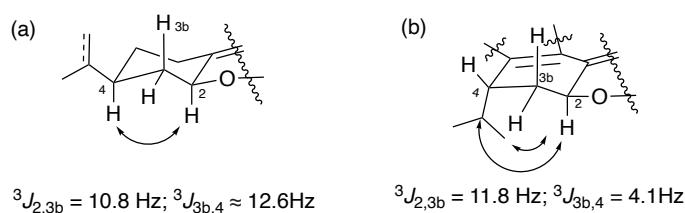
La importancia de la síntesis de estos análogos radica en la ampliación de la aplicabilidad del catalizador empleado. Se observó que entre los catalizadores empleados, el ácido fenilborónico fue el único con el que se llevó a cabo la reacción con los cadinanos, que tienen el sistema de naftol más sustituido (la menor reactividad puede atribuirse a los dos metilos en las posiciones 3 y 8).

## Estereoquímica

En la obtención de algunos análogos obtenidos, se generó un nuevo centro estereogénico al formarse un nuevo enlace carbono-oxígeno por la adición del hidroxilo al carbono  $\beta$  del carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado.

Como ya se mencionó, los compuestos obtenidos se obtuvieron como mezclas inseparables de diastereómeros poco polares. La estereoquímica de cada producto se pudo comprobar por medio del análisis de los datos de resonancia magnética nuclear (principalmente mediante el análisis del experimento NOESY y la interpretación de las constantes espectroscópicas).

Los mayores excesos diastereoméricos corresponden a los compuestos **86**, **87** y **89**. Para los diastereómeros mayoritarios de esos compuestos, el isopropilo (o isopropileno) y el oxígeno se encuentran en disposición *cis*. Como se muestra en la Figura 13a, las evidencias espectroscópicas para esta asignación son las interacciones observadas en el espectro bidimensional y las constantes de acoplamiento entre los hidrógenos H2-H3b ( $^3J = 10.8$  para ambos compuestos) y H3b-H4 ( $^3J = 12.7$  y  $12.5$ , para **87** y **89**, respectivamente), propias de una orientación antiperiplanar, debida a su disposición *trans* diaxial. Entonces, dado que tanto H2 como H4 son *trans* a H3b, se sigue que aquellos hidrógenos apuntan hacia el mismo lado de la molécula y los sustituyentes unidos a C2 (O) y a C4 (isopropilo), se encuentran en disposición relativa *cis*. Esta observación es consistente con la interacción entre H2 y H4 que se observa en el espectro NOESY.



**Figura 13.** Análisis de la configuración de los diastereómeros mayoritarios de los productos: (a) **87** y **89**; y, (b) **88**

Por otro lado, para los compuestos objetivo **88** y **90** el diastereómero mayoritario corresponde al que tiene los sustituyentes *trans* (que corresponde a la estereoquímica del esqueleto de dicadalenol). En el compuesto **88**, este resultado se deduce por las interacciones observadas en el espectro NOESY

(pero en este caso, entre el hidrógeno enlazado a C2 y los enlazados a C11 y a C13 y C14. Las constantes de acoplamiento de los hidrógenos enlazados a C2, C3 y C4 refuerzan la observación anterior, puesto que para el caso del diastereómero *trans* (mayoritario), las constantes de que se habla son  $^3J_{2,3b} = 11.8$  Hz (disposición *trans* diaxial) y  $^3J_{3b,4} = 4.1$  Hz (adecuada para una disposición pseudoequatorial del hidrógeno 3b), aunque no de manera tan contundente como el caso de los otros compuestos, lo que se muestra en la Figura 13b.

Cabe señalar que la estereoselectividad de la reacción es de regular a moderadamente buena y estuvo controlada por el sustrato, puesto que el compuesto **83**, perilaldehído (**85**) o felandral (**90**), tienen un centro estereogénico que proporciona la información estereoquímica a la reacción.

El diastereómero deseado del producto objetivo (**88**) se obtuvo como mayoritario, aunque el exceso diastereomérico es de solo 8 % (es decir, se obtuvieron prácticamente en relación 1:1).

En efecto, la estereoselectividad en la obtención de **88** disminuyó considerablemente en relación con la reacción con perilaldehído (se obtienen ambos isómeros en relación aproximada 1:1, de acuerdo con el análisis por RMN  $^1\text{H}$ ). La mayor planaridad de **83** con respecto a **85** puede ser la razón que explique esta menor selectividad, debido a que no ocurre la diferenciación derivada de la información estereoquímica proveniente de la enona.

Es decir, la presencia de centros estereogénicos, como ya se mencionó, derivó en la diferenciación de la proporción en que ambos diastereómeros se señalaron; sin embargo, la utilización como sustrato del compuesto **83** tiene un menor impacto en la estereoselectividad de la reacción, en comparación con el uso de **85** y **90**.

La observación anterior se puede explicar por las diferentes conformaciones que adopten los compuestos, particularmente en relación con el centro estereogénico. El sustituyente en ambos casos es un propilo (o isopropileno).

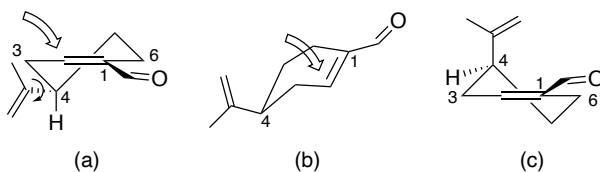
En primer lugar, la presencia o ausencia de doble enlace aparentemente no hace diferencia entre los compuestos obtenidos con los sustratos **85** y **85'**, por lo que no hay evidencia de que el doble



enlace del isopropileno tenga efecto importante en la conformación que adopta el sustrato, y consecuentemente en la estereoselectividad de la reacción.

La diferencia a la que se ha hecho referencia anteriormente debe radicar, entonces, en la orientación del isopropilo (que desde luego influye en la conformación total del compuesto). Ahora bien, en el aldehído **83** el isopropilo se encuentra en un anillo dihidrobencenoide, que tiene cuatro carbonos  $sp^2$ , que además está fusionado con otro anillo de benceno. Estos factores propician que el anillo sea bastante plano y por lo tanto el efecto de protección del isopropilo sobre las caras proquirales es muy pequeño, y consecuentemente estereoselectividad de la reacción en la formación de los compuestos **88** y **90** es baja. Entonces, a pesar de que el isopropilo se ubica en una posición pseudoecuatorial, que si bien favorece la preferencia de reactividad de una de las caras, no es suficiente para provocar gran estereodiferenciación entre ellas. Es decir, el isopropilo no impide de manera significativa el acercamiento del nucleófilo por la cara hacia la que preferentemente apunta.

Por otro lado, en el caso de los sustratos **85** y **90**, hay una mayor libertad conformacional (puesto que el ciclo solo tiene dos carbonos  $sp^2$ ), lo que podría dar lugar a conformeros en los que las caras del compuesto se diferencien por impedimento para acercamiento del nucleófilo. Al respecto, existe un estudio conformacional sobre perilaldehído (**85**), sustentado en datos espectroscópicos y teóricos, en el que se propone que el compuesto tiene tres conformeros mayoritarios. En estos, el anillo de ciclohexeno tiene conformación de media silla con el isopropenilo en disposición pseudoecuatorial. La variación entre los tres es que puede haber rotación del enlace que une el isopropenilo con el anillo. En conjunto, estos conformeros suman una abundancia relativa del 93 % a temperatura ambiente, de acuerdo con la distribución de Boltzman (Figura 14a). El segundo y tercer conformeros siguientes en energía tienen 1.24 y 1.75 kJ/mol, con respecto al de menor (al que se le asignó energía relativa de 0 kJ/mol).<sup>91</sup> Adicionalmente, se representó la forma de bote (Figura 14b) por considerar que también puede explicar la estereoselectividad observada, aunque la forma en que se realizaron los cálculos en el estudio citado fue restringida para dejar los carbonos 5 y 6 en posiciones invariables, por lo que la energía de este otro posible conformero no se calculó. Cabe añadir que en el estudio teórico se mostró que uno de los conformeros de media silla con el isopropenilo en posición axial (Figura 14c), es el cuarto más estable, con energía relativa (en relación con el más estable) de 5.34 kJ/mol.<sup>91</sup>



**Figura 14.** Representación de las diferentes conformaciones del anillo de ciclohexeno en **85**.

Confórmeros de media silla con isopropenilo en posición pseudoecuatorial, varían por el giro entre el isopropenilo y el carbono 4 del ciclo; (b) la conformación de bote es otra alternativa que explicaría la regioselectividad; (c) confórmeros de media silla con isopropenilo en posición pseudoaxial, en energía (5.34 kJ/mol).

### 6.2.2. Propuesta biogenética de la formación de dicadalenol

Como se ha indicado, el dicadalenol es un disesquiterpenoide, formado por dos unidades de cadinanos. Entonces, la biogénesis de dicadalenol inicia por la ruta formación de los sesquiterpenos, en la que se enlazan tres unidades de isoprenoides cabeza-cola para formar el catión (*E,Z*)-farnesilo y la ciclación adecuada para dar lugar, sucesivamente a los cationes germacrilo y cadinilo, con modificaciones, se obtienen dos unidades de cadinanos.<sup>92</sup> Posteriormente, la formación de dicadalenol continúa por medio de la formación de un aducto formado entre ambas unidades y su posterior funcionalización (Esquema 26).

Debido a que se informó el aislamiento del compuesto inuloidina (**43**) de *H. inuloides*<sup>42</sup>, se pensó que este compuesto podría ser un intermediario en la biogénesis del dicadalenol (**49**), después de un paso de oxidación, para formar “inuloidona” y una reacción, mediante diversas alternativas con 7-hidroxicadalenol (**40**) y algunos pasos posteriores de funcionalización darían lugar a **49** (como fue planteado en el Esquema 12).

Sin embargo, los resultados aquí obtenidos indican que esa hipótesis de formación no es plausible a la luz de la reactividad de los cadinanos y de los sistemas carbonílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados, a pesar de la existencia del hipotético intermediario **43**. En ese sentido, se propone una ruta similar, en la que **40** reaccionaría con el aldehído derivado de **42**.

Este paso podría estar facilitado por al menos una enzima –quizá con cocatalizador, ya que la organocatálisis en nuestros ensayos no fue suficiente–, debido a la enantioselectividad en la formación de dicadalenol, puesto que mediante la metodología aquí empleada, pese a la información estereoquímica del sustrato, la reacción no es estereoselectiva; además, existe un paso adicional: la hidratación del doble enlace C1'-C14', que podría estar mediado por la misma u otra enzima. La necesidad de una enzima para que haya hidratación también se deduce de la dificultad experimental para hidratar el enlace y de la diastereoselectividad de la reacción, a pesar de la aparente planaridad y poca estereodiferenciación entre las caras. Es posible que sea la misma enzima la que catalice ambas reacciones, dada la inestabilidad del compuesto **88** y tomando en consideración la existencia de enzimas en las que se llevan a cabo varias reacciones, incluso con intermediarios poco favorecidos que son estabilizados por las enzimas, como ocurre en la formación de triterpenos.<sup>93</sup>

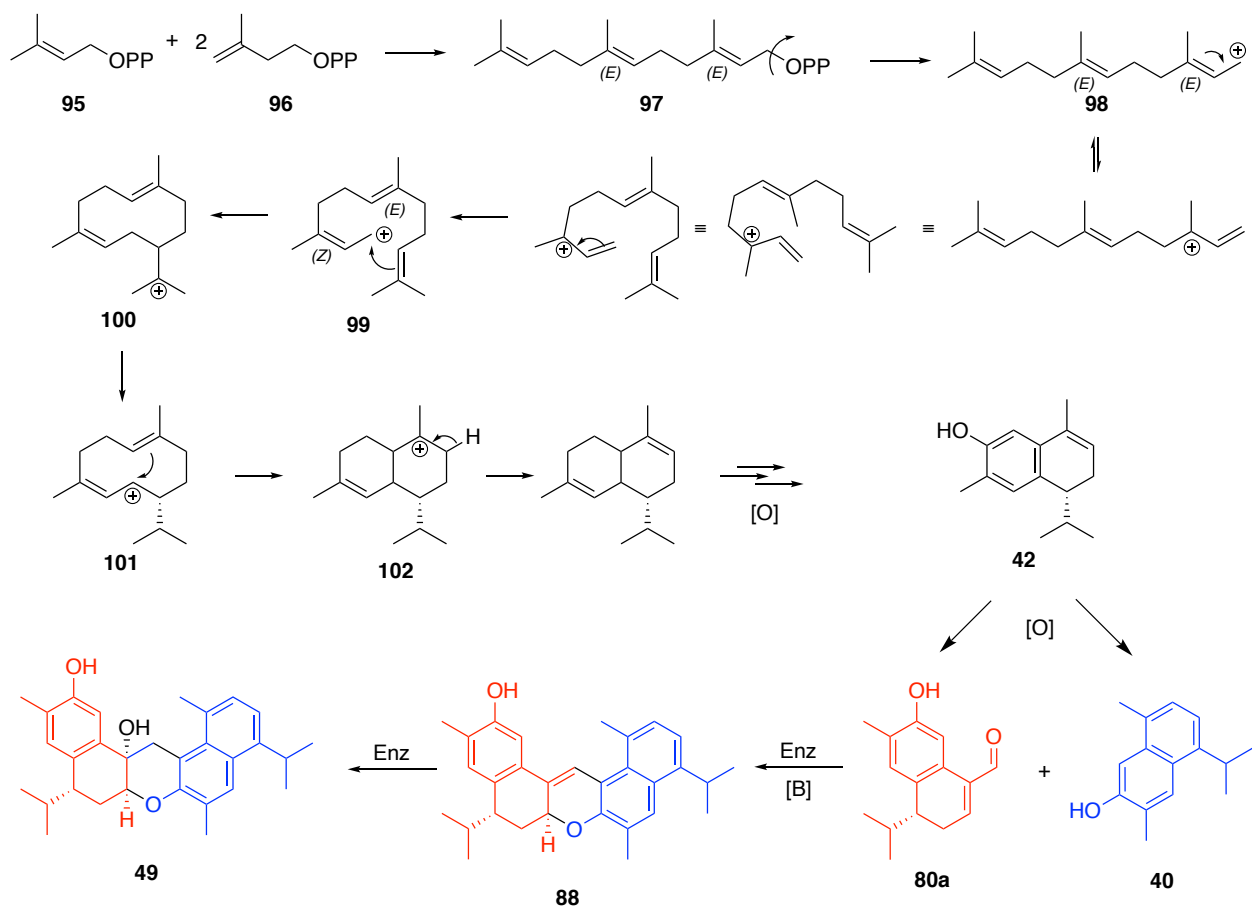
Se sabe de compuestos naturales que contienen boro, y se cree que este elemento y sus compuestos podrían actuar, entre otros, como reguladores de enzimas metálicas (ya sea inhibidores, estimuladores o estabilizadores), aunque se desconoce si esa regulación es relevante a concentraciones normales de boro.<sup>94</sup> Se ha informado sobre la influencia del contenido de metabolitos secundarios en función del contenido de boro en agua de riego,<sup>95</sup> aunque también hay consecuencias por su deficiencia, dado el rol que tiene en la constitución de la membrana celular y de la pared celular, e incluso se ha establecido cambios en los requerimientos de compuestos de boro y la coincidencia de falta de éstos junto a otros tipos de estrés, puede resultar en la superación de la capacidad de las células para enfrentar los efectos de las especies reactivas de oxígeno.<sup>96</sup>

Debido al intrincado y delicado equilibrio ecológico que existe, y teniendo en cuenta las observaciones derivadas de este estudio, además de la poca abundancia con que se ha encontrado dicadalenol (**48**), se puede sugerir que su producción responde condiciones de estrés, y que incluso en sistemas biológicos, compuestos de boro son los responsables de la formación de este compuesto, ya sea como respuesta a un exceso de boro, o como medida para la disminución de estrés oxidante – en el que este elemento tiene un rol. No obstante, la comprobación de esta hipótesis es motivo de un estudio independiente y queda lejos del alcance de este trabajo.

Con base en lo expuesto, se hace la siguiente propuesta de biogénesis de dicadalenol (Esquema 26):

La parte inicial de la biogénesis sería la normal para la formación de cadinanos: una molécula de pirofosfato de  $\gamma,\gamma$ -dimetilalilo (pirofosfato de 3-metil-but-2-enilo, **95**) reaccionaría sucesivamente con 2 unidades de pirofosfato de isopentenilo (**96**) para formar, mediante la unión cabeza-cola de tres unidades de isoprenilo, pirofosfato de (*E,E*)-farnesilo (**97**). Este compuesto se ionizaría para formar el catión (*E,E*)-farnesilo (**98**), para poder migrar sus dobles enlaces y convertirse en el catión (*E,Z*)-farnesilo (**99**), el cual, por medio de una adición intramolecular para formar el catión germacrilo (**100**), que se isomerizaría por transposiciones de Wagner-Meerwein a **101**, el cual sufriría otra adición intramolecular para formar el ion cadinilo (**102**) que se puede transformar mediante reacciones sucesivas de oxidación y deshidratación y/o deshidrogenación, en 3,4-dihidro-7-hidroxicadalenol (**42**). En este punto, habría una divergencia para que: (a) por medio de deshidrogenación u oxidación y deshidratación, se formara 3,4-dihidro 7-hidroxicadalenol (**40**); y (b) por oxidación de C14 se produjera **80a**. Entre estos dos últimos intermediarios ocurriría una condensación que formaría el compuesto lábil **88**, posiblemente mediada por una enzima con boro como cocatalizador, y probablemente esa misma enzima catalizaría la hidratación estereoselectiva del doble enlace C8-C1' con regioquímica de Markovnikov para obtener dicadalenol (**48**).

Desde luego, no se descarta la posibilidad de que sea otra la ruta que en realidad siga; sin embargo, la reactividad de los compuestos y la información disponible, hacen que esta propuesta resulte plausible.



**Esquema 26.** Biogénesis de dicadalenol

### 6.3. Actividad moduladora de la resistencia a múltiples fármacos

Se llevó a cabo una exploración preliminar sobre la posible bioactividad como sensibilizadores de la resistencia de los metabolitos de *L. porteri* y de *H. inuloides* en las células de sarcoma uterino resistentes a mitoxantrona (MES-SA/MX2), debido al conocimiento de que éstas sobreexpresan gp-P.<sup>iv</sup> De modo que, la modulación en la resistencia observada en estas células se podría atribuir razonablemente a la acción de los compuestos probados sobre la gp-P.

En el ensayo se encontró que las ftálicas de *L. porteri* carecen de actividad en ese ensayo en estudio. Sin embargo, los cadinanos **42**, **103** y **104**<sup>v</sup> fueron capaces de revertir la resistencia.

<sup>iv</sup> Consulta en: <https://www.atcc.org/products/all/CRL-2274.aspx#characteristics>

<sup>v</sup> Estos dos compuestos se encontraban disponibles en el laboratorio.

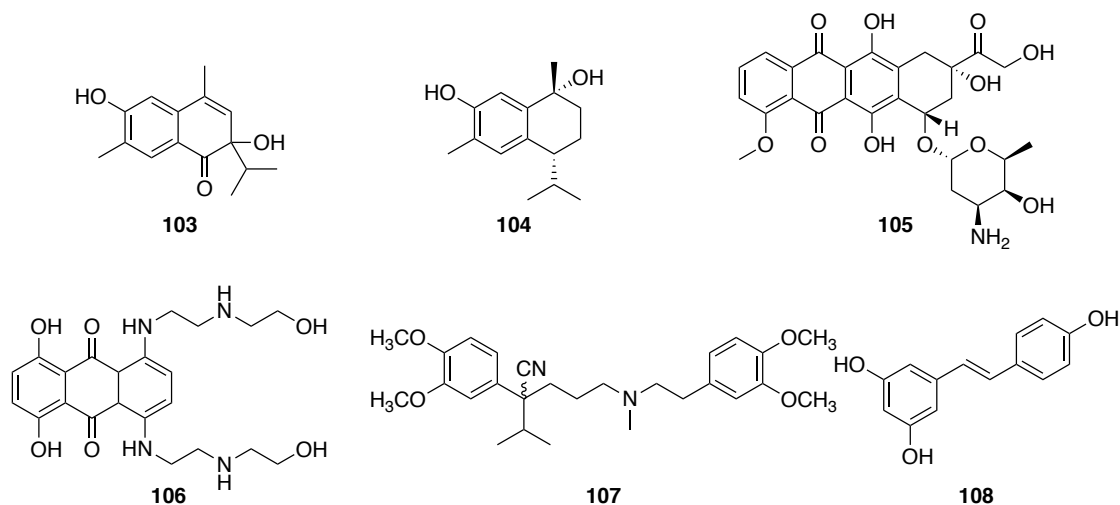
Para el experimento emplearon doxorubicina (**105**) y mitoxantrona (**106**) como agentes citotóxicos contra las células cancerosas normales (MES-SA) y las resistentes (MES-SA/MX2). Los resultados se muestran en la Tabla 8 (en la Figura 15 se muestran los cadinanos y controles). En el primer renglón, se observa en ambos casos que la IC<sub>50</sub> es en ambos casos mayor, como era esperable, para las células resistentes.

Los siguientes renglones muestran la IC<sub>50</sub> del fármaco en combinación con los compuestos señalados, donde verapamilo (**107**) y resveratrol (**108**) se utilizaron como controles positivos, todos los compuestos a una concentración de 5 μM. En general, la IC<sub>50</sub> de ambos fármacos disminuye con todos los compuestos probados (excepto para mitoxantrona (**106**), con **103**, **104** y el control **107**). El efecto más notable es el del compuesto **42** en combinación con doxorubicina (**105**), que disminuye la IC<sub>50</sub> de esta sustancia de 2.414 μM a 0.194 μM, esto implica un índice de reversión de 12.442; es decir, en presencia de **42**, se necesita 12.442 veces menos doxorubicina para causar el mismo efecto que en su ausencia. Esa disminución es menor, aunque del mismo orden de magnitud, que la provocada por verapamilo (**107**) y mayor que la del otro control (resveratrol, **108**). También es de destacarse que, para mitoxantrona (**106**), el compuesto **1** tuvo el mayor índice de reversión, esto es, que tuvo el mayor efecto en la disminución de la IC<sub>50</sub> de ese fármaco.

**Tabla 8.** Modificación de la IC<sub>50</sub> de doxorubicina (**105**) y mitoxantrona (**106**) por los cadinanos probados.

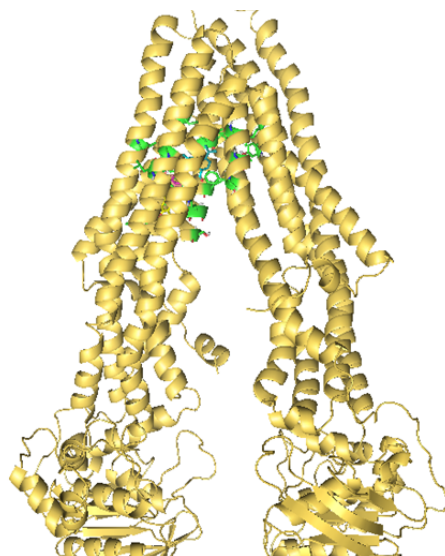
Compuesto añadido	Doxorrubicina ( <b>105</b> )		Mitoxantrona ( <b>106</b> )	
	IC <sub>50</sub> μM (I.R.) <sup>b</sup>		IC <sub>50</sub> μM (I.R.) <sup>b</sup>	
	MES-SA/MX2	MES-SA	MES-SA/MX2	MES-SA
-	2.414 <sup>a</sup>	0.050 <sup>a</sup>	0.513 <sup>a</sup>	0.029 <sup>a</sup>
<b>42</b>	0.194 (12.442)	0.010 (5.233)	0.132 (3.946)	0.012 (2.547)
<b>103</b>	1.416 (1.705)	0.015 (3.370)	1.181 (0.441)	0.014 (2.079)
<b>104</b>	0.823 (2.934)	0.046 (1.084)	0.525 (0.992)	0.023 (1.307)
Verapamilo ( <b>107</b> )	0.110 (21.890)	0.045 (1.114)	0.269 (1.936)	0.0014 (2.074)
Resveratrol ( <b>108</b> )	0.822 (2.936)	0.016 (3.077)	1.518 (0.337)	0.012 (2.538)

<sup>b</sup> Índice de reversión (I.R.) = (IC<sub>50</sub> fármaco solo) / (IC<sub>50</sub> combinación fármaco + modulador).

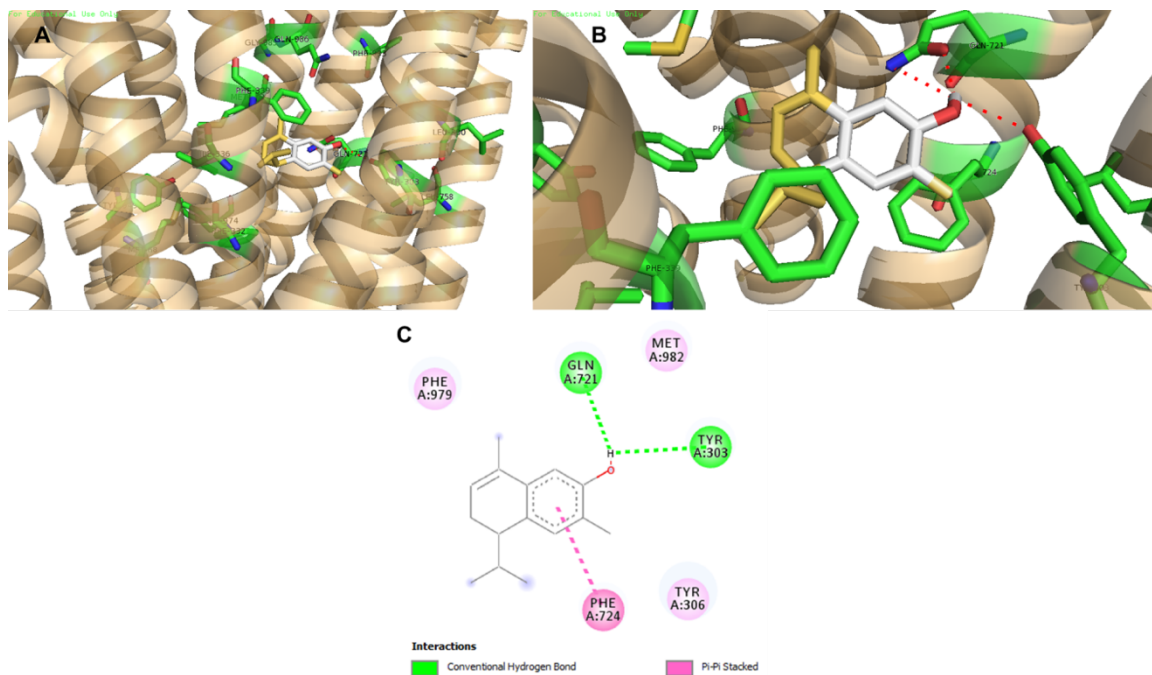


**Figura 15.** Cadinanos y controles usados en los ensayos de modulación de la resistencia.

Como se puede observar en la Figura 16 y en la Figura 17, los resultados del modelado molecular, muestran que el cadinano **42**, el más activo en los estudios experimentales muestran que éste se localiza en la parte superior del canal formado por la proteína MDR1. El tipo de interacciones que son observadas son  $\pi$ - $\pi$  y puente de hidrógeno con los residuos Tyr-303 y Gln-72. Esto podría indicar que incide en el funcionamiento del mecanismo de expulsión de los fármacos (es decir, impide la apertura del canal hacia el exterior de la célula), o bien podría ser que sea un sustrato más afín que se expulsa preferentemente por la gp-P, ya que se ha mostrado que enlaces de hidrógeno con esos sitios de la zona altamente hidrofóbica, podrían contribuir a una unión más fuerte entre ambos TMD,<sup>97-99</sup> además de que la interacción con el residuo Tyr-306 obstruye el acceso a fármacos como paclitaxel dentro de la gp-P.<sup>63</sup>



**Figura 16.** Interacción de los cadinanos en la estructura de gp-P.



**Figura 17.** Interacción de **42** con la gp-1 (MDR1): (A) y (B) acercamiento a la forma tridimensional; (C) diagrama bidimensional de interacciones de **1** con sitios de gp-P.

Los resultados obtenidos muestran posibilidad de que los cadinanos cumplan con la función de inhibir la gp-P. La analogía y fragmentos estructurales compartidos con los compuestos aquí sintetizados han impulsado la exploración *in vivo* e *in silico* de las propiedades biológicas de los



derivados de los cadinanos. Particularmente, de los aductos se ha enfocado en la actividad *in silico*, dada la labilidad de estos, que se ha mencionado en el apartado respectivo.

En este último aspecto, se encontró que los análogos de dicadalenol tuvieron interacción cerca del mismo sitio que **42**. Particularmente, el compuesto que resultó mas afin, de acuerdo con las energías de activación fue **88b** (el diastereómero del esqueleto de dicadalenol), como se muestra en la Figura 18, que tuvo interacciones tipo  $\pi$ - $\pi$  con los residuos Phe-339 y Phe-299. De modo que estos análogos tienen potencial actividad como moduladores de la resistencia a múltiples fármacos, a través de la inhibición con la gp-P. Se ha informado que otros inhibidores con estructura de oligopéptidos cíclicos tienen interacciones hidrofóbicas con los residuos Phe-339 y Phe-766, como las que muestra **88b** con la gp-P,<sup>97</sup> por lo que es posible que los compuestos sintetizados posean también actividad inhibitoria frente a este mecanismo de resistencia.

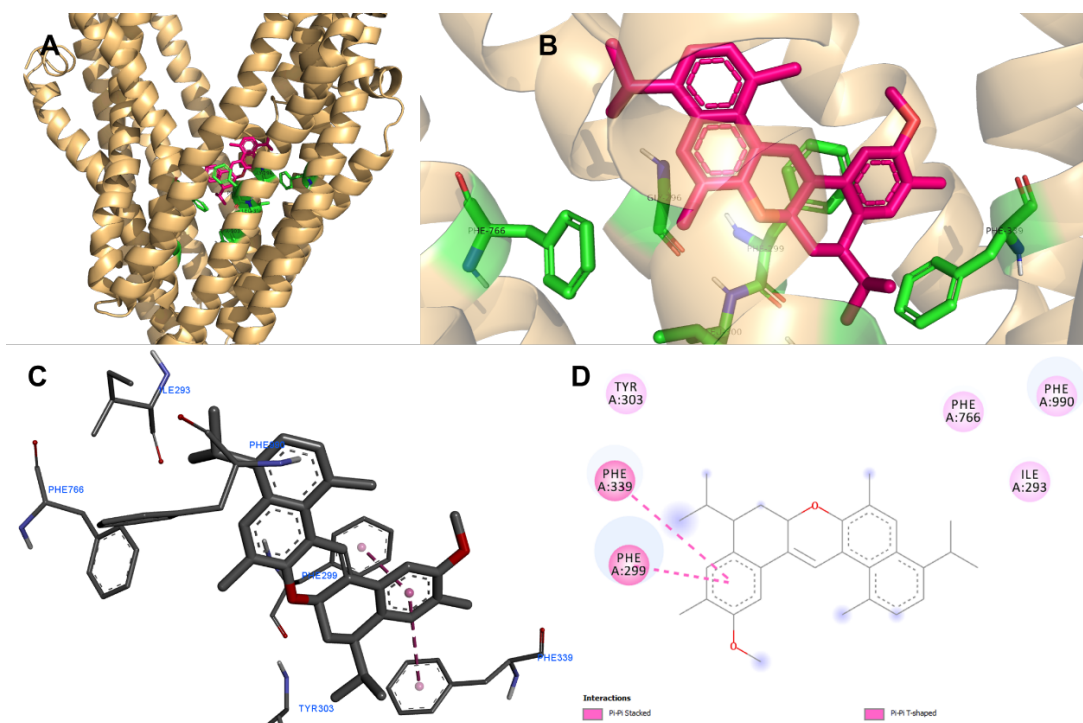


Figura 18. Interacción de gp-P con **88b**.

## 7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo se confirmó que la hidrogenación catalítica de diligustílida da lugar al producto **10** y que el compuesto **69** es el producto natural aislado de *L. chuanxiong*. De acuerdo con los resultados de los ensayos *in vitro* e *in silico*, estos compuestos tienen actividad progestacional. Estas conclusiones son relevantes en términos de la asociación adecuada entre la estructura que se propuso para un compuesto cuya actividad como agonista del receptor de progesterona es la del orden de nanomolar, apropiada para un compuesto líder o cabeza de serie para una diana molecular definida, además de hacer una propuesta sobre la biogénesis de ese compuesto, adecuada a la estructura molecular confirmada.

Se llevó a cabo la preparación de análogos de dicadalenol. La estrategia inicial de cicloadición de carbonilos a carbonilos  $\alpha,\beta$ -insaturados, o el intento de conducir esta reacción por mecanismos iónicos fue fallida. Sin embargo, se encontró que estos compuestos pueden ser obtenidos a través de una reacción de adición 1,4 del hidroxilo de los 7-hidroxicadalenos a un sistema carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado, mediante la catálisis por la mezcla de ácidos acético y borónico; con otros catalizadores (ácidos, básicos y anfotéricos, como DAED) no se observó la reacción, lo que puede ser consecuencia de la sustitución de los cadinanos, en relación con el 2-naftol. El descubrimiento de esta reactividad ha permitido la obtención de variedad estructural partiendo de productos naturales, y constituye un hallazgo significativo tendiente a la preparación de una serie de compuestos con presumible actividad antiinflamatoria.

Es destacable que este estudio mostró que la catálisis con ácido fenilborónico es una alternativa adecuada para la adición de naftoles impedidos, como los cadinanos, para su adición conjugada a enales y enonas, dado que fue el único catalizador capaz de que se llevara a cabo esta adición, lo que da indicativo de que una posible ruta biogénica implique una enzima que involucre algún centro metálico.

En este aspecto, aun se puede continuar hacia la síntesis del dicadalenol, por medio de la hidratación del doble enlace C8'-C14, y la desprotección del metoxilo. Es conveniente que tanto la

condensación que da lugar al esqueleto como la reacción de hidratación sean estereoselectivas. Esta última además debe ocurrir con la regioquímica adecuada.

Las conclusiones sobre la reactividad que se obtuvieron en este estudio, aunadas a información previamente existente, permiten hacer una propuesta biogénica de su obtención.

También es relevante el hallazgo de que la sustancia **42** es agente modulador que actúa sensibilizando a organismos resistentes a múltiples fármacos, presumiblemente mediante la inhibición de la gp-P.

El presente trabajo amplía el conocimiento de la reactividad de los productos naturales, de su biogénesis, de la metodología tendiente a la síntesis de compuestos bioactivos, y de ciertas propiedades biológicas, por lo que se lograron los objetivos propuestos en la investigación.

## 8. SECCIÓN EXPERIMENTAL

### 8.1. Procedimientos químicos generales

Los espectros de RMN se obtuvieron con un espectrómetro Bruker Ascend 700 usando la señal residual del disolvente (CDCl<sub>3</sub> o acetona-d<sub>6</sub>, Sigma-Aldrich) como referencia interna y se procesaron con el programa MestReNova (MestreLab). Los experimentos de difracción de rayos X de monocristal se realizaron en un difractómetro Bruker Smart Apex, equipado con irradiación de Mo ( $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$ ) y un detector bidimensional CCD. Los puntos de fusión se midieron con un aparato de Fisher-Johns (Cole Parmer) y no están corregidos. Los experimentos con microondas se llevaron a cabo con un reactor Anton Paar Monowave 300. Las reacciones se llevaron a cabo bajo atmósfera de N<sub>2</sub>, los disolventes se secaron mediante procedimientos estándar previo a su uso y los reactivos se utilizaron como fueron obtenidos comercialmente. Las columnas cromatográficas se prepararon con gel de sílice (malla 230-400, Macaray-Nigel). Las reacciones y columnas se monitorearon por medio de c.c.f (cromatofolios de gel de sílice en aluminio 60 F<sub>254</sub> (0.2 mm) Merck), observadas en lámpara de UV (254 y 365 nm, Spectroline) y reveladas con disoluciones de sulfato cérico amoniacal o vainillina.

#### 8.1.1. Aislamiento de productos naturales

##### *Ligusticum porteri*

Las ftálicas de *L. porteri* se aislaron de acuerdo al procedimiento informado previamente:<sup>22</sup> el material vegetal (8.1 kg de raíces) fue molido y macerado sucesivamente con hexano, acetona y metanol. El extracto acetónico (871 g) se dividió y posteriormente se fraccionó por medio de cromatografía en columna. Las ftálicas aisladas (identificadas por comparación con muestras auténticas) fueron (*Z*)-ligustílida y (*Z*)-butilidenftálica (17.1 g de mezcla), diligustílida (1.6 g), toquinólida B (5.8 g) y riligustílida (3.7 g).

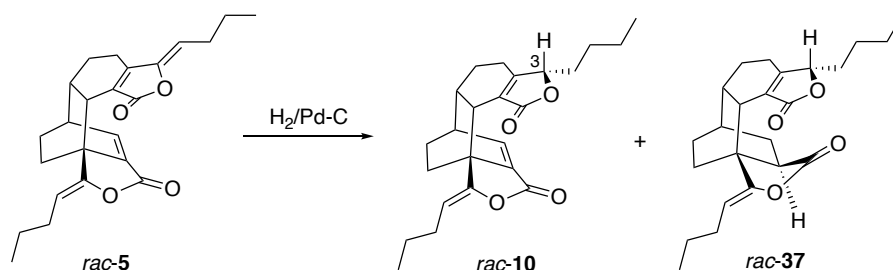
## Heterotheca inuloides

Las flores de *H. inuloides* (10 kg) se molieron y se extrajeron por maceración con acetona (3 x 24 h). El extracto (512 g) fue fraccionado por cromatografía en columna con mezclas de Hex-AcOEt de polaridad creciente. En fracciones de menor polaridad (Hex-AcOEt 95:5) se obtuvieron mezclas enriquecidas de los compuestos de interés, cuya separación se continuó por cromatografía en columna abierta y recristalización de hex. Se obtuvieron 7-hidroxicadalenol (0.8 g) y 3,4-dihidro-7-hidroxicadalenol (1.4 g), de acuerdo con la comparación con muestras auténticas.

## 8.2. Reacciones

### 8.2.1. Metabolitos de *L. porteri*

#### Hidrogenación de diligustílida



Una mezcla de *rac-5* (112.6 mg, 0.292 mmol) y Pd-C (4.2 mg) en AcOEt (10 mL) se agitó a temperatura ambiente en una atmósfera de  $H_2$  por dos horas. Se filtró en una columna de celita y se evaporó el disolvente. El producto crudo (118.2 mg) se purificó por CCA, eluyendo con Hex-AcOEt (8:2), obteniendo *rac-10* (75.5 mg, 0.196 mmol, 66.4 %) como agujas incoloras, pf 117-119 °C, Rf 0.35 (hex-AcOEt 3:2), *rac-37* (11.2 mg, 0.029 mmol, 9.9 %) como agujas incoloras, pf 106-118 °C, Rf 0.50 (hex-AcOEt 3:2) y recuperando *rac-5* (13.0 mg, 0.034 mmol, 11.6%).

#### Dihidrodiligustílida (*rac-10*)

RMN  $^1H$ : (700 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7.33, (d,  $J = 6.5$  Hz, 1H, H7'), 4.98 (t,  $J = 7.5$ , 1H, H8'), 4.56 (ddd,  $J = 7.5, 4.0, 2.0$  Hz, 1H, H3), 3.18 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H, H7), 2.97 (dq,  $J = 5.5, 2.5$  Hz, 1H, H6'), 2.54 (t,

$J = 8.0$  Hz, 1H H6), 2.18 (q,  $J = 7.5$  Hz, 1H 9'), 2.08 (dddd,  $J = 17.5, 12.5, 5.0, 2.0$  Hz, 1H, H4), 2.03 (ddd,  $J = 12.5, 10.0, 5.0$  Hz, 1H, H4'), 1.99, dd (17.5, 4.5 Hz, H4b), 1.90 (dddd,  $J = 13.5, 4.5, 1.0, 0.5$  Hz, 1H, H5a), 1.86 (dq,  $J = 9.8, 3.1$  Hz, 1H, H5'a), 1.68 (dtd,  $J = 8.0, 4.5, 1.9$  Hz, 1H, H8), 1.54 (dddd,  $J = 13.5, 12.0, 7.0, 5.0$  Hz, 1H, H5) 0.92 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3H, H11'), 0.90 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H, H11).

RMN  $^1\text{H}$  (700 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.33 (d,  $J = 6.5$  Hz, 1H, H7'), 4.98 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H, H8'), 4.56 (ddd,  $J = 7.5, 4.0, 2.0$  Hz, 1H, H3a), 3.18 (dq,  $J = 9.0, 1.4$  Hz, 1H, H7), 2.97 (dq,  $J = 5.5, 2.5$  Hz, 1H, H6'), 2.54 (t,  $J = 8.0$  Hz, 1H, H6), 2.18 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2H, H9'), 2.08 (dddd,  $J = 17.5, 12.5, 5.0, 2.0$  Hz, 1H, 4), 2.03 (ddd,  $J = 12.5, 10.0, 5.0$  Hz, 1H, H4'), 1.99 (dd,  $J = 17.5, 4.5$  Hz, 1H, H4b), 1.90 (dddd,  $J = 13.5, 4.5, 1.0, 0.5$  Hz, 1H, 5a), 1.86 (dq,  $J = 9.8, 3.1$  Hz, 1H, H5'a), 1.68 (dtd,  $J = 8.0, 4.5, 1.9$  Hz, 1H, H8), 1.54 (dddd,  $J = 13.5, 12.0, 7.0, 5.0$  Hz, 1H, H5b), 1.51 – 1.44 (m, 1H, H10'a), 1.45 – 1.35 (m, 3H, H4'b, H8b, H10'b), 1.35 – 1.25 (m, 5H, H5'b, H9, H10), 0.92 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3H, H11'), 0.90 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H, H11).

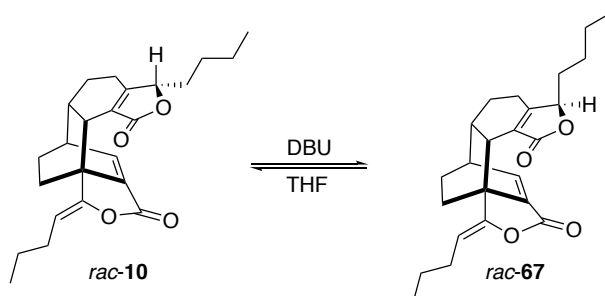
RMN  $^{13}\text{C}$  (175 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  171.9 (C1), 165.0 (C1'), 168.2 (C3a), 150.6 (C3'), 141.9 (C7'), 134.5 (C7a'), 127.1 (C7a), 108.6 (C8'), 82.5 (C3), 47.4 (C3a'), 41.6 (C6'), 41.1 (C7), 38.3 (C6), 32.2 (C8), 30.9 (C4'), 28.8 (C5), 27.5 (C9'), 26.5 (C9), 25.7 (C5'), 22.4 (C4), 22.3 (C10, C10'), 14.0 (C11'), 13.7 (C11).

#### Tetrahidrodiligustílida (*rac-37*)

RMN  $^1\text{H}$  (700 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.70 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H, H8'), 4.55 (dt,  $J = 9.5, 3.0$  Hz, 1H, H3a), 2.86 (d,  $J = 10.0$  Hz, 1H, 7), 2.59 (dddd,  $J = 18.5, 12.5, 6.0, 2.5$  Hz, 1H, H4a), 2.47 (t,  $J = 10.0$  Hz, 1H, H7a'), 2.23 (dd,  $J = 18.5, 6.0$  Hz, 1H, H4), 2.21 – 2.17 (m, 1H, H6), 2.13 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2H, H9'), 1.95 (ddd,  $J = 13.0, 9.5, 7.5$  Hz, 1H, 4'a), 1.92 – 1.88 (m, 1H, H5a), 1.85 (ddd,  $J = 13.0, 11.0, 1.5$  Hz, 1H, H4'b), 1.83 – 1.78 (m, 4H, H5'a, H6', H7'), 1.70 – 1.51 (m, 5H, H5b, H5'b, H8, H9a), 1.52 – 1.47 (m, 1H, H10'a), 1.47 – 1.41 (m, 1H, H9b), 1.41 – 1.32 (m, 3H, H10, H10'b), 0.92 (dt,  $J = 7.5$  Hz, 3H, H11'), 0.91 (dt,  $J = 7.5$  Hz, 3H, H11').

RMN  $^{13}\text{C}$  (175 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  175.3 (C1'), 171.7 (C1), 166.2 (C3a), 153.1 (C3'), 126.2 (C7a), 105.7 (C8'), 83.3 (C3), 43.8 (C3a'), 41.0 (C7a'), 38.0 (C7), 33.6 (C6'), 33.0 (C6), 31.6 (C8), 29.8 (C4'), 28.3 (C9), 27.5 (C5), 27.3 (C5'), 27.1 (C9'), 23.0 (C7'), 22.7 (C4), 22.3 (C10), 22.3 (C10'), 13.9 (C11), 13.9 (C11').

### Epimerización de dihidrodiligustílida



Una disolución de *rac-10* (160.1 mg, 0.419 mmol) y DBU (0.10 mL, 0.67 mmol) en THF (3 mL) se calentó en el reactor de microondas (160 °C, 30 min). Posteriormente, se evaporó el disolvente y al residuo se agregó HCl 10 % (5 mL) y se extrajo con AcOEt (5 x 3 mL). Las fases orgánicas se reunieron, se lavaron con salmuera (5 mL) y se secaron con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Se evaporó el disolvente y se obtuvo un residuo aceitoso color ámbar (161.2 mg) que se purificó por columna, eluyendo con Hex-AcOEt (8:2). Se obtuvo *rac-10* recuperada (108.8 mg, 0.284 mmol, 68 %) y (3*epi*)-3,8-dihidrodiligustílida, *rac-67*, (29.0 mg, 18 %) como agujas incoloras, pf 114-119 °C, Rf 0.44 (hex-AcOEt 3:2).

Alternativamente, la reacción se llevó a cabo también en microondas, con la mezcla de dihidrodiligustílida 122.6 mg, 0.321 mmol) y DBU (0.06 mL, 0.402 mmol) en THF (3 mL), pero usando calentamiento con potencia constante (120 W) a 150 °C por 30 min. El incremento de la temperatura en pasos de 10 en 10 °C hasta 170 °C no modificó el rendimiento relativo de los epímeros; pero al aumentar a 180 °C, se observó la formación de (*Z*)-ligustílida y senkyunólida A, identificadas por comparación con muestras auténticas obtenidas previamente en el laboratorio.

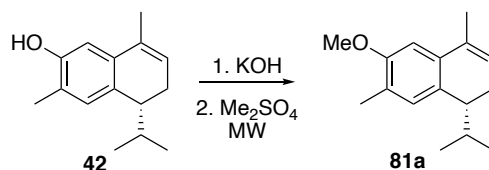
### (3*epi*)-3,8-Dihidrodiligustílida (*rac-67*)

RMN  $^1\text{H}$  (700 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.33 (d,  $J = 6.6$  Hz, 1H, H7'), 4.98 (dd,  $J = 8.0, 7.0$  Hz, 1H, H8'), 4.80 (dd,  $J = 7.5, 3.5$  Hz, 1H, H3), 3.20 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H, H7), 2.98 (dq,  $J = 6.5, 2.5$  Hz, 1H, H6'), 2.52 (dd,  $J = 8.0$  Hz, 1H, H6), 2.20 – 2.10 (m, 2H, H9'), 2.08 – 1.97 (m, 4H, H4, H4'a, H9a), 1.91 (ddt,  $J = 13.5, 4.5, 1.5$  Hz, 1H, H5'a), 1.87 (ddt,  $J = 13.5, 10.0, 3.5$  Hz, 1H, H5'b), 1.81 (dddd,  $J = 14.0, 10.5, 4.5, 3.5$  Hz, 1H, H4'b), 1.51 – 1.42 (m, 2H, H5b, H10'a), 1.43 – 1.37 (m, 2H, H8a, H10a), 1.36 – 1.22 (m, 3H, H8b, H10b, H10'b), 1.17 (dddd,  $J = 11.0, 4.5, 3.5, 2.0$  Hz, 1H, H9b), 0.91 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3H, H11'), 0.85 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H, H11).

RMN  $^{13}\text{C}$  (175 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.1 (C1), 168.2 (C3a), 165.2 (C1'), 150.6 (C3'), 142.2 (C7'), 134.6 (C7a'), 127.8 (C7a), 108.9 (C8'), 81.5 (C3), 47.6 (C3a'), 41.8 (C6'), 41.1 (C7), 38.4 (C6), 31.3 (C4'), 31.2 (C8), 29.4 (C5), 27.6 (C9'), 26.5 (C9), 25.7 (C5'), 22.5 (C10), 22.3 (C10'), 21.7 (C4), 14.1 (C11'), 14.0 (C11).

### 8.2.2. Metabolitos de *H. inuloides*

#### Protección de 3,4-dihidro-7-hidroxicadalenos (Preparación de 3,4-dihidro-7-metoxicadalenos)



Una disolución de 3,4-dihidro-7-hidroxicadalenos (**42**) (364.0 mg, 1.68 mmol) y KOH (367.3 mg, 6.55 mmol) en acetona (16 mL) se agitó durante una hora a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, se adicionó  $\text{Me}_2\text{SO}_4$  (0.18 mL, 1.90 mmol). La mezcla se calentó en el reactor de microondas a 150 °C por 30 min (calentamiento a 120 W, con enfriamiento simultáneo). Se decantó el sólido, y se evaporó el disolvente. El producto crudo (486.6 mg) se adsorbió en gel de sílice y se aplicó en una columna empacada con una suspensión de gel de sílice (20 g) en Hex; se eluyó con Hex-AcOEt (99.5:0.5). Se obtuvo **81a** como un aceite amarillo pálido (370.6 mg, 1.68 mmol, 95.6 %) Rf 0.62 (Hex-AcOEt 9:1).



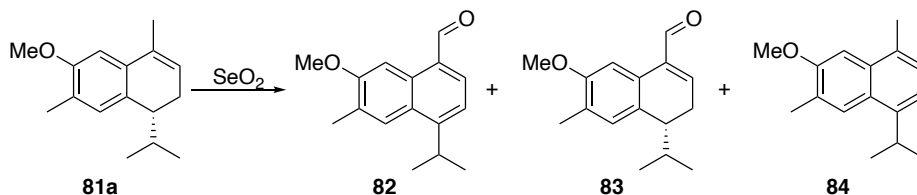
### 3,4-dihidro-7-metoxicadalenol (**81a**)

RMN <sup>1</sup>H (700 MHz, acetona-d<sub>6</sub>) δ 6.88 (t, *J* = 1.0 Hz, 1H, H5), 6.80 (s, 1H, H8), 5.68 (ddq, *J* = 6.0, 3.0, 1.5 Hz, 1H, H2), 3.83 (s, 3H, H16), 2.38 – 2.26 (m, 4H, H3, H4), 2.16 (d, *J* = 1.0 Hz, 3H, H15), 2.02 (dt, *J* = 3.0, 1.5 Hz, 3H, H14), 1.82 (oct, *J* = 7.0 Hz, 1H, H11), 0.87 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, H12), 0.78 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, H13).

RMN <sup>13</sup>C (700 MHz, acetona-d<sub>6</sub>) δ 157.4 (C7), 135.1 (C9), 132.9 (C1), 131.9 (C5), 131.7 (C10), 124.5 (C6), 123.9 (C2), 106.3 (C8), 55.8 (C16), 44.5 (C4), 31.4 (C12), 26.7 (C3), 21.9 (C13), 20.8 (C14), 19.5 (C11), 16.3 (C15).

EMAR (ADTR): *m/z* 231.17188 (calc. para [C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>O]<sup>+</sup>: 231.17489).

### Oxidación de 3,4-dihidro-7-metoxicadalenol (**81a**) (Preparación de 3,4-dihidro-7-metoxicadalen-14-al (**82**))



Una disolución de **81a** (273.4 mg, 1.19 mmol) y SeO<sub>2</sub> (772.8 mg, 6.96 mmol) en EtOH-H<sub>2</sub>O (9:1, 10 mL) se calentó a reflujo durante 2 h. La mezcla se filtró con celita-gel de sílice y el filtrado se concentró. Se añadió NaHCO<sub>3</sub> al residuo y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 5 mL); las fases orgánicas se reunieron, se lavó con H<sub>2</sub>O, salmuera, y se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El residuo se purificó por CC eluyendo con hex-AcOEt (99.05:0.5 – 99:1), obteniéndose **82** (11.9 mg, 4.1 %) como aceite amarillo, R<sub>f</sub> 0.63 (Hex-AcOEt 9:1); **83** (89.8 mg, 0.368 mmol, 30.9 %) como aceite amarillo R<sub>f</sub> 0.52 (Hex-AcOEt 9:1) y **84** (147.0 mg, 0.644 mmol, 54.2 %) como aceite transparente R<sub>f</sub> 0.50 (Hex-AcOEt 9:1). (Este procedimiento es adaptación de uno previamente informado)<sup>100</sup>.

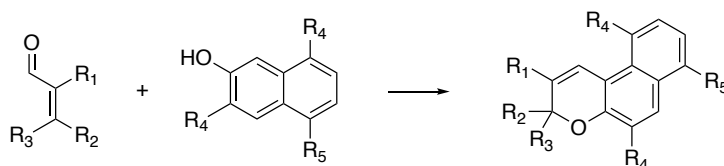
### 3,4-dihidro-7-metoxicadalen-14-al (**83**)

RMN  $^1\text{H}$  (700 MHz, acetona- $d_6$ )  $\delta$  9.67 (s, 1H, H14), 7.85 (s, 1H, H8), 7.08 (ddd,  $J = 7.0, 3.0, 1.0$  Hz, 1H, H2), 6.98 (s, 1H, H5), 3.82 (s, 3H, H16), 2.86 – 2.80 (m, 1H, H3a), 2.64 (ddd,  $J = 18.5, 7.5, 3.0$  Hz, 1H, H3b), 2.49 (td,  $J = 7.5, 3.0$  Hz, 1H, H4), 2.17 (s, 3H, H15), 1.74 (dq,  $J = 7.0$  Hz, 1H, H11), 0.88 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H, H12), 0.79 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H, H13).

RMN  $^{13}\text{C}$  (175 MHz, acetona- $d_6$ )  $\delta$  193.5 (C14), 157.1 (C7), 153.6 (C2), 138.6 (C1), 132.1 (C5), 131.4 (C10), 128.7 (C9), 126.4 (C6), 108.6 (C8), 55.7 (C16), 43.7 (C4), 32.2 (C11), 28.0 (C3), 21.6 (C12), 20.6 (13), 16.4 (C15).

EMAR (ADTR):  $m/z$  245.15411 (calculado para  $[\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{O}_2]^+$ : 245.15415)

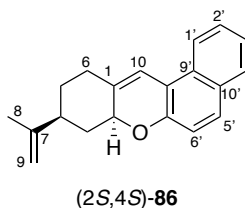
### Análogos de dicadalenol



### Procedimiento típico:

Una disolución de 2-naftol o el cadinano correspondiente (*ca.* 40 mg), el compuesto carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado (1 eq) y  $\text{PhB}(\text{OH})_2$  (1.3 eq) en Tol/AcOH (9:1) se calentó a reflujo bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  en un matraz equipado con una trampa de Dean Stark durante 26 h (excepto para la obtención de 88, que duró 48 h). Después de ese tiempo, se añadió una disolución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (5 mL). La mezcla se extrajo con  $\text{Et}_2\text{O}$  (3 x 5 mL). Las fases orgánicas se reunieron, se lavaron con una disolución saturada de  $\text{NaCl}$  y se secaron con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . El disolvente se evaporó y el residuo se disolvió en hexano y se aplicó en una columna empacada con una suspensión de gel de sílice (previamente desactivada con  $\text{Et}_3\text{N}$  0.1 % V/V en Hex), eluyendo con Hex. Los productos en

general fueron aceites amarillo pálido a intenso (que se oscurecía al permanecer seco)<sup>vi</sup>, lábiles y se obtuvieron como mezclas inseparables de diastereómeros que se caracterizaron así por medio de RMN. Los rendimientos mostrados en Figura 12 se calcularon sobre el producto aislado. Los productos **92-94** sólo se detectaron por espectrometría de masas del crudo de reacción.



Nota 1: Este aducto, además de ser obtenido por medio del procedimiento típico, descrito, se obtuvo mediante calentamiento en disolución en tolueno por 7 días dentro de un tubo sellado a 140 °C. Después de ese tiempo, se abrió el tubo, se evaporó el disolvente y se purificó por cromatografía en columna, con un rendimiento de 81 %.

Nota 2: Otro procedimiento alternativo para la obtención de este producto, consistió en someter los productos a reacción en presencia de DAED al 20 % (que fue preparado por adaptación del protocolo informado previamente)<sup>101</sup> en CHCl<sub>3</sub> a reflujo durante 4.5 h, obteniéndose un rendimiento similar a la catálisis con la mezcla de ácidos.

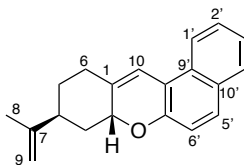
Rf 0.70 (Hex-AcOEt 9:1)

RMN <sup>1</sup>H (700 MHz, acetona-d<sub>6</sub>) δ 8.03 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H1'), 7.76 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H4'), 7.63 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H5'), 7.45 (ddd, *J* = 8.4, 6.8, 1.0 Hz, 1H, H2'), 7.30 (ddd, *J* = 8.0, 6.8, 1.0 Hz, 1H, H3'), 6.97 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H6'), 6.91 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, H10), 5.19 (dddd, *J* = 11.0, 5.4, 2.1, 1.6 Hz, 1H, H2), 4.78 (dd, *J* = 1.5, 0.9 Hz, 1H, H9a), 4.76 (p, *J* = 1.5 Hz, 1H, H9b), 2.69 (ddd, *J* = 14.4, 4.2, 2.5 Hz, 1H, H6), 2.34 – 2.27 (m, 3H, H3a, H4, H6), 1.91 (ddq, *J* = 12.7, 5.1, 2.5 Hz, 1H, H5), 1.82 – 1.77 (m, 1H, H3b), 1.78 (t, *J* = 1.5 Hz, 3H, H8), 1.38 (dtd, *J* = 13.7, 12.7, 12.1, 4.3 Hz, 1H, H5).

<sup>vi</sup> Se encontró que almacenarlos en solución en hexano o acetona, era preferible a hacerlo en seco, incluso a temperatura baja.

RMN  $^{13}\text{C}$  (175 MHz, acetona- $d_6$ )  $\delta$  151.7 (C7'), 149.6 (C7), 137.6 (C1), 130.5 (C9'), 130.4 (C10'), 129.4 (C4'), 129.2 (C5'), 127.3 (C2'), 124.1 (C3'), 122.0 (C1'), 118.1 (C6'), 114.3 (C8'), 113.0 (C10), 109.8 (C9), 77.7 (C2), 43.9 (C4), 40.8 (C3), 33.2 (C6), 32.7 (C5), 21.1 (C8).

EMAR (ADTR): m/z

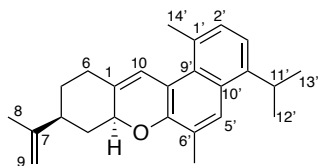


Rf 0.70 (Hex-AcOEt 9:1)

RMN  $^1\text{H}$  (700 MHz, acetona- $d_6$ )  $\delta$  8.02 (d,  $J = 8.4$  Hz, 4H, H1'), 7.77 (d,  $J = 8.0$  Hz, 3H, H4'), 7.64 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H, H5'), 7.45 (ddd,  $J = 8.4, 6.7, 1.9$  Hz, 1H, H2'), 7.32 (dd,  $J = 8.0, 6.8, 1.0$  Hz, 1H, H3'), 7.01 (dd,  $J = 8.7, 0.8$  Hz, 1H, H6'), 6.92 – 6.89 (m, 1H, H10), 5.19 – 5.16 (m, 1H, H2), 4.93 (h,  $J = 1.5$  Hz, 1H, H9a), 4.90 (td,  $J = 1.7, 0.9$  Hz, 1H, H9b), 2.70 – 2.68 (m, 1H, H4), 2.51 – 2.47 (m, 1H, 6a), 2.48 – 2.44 (m, 1H, H3a), 2.40 (dddd,  $J = 16.6, 8.9, 6.2, 4.1$  Hz, 1H, H6b), 2.10 – 2.07 (m, 1H, H3b), 2.04 – 1.99 (m, 1H, H5a), 1.81 (dt,  $J = 1.6, 0.8$  Hz, 3H, H8), 1.78 – 1.75 (m, 1H, H5b).

RMN  $^{13}\text{C}$  (175 MHz, acetona- $d_6$ )  $\delta$  152.0 (C7'), 147.6 (C7), 137.6 (C1), 130.6 (C10'), 130.5 (C9'), 129.4 (C4'), 129.1 (C5'), 127.3 (C2'), 124.3 (C3'), 122.3 (C1'), 118.2 (C6'), 115.8 (C8'), 114.0 (C10), 111.5 (C9), 74.4 (C2), 39.6 (C4), 36.3 (C3), 28.6 (C6), 28.4 (C5), 22.3 (C8).

EMAR (ADTR): m/z

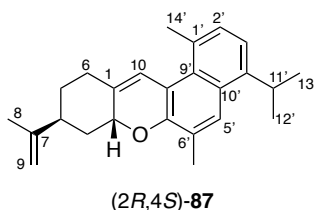


Rf 0.72 (Hex-AcOEt 9:1)

RMN  $^1\text{H}$  (700 MHz, acetona- $d_6$ )  $\delta$  7.81 (s, 1H, H5'), 7.13 (d,  $J = 7.3$  Hz, 1H, H2'), 7.10 (d,  $J = 7.3$  Hz, 1H, H3'), 7.08 (t,  $J = 2.5$  Hz, 1H, H10), 4.93 (dddd,  $J = 10.8, 6.4, 2.5, 1.0$  Hz, 1H, H2), 4.78 (dq,  $J = 1.5, 1.0$  Hz, 1H, H9a), 4.76 (p,  $J = 1.5$  Hz, 1H, H9b), 3.66 (hept,  $J = 6.9$  Hz, 1H, H11'), 2.74 (s, 3H, H14'), 2.65 (ddt,  $J = 15.3, 4.4, 2.5, 1.0$  Hz, 1H, H6a), 2.39 (ddt,  $J = 12.2, 6.4, 2.5$  Hz, 1H, H3a), 2.35 (dddt,  $J = 15.3, 12.7, 5.1, 2.5$  Hz, 1H, H6b), 2.32 (s, 3H, H15'), 2.20 (tt,  $J = 12.7, 2.5$  Hz, 1H, H4), 1.83 (ddq,  $J = 12.7, 5.1, 2.5$  Hz, 1H, H5a), 1.78 (t,  $J = 1.5, 1.0$  Hz, 3H, H8), 1.71 (ddd,  $J = 12.7, 12.2, 10.8$  Hz, 1H, H3b), 1.33 (qd,  $J = 12.7, 4.4$  Hz, 1H, H5b), 1.33 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H, H12'), 1.32 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H, H13').

RMN  $^{13}\text{C}$  (175 MHz, acetona- $d_6$ )  $\delta$  151.9 (C7'), 149.8 (C7), 143.1 (C4'), 133.0 (C1), 131.5 (C9'), 130.8 (C1'), 130.2 (C2'), 128.9 (C10'), 126.0 (C6'), 125.2 (C5'), 119.9 (C3'), 119.2 (C10), 117.0 (C8'), 109.6 (C9), 75.3 (C2), 43.2 (C4), 39.6 (C3), 32.6 (C6), 31.7 (C5), 29.0 (C11'), 26.3 (C14'), 24.1 (C12'), 23.9 (C13'), 21.0 (C8), 17.1 (C15').

EMAR (ADTR):  $m/z$  347.23599 (calc. para  $[\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{O}]^+$ : 347.23749).

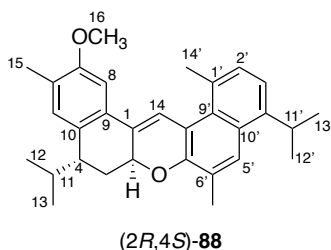


Rf 0.72 (Hex-AcOEt 9:1)

RMN  $^1\text{H}$  (700 MHz, acetona- $d_6$ )  $\delta$  7.84 (s, 1H, H5'), 7.15 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1H, H2'), 7.10 (d,  $J = 7.4$  Hz, 3H, H3'), 7.00 (q,  $J = 1.9$  Hz, 1H, H10), 4.88 – 4.83 (m, 1H, H2), 4.83 (q,  $J = 1.2$  Hz, 2H, H9), 3.66 (hept,  $J = 6.7$  Hz, 1H, H11'), 2.72 (s, 3H, 14'), 2.62 – 2.54 (m, 1H, H4), 2.51 – 2.45 (m, 2H, H6), 2.35 (s, 3H, H15'), 2.33 – 2.29 (m, 1H, H3a), 2.12 – 2.06 (m, 1H, H3b), 1.78 (t,  $J = 1.0$  Hz, 3H, H8), 1.77 – 1.74 (m, 1H, 5a), 1.33 (dd,  $J = 6.9, 1.2$  Hz, 5H, 5, 12', 13'), 1.32 – 1.28 (m, 1H, H5b), 1.33 (d,  $J = 6.5, 3\text{H}$ , H12'), 1.32 (d,  $J = 6.5, 3\text{H}$ , H13').

RMN  $^{13}\text{C}$  (175 MHz, acetona- $d_6$ )  $\delta$  152.5 (C7'), 149.0 (C7), 143.0 (C4'), 133.0 (C1), 131.1 (C9'), 130.7 (C1'), 129.9 (C2'), 128.8 (C10'), 126.1 (C6'), 125.3 (C5'), 121.0 (C10), 120.1 (C3'), 118.5 (C8'), 110.3 (C9), 73.0 (C2), 38.4 (C4), 34.2 (C3), 29.0 (C11'), 27.6 (C5), 27.2 (C6), 25.6 (C14'), 24.1 (C12), 23.9 (C13), 21.5 (C8), 17.2 (C15').

EMAR (ADTR):  $m/z$  347.23599 (calc. para  $[\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{O}]^+$ : 347.23749).

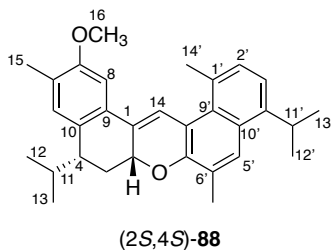


Rf 0.63 (Hex-AcOEt 9:1)

RMN  $^1\text{H}$  (700 MHz, acetona- $d_6$ )  $\delta$  7.92 (s, 1H, H5'), 7.80 (d,  $J = 2.1, 0.8$  Hz, 1H, H14), 7.38 (s, 1H, H8), 7.24 (d,  $J = 7.3$  Hz, 1H, H2'), 7.21 (d,  $J = 7.3$  Hz, 1H, H3'), 6.96 (s, 1H, H5), 4.88 (ddd,  $J = 11.8, 5.7, 2.1$  Hz, 1H, H2), 3.90 (s, 3H, H16), 3.73 (hept,  $J = 6.9$  Hz, 2H, H11'), 2.84 (s, 3H, H14'), 2.78 (dddd,  $J = 12.2, 5.7, 3.1, 0.8$  Hz, 1H, H3a), 2.55 (ddd,  $J = 9.6, 4.1, 3.1$  Hz, 1H, H4), 2.42 (d,  $J = 1.0$  Hz, 3H, H15'), 2.21 (s, 3H, H15), 2.07 (ddd,  $J = 12.2, 11.8, 4.1$  Hz, 1H, H3b), 1.67 (dheptd,  $J = 9.6, 6.6, 0.8$  Hz, 1H, H1), 1.35 (d,  $J = 6.9$  Hz, 6H, H12', H13'), 1.07 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H, H12), 0.91 (d,  $J = 6.6$  Hz, H13, 3H).

RMN  $^{13}\text{C}$  (175 MHz, acetona- $d_6$ )  $\delta$  157.9 (C7), 154.6 (C7'), 143.2 (C4'), 133.6 (C10), 133.1 (C5), 132.1 (C1'), 132.0 (C9'), 130.8 (C9), 130.1 (C2'), 129.0 (C10'), 126.1 (C6), 126.0 (C6'), 126.0 (C5'), 124.2 (C1), 120.5 (C3'), 119.7 (C8'), 118.9 (C14), 105.5 (C8), 72.2 (C2), 55.7 (C16), 46.1 (C4), 32.3 (C11), 31.6 (C3), 29.1 (C11'), 24.9 (C14'), 23.9 (C12', C13'), 22.3 (C12), 21.2 (C13), 17.0 (C15'), 16.3 (C15).

EMAR (ADTR):  $m/z$  441.27846 (calc. para  $[\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{O}]^+$ : 441.27935).

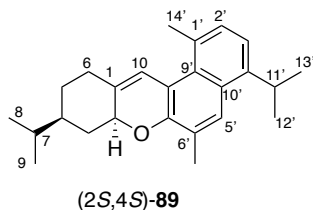


Rf 0.63 (Hex-AcOEt 9:1)

RMN <sup>1</sup>H (700 MHz, acetona-d<sub>6</sub>) δ 7.92 (s, 1H, H5'), 7.56 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H14), 7.26 (s, 1H, H8), 7.24 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, H2'), 7.20 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, H3'), 7.05 (s, 1H, H5), 4.84 (ddd, *J* = 6.2, 5.3, 2.2 Hz, 1H, H2), 3.92 (s, 3H, H16), 3.71 (hept, *J* = 6.9 Hz, 1H, H11'), 2.89 (s, 3H, H14'), 2.58 (td, *J* = 7.0, 4.0 Hz, 1H, H4), 2.43 (d, *J* = 1.0 Hz, 3H, H15'), 2.40 (ddd, *J* = 13.6, 7.0, 5.3 Hz, 1H, H3a), 2.27 (ddd, *J* = 13.6, 6.2, 4.0 Hz, 1H, H3b), 2.28 – 2.20 (m, 1H, H11), 2.21 (s, 3H, 15), 1.36 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, H12'), 1.36 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, H13'), 1.04 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, H12), 0.92 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, H13).

RMN <sup>13</sup>C (175 MHz, acetona-d<sub>6</sub>) δ 157.6 (C7), 153.8 (C7'), 143.2 (C4'), 133.2 (C10), 132.7 (C9), 132.0 (C9'), 131.8 (C1'), 130.9 (C5), 130.1 (C2'), 129.0 (C10'), 126.1 (C1), 126.1 (C6), 126.0 (C6'), 126.0 (C5'), 120.5 (C3'), 120.0 (C14), 119.6 (C8'), 106.5 (C8), 74.2 (C2), 55.6 (C16), 44.9 (C4), 30.0 (C3), 29.8 (C11), 29.1 (C11'), 25.1 (C14'), 24.2 (C12'), 24.1 (C13'), 22.3 (C12), 19.3 (C13), 17.1 (C15'), 16.4 (C15).

EMAR (ADTR): m/z 441.27846 (calc. para [C<sub>25</sub>H<sub>31</sub>O]<sup>+</sup>: 441.27935).

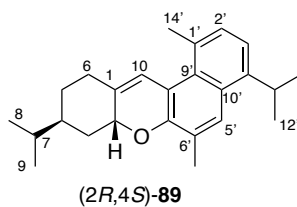


Rf 0.71 (Hex-AcOEt 9:1)

RMN  $^1\text{H}$  (700 MHz, acetona- $d_6$ )  $\delta$  7.81 (s, 1H, H5'), 7.13 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H, 2'), 7.10 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H, H3'), 7.08 (t,  $J = 2.5$  Hz, 1H, H10), 4.92 (ddtd,  $J = 10.8, 6.0, 2.5, 1.0$  Hz, 1H, H2), 3.66 (hept,  $J = 6.8$  Hz, 1H, H11'), 2.75 (s, 3H, H14'), 2.65 (dddd,  $J = 15.2, 4.0, 2.5, 1.0$  Hz, 1H, H6a), 2.35 (ddt,  $J = 12.5, 6.0, 2.5$  Hz, 1H, H3a), 2.33 (s, 3H, H15'), 2.30 (dddt,  $J = 15.2, 12.5, 5.2, 2.5$  Hz, 1H, H6b), 1.79 (ddq,  $J = 12.5, 5.2, 2.5$  Hz, 1H, H5a), 1.60 (heptd,  $J = 7.0, 5.2$  Hz, 1H, H7), 1.52 (td,  $J = 12.5, 10.8$  Hz, 1H, H3b), 1.42 (dddt,  $J = 12.5, 11.6, 5.2, 2.5$  Hz, 1H, H4), 1.33 (d,  $J = 6.8$  Hz, 4H, H12'), 1.32 (d,  $J = 6.8$  Hz, 2H, H13'), 1.15 (tdd,  $J = 12.5, 11.6, 4.0$  Hz, 1H, H5b), 0.95 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H, H8), 0.95 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H, H9).

RMN  $^{13}\text{C}$  (175 MHz, acetona- $d_6$ )  $\delta$  152.0 (C7'), 143.1 (C4'), 133.8 (C1), 131.5 (C1'), 130.9 (C9'), 130.2 (C2'), 128.9 (C10'), 126.0 (C6'), 125.1 (C5'), 119.9 (C3'), 118.9 (C10), 117.1 (C8'), 75.7 (C2), 42.2 (C4), 37.8 (C3), 33.2 (C7), 32.7 (C6), 29.6 (C5), 29.1 (C11'), 26.3 (C14'), 24.1 (C12'), 23.9 (C13'), 20.0 (8), 19.9 (C9), 17.1 (15').

EMAR (ADTR): 353.28347 (calc. para  $[\text{C}_{25}\text{H}_{37}\text{O}]^+$ : 353.28444).



Rf 0.71 (Hex-AcOEt 9:1)

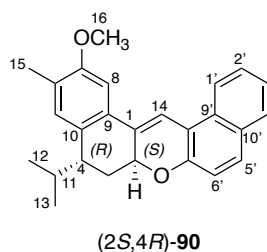
RMN  $^1\text{H}$  (700 MHz, acetona- $d_6$ )  $\delta$  7.83 (s, 1H, H5'), 7.15 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H, H2'), 7.10 (d,  $J = 7.5$  Hz, 7H, H3'), 7.00 (dd,  $J = 2.5, 1.5$  Hz, 1H, H10), 4.82 (ddd,  $J = 6.3, 5.5, 1.5$  Hz, 1H, H2), 3.68 (hept,  $J = 6.8$  Hz, 1H, H11'), 2.73 (s, 3H, H14'), 2.53 – 2.45 (m, 2H, H6), 2.35 (s, 3H, H15'), 2.17 (dt,  $J = 14.0, 7.8, 5.5$  Hz, 1H, H3a), 1.98 (ddd,  $J = 14.0, 6.3, 3.5$  Hz, 1H, H3b), 1.77 – 1.59 (m, 4H, H4, H5,



H7), 1.33 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H, H12'), 1.32 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H, H13'), 0.99 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H, H8), 0.96 (d,  $J = 6.5$  Hz, 1H, H9).

RMN  $^{13}\text{C}$  (175 MHz, acetona- $d_6$ )  $\delta$  152.6 (C7'), 143.0 (C4'), 131.8 (C1'), 131.4 (C1), 131.1 (C9'), 129.9 (C2'), 128.8 (C10'), 126.2 (C6'), 125.2 (C5'), 120.7 (C10), 120.0 (C3'), 118.4 (C8'), 73.1 (C2), 38.5 (C4), 33.5 (C3), 30.5 (C7), 29.1 (C11), 27.3 (C6), 26.4 (C5), 25.6 (C14'), 24.1 (C12'), 23.9 (C13'), 20.0 (C8), 19.9 (C9), 17.1 (C15').

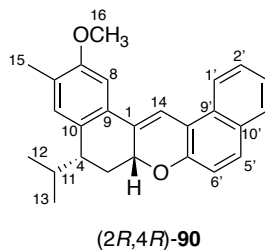
EMAR (ADTR): 353.28347 (calc. para  $[\text{C}_{25}\text{H}_{37}\text{O}]^+$ : 353.28444).



Rf 0.72 (Hex-AcOEt 9:1)

RMN  $^1\text{H}$  (700 MHz, acetona- $d_6$ )  $\delta$  8.25 (dd,  $J = 8.0, 1.0$  Hz, 1H, H1'), 7.94 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H, H14), 7.84 (dd,  $J = 8.0, 1.0$  Hz, 1H, H4'), 7.75 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H, H5'), 7.59 (s, 1H, H8), 7.53 (ddd,  $J = 8.0, 7.0, 1.0$  Hz, 1H, H2'), 7.39 (ddd,  $J = 8.0, 7.0, 1.1$  Hz, 1H, H3'), 7.18 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H, H6'), 6.96 (s, 1H, H5), 5.06 (ddd,  $J = 12.5, 5.7, 2.5$  Hz, 1H, H2), 3.94 (s, 3H, H16), 2.70 (dt,  $J = 9.5, 5.0$  Hz, 1H, H3a), 2.57 (ddd,  $J = 9.5, 4.5, 2.5$  Hz, 1H, H4), 2.20 (s, 3H, H15), 2.07 (td,  $J = 12.5, 4.5$  Hz, 1H, H3b), 1.63 (dhept,  $J = 9.5, 6.5$  Hz, 1H, H11), 1.04 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H, H12), 0.89 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H, H13).

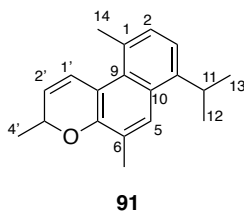
RMN  $^{13}\text{C}$  (175 MHz, acetona- $d_6$ )  $\delta$  157.9 (C7), 154.2 (C7'), 133.7 (C10), 133.4 (C5), 131.6 (C10'), 130.8 (C9'), 130.7 (C9), 130.2 (C1), 129.9 (C5'), 129.5 (C4'), 127.6 (C2'), 126.9 (C6), 124.8 (C3'), 123.3 (C1'), 119.1 (C8'), 118.1 (C6'), 113.5 (C14), 106.0 (C8), 73.2 (C2), 56.0 (C16), 46.1 (C4), 32.8 (C11), 31.9 (C3), 22.4 (C13), 21.3 (C12), 16.5 (C15).



Rf 0.72 (Hex-AcOEt 9:1)

RMN  $^1\text{H}$  (700 MHz, acetona- $d_6$ )  $\delta$  8.25 (dd,  $J = 8.1, 0.9$  Hz, 1H, H1'), 7.82 (dd,  $J = 8.0, 1.2$  Hz, 1H, H4'), 7.74 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H, H14), 7.72 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H, H5'), 7.54 (s, 1H, H8), 7.50 (td,  $J = 8.1, 7.0, 1.2$  Hz, 1H, H2'), 7.37 (td,  $J = 8.0, 7.0, 0.9$  Hz, 1H, H3'), 7.14 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H, H6'), 7.11 (s, 1H, H5), 5.05 (ddd,  $J = 8.4, 5.7, 2.4$  Hz, 1H, H2), 3.95 (s, 3H, H16), 2.72 (ddd,  $J = 9.4, 5.6, 4.1$  Hz, 1H, H4), 2.47 (heptd,  $J = 6.7, 5.6$  Hz, 1H, H11), 2.33 (ddd,  $J = 12.7, 5.7, 4.1$  Hz, 1H, H3a), 2.22 (s, 3H, H5), 2.11 (ddd,  $J = 12.7, 9.4, 8.4$  Hz, 1H, H3b), 1.02 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H, H12), 0.90 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H, H13).

RMN  $^{13}\text{C}$  (175 MHz, acetona- $d_6$ )  $\delta$  157.7 (C7), 153.5 (C7'), 133.2 (C10), 132.5 (C9), 132.1 (C1), 131.4 (C9'), 130.8 (C10'), 130.2 (C5), 129.8 (C5'), 129.5 (C4'), 127.5 (C2'), 127.3 (C6), 124.7 (C3'), 123.1 (C1'), 118.5 (C8'), 118.1 (C6'), 113.2 (C14), 106.6 (C8), 75.8 (C2), 56.0 (C16), 43.5 (C4), 30.1 (C3), 29.6 (C11), 21.9 (C12), 17.9 (C13), 16.6 (C15).



Rf 0.76 (Hex-AcOEt 9:1)

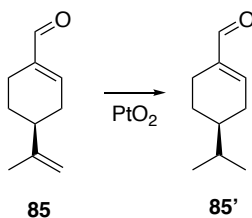
RMN  $^1\text{H}$  (700 MHz, acetona- $d_6$ )  $\delta$  7.91 (s, 1H, H5), 7.25 (dd,  $J = 9.7, 1.8$  Hz, 1H, H1'), 7.20 (d,  $J = 7.5, 1$  Hz, H2), 7.16 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H, H3), 5.67 (dd,  $J = 9.7, 3.6$  Hz, 1H, H2'), 4.82 (qdd,  $J = 6.7, 3.6,$

1.8 Hz, 1H, H3'), 3.69 (hept,  $J = 6.8$  Hz, 1H, H11), 2.73 (s, 3H, H14), 2.36 (s, 3H, H15), 1.53 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H, H4'), 1.34 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H, H12), 1.33 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H, H13).

RMN  $^{13}\text{C}$  (175 MHz, acetona- $\text{d}_6$ )  $\delta$  153.1 (C7), 143.1 (C4), 131.6 (C1), 131.5 (C9), 130.1 (C2), 128.7 (C10), 126.9 (C1'), 126.6 (C6), 126.3 (C5), 121.2 (C2'), 120.3 (C3), 117.6 (C8), 70.8 (C3'), 29.0 (C11), 25.2 (C14), 24.1 (C12), 24.0 (C13), 20.1 (C4'), 17.1 (C15).

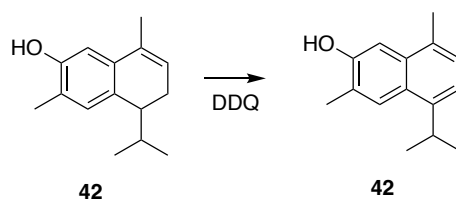
EMAR (ADTR): 267.17386 (calc. para  $[\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{O}]^+$ : 267.17489).

### Hidrogenación de perilaldehído (85)



Con base en un procedimiento previamente informado,<sup>102</sup> una disolución de **85** (204.8 mg, 1.36 mmol) en Hex-AcOEt (1:1, 24 mL) bajo atmósfera de H<sub>2</sub> en presencia de PtO<sub>2</sub> (4.5 mg) se agitó durante 12 h a temperatura ambiente. La mezcla se filtró en una cama de celita, se evaporó el disolvente. El residuo se purificó por medio de CCA con gel de sílice y hex-AcOEt 99.5:0.5, obteniendo felandral (**85'**, 147.3 mg, 0.967 mmol, 71.0 %).

### Aromatización de 3,4-dihidro-7-hidroxicadalenol



Nota: Esta reacción se llevó a cabo con el objetivo de obtener 7-hidroxicadalenol adicional.

Una disolución de 3,4-dihidro-7-hidroxicadalenol (450.2 mg, 2.08 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) se añadió gota a gota a una suspensión de 2,3-dicloro-3,4-diciano-*p*-quinona (DDQ) (708.6 mg, 3.12

mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente por 2 h y posteriormente se retiró el exceso de DDQ con una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (5 x 5 mL), después se lavó con una de NaCl (10 mL), se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporó el disolvente. El residuo se adsorbió en gel de sílice y se aplicó en una columna empacada con una suspensión de gel de sílice en Hex/AcOEt (97:3–95:5), obteniéndose 7-hidroxicadalenol (326.1 mg, 1.52 mmol, 73.1 %).

### **8.3. Ensayos biológicos**

#### **8.3.1. Cultivo de células**

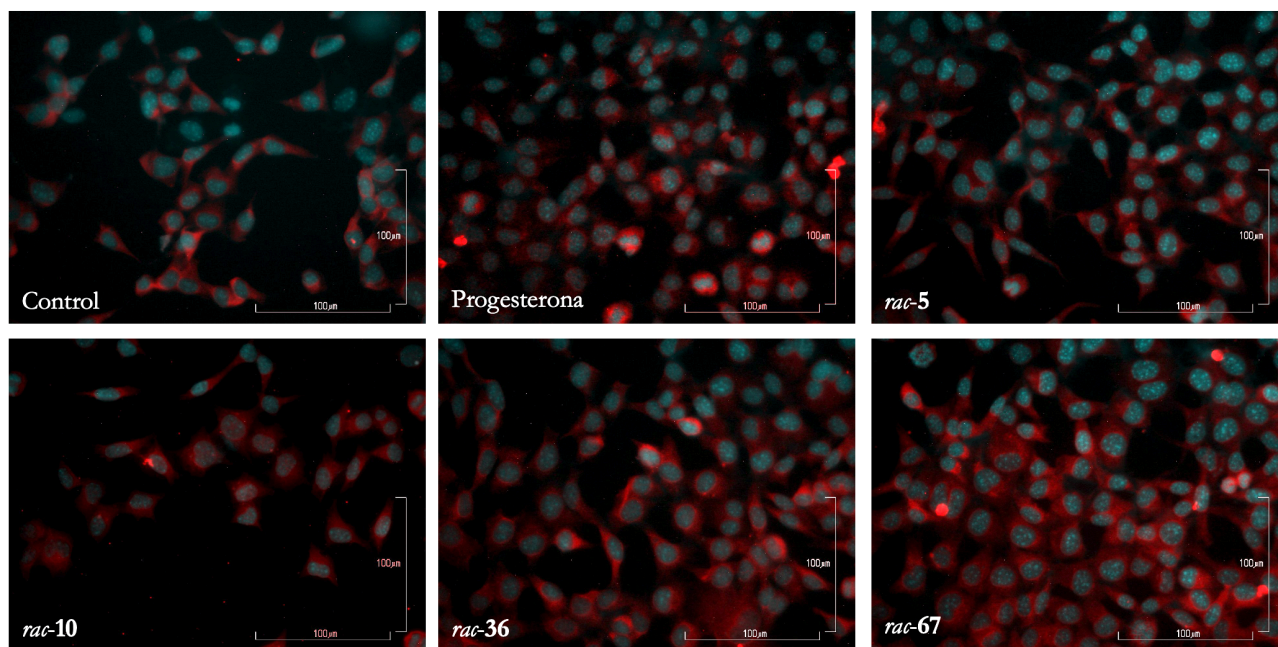
La línea celular T47D se obtuvo del American Type Culture Collection (ATCC) y se cultivó en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI, Gibco®), suplementado con suero fetal bovino 10% (SFB, Gibco®). Se incubó a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> (5 %) con humedad (95 %) antes del tratamiento.

#### **8.3.2. Ensayos de viabilidad celular**

La viabilidad inducida por los productos naturales y semisintéticos se determinó usando el ensayo de reducción de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT).<sup>103</sup> Brevemente, las células T47D se sembraron en placas de 96 pozos (7000 células/pozo en 200 µL de medio RPMI libre de rojo de fenol suplementado con FBS 10% libre de hormonas esteroideas). Después de 17 h de deprivación de SFB, disoluciones de los compuestos de prueba (*rac-5*, *rac-10*, *rac-37* y *rac-67*) en DMSO (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA) se diluyeron en RPMI (50 µL), y se agregaron a los pozos con células en 200 µL de medio, alcanzando diferentes concentraciones de los compuestos (40, 75, 100 y 150 µM). Las células se incubaron 24 h más. Después, se añadió una disolución de MTT en DMSO (20 µL, 2.5 mg/mL) a cada pozo y se incubó por 90 min. Se retiró el supernadante y los cristales resultantes se disolvieron en DMSO (200 µL). Se determinó la absorbancia en la placa de pozos a 540 nm en un espectrofotómetro Epoch (Bio Tek®). La proliferación se expresó como porcentaje de la absorbancia en las células tratadas comparada con la de las células tratadas con el vehículo. Se usó progesterona (Sigma-Aldrich) como control positivo a las mismas concentraciones que los compuestos de prueba.

### 8.3.3. Microscopía de inmunofluorescencia (MIF)

Se llevaron a cabo ensayos de MIF como se ha informado previamente.<sup>104</sup> Las células T47D (800,000) se cultivaron en un cubreobjetos y se trataron (20 min) con los compuestos de prueba (*rac-5*, *rac-10*, *rac-37* y *rac-67* (75  $\mu$ M); se usó progesterona (75  $\mu$ M) como control positivo y también vehículo como control. Después, se removió el supernadante, y las células se lavaron tres veces con buffer salino de fosfatos (PBS). Las células se fijaron con paraformaldehído (4%) por 45 min a temperatura ambiente y después se lavaron con PBS dos veces. Posteriormente, se incubaron con buffer de permeabilización (dodecil sulfato de sodio (SDS) 0.5 %, Triton 100X 0.5% en PBS) por 15 min y con buffer de bloqueo (albúmina de suero fetal (BSA) al 3 % en PBS) por 1 h a temperatura ambiente. Las células se incubaron sucesivamente con anticuerpos primarios (pRP Ser 294 rabbit polyclonal, Abcam ab2074) y secundarios (Goat-Anti-Rabbit Rhodamine, Zymed 31686), en una solución bloqueadora, ambos diluidos 1:500, por 2 h a 37 °C. El anticuerpo secundario se incubó en oscuridad. Se lavó con PBS entre cada paso. Las células se tiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) en medio acuoso de montaje (Fluoroshield con DAPI, Genetex GTX30920). Los cubreobjetos de cada condición experimental se montaron sobre portaobjetos y se observaron bajo un microscopio de fluorescencia. En cada caso, se seleccionaron aleatoriamente los campos, usando una magnificación de 40 $\times$  con una cámara digital (Evolution MP Color, Media Cybernetics) acoplada al microscopio de fluorescencia (Olympus BX51).



**Figura 19.** MIF de células T47D marcadas con fosfo-RP-294. Se muestra la localización intracelular de fosfo-RP-294 (rojo) y el núcleo teñido con DAPI (azul), para: (a) (a) células sin tratar, donde PR se localiza en el citoplasma; y (b) células después de tratamiento; con *rac-10*, la localización perinuclear es notable. Barras de escala: 100  $\mu\text{m}$ .

#### 8.3.4. Estudio de modulación de la resistencia en células de sarcoma uterino resistentes

Para determinar la actividad sensibilizadora de la resistencia a múltiples fármacos, se empleó la línea celular de sarcoma uterino epitelial humano MES-SA (ATCC® CRL-1976™) y el fenotipo resistente MES-SA/MX2 (ATCC® CRL-2274™). Ambas líneas se obtuvieron del American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA).

Las células MES-SA se cultivaron en medio McCoy's 5 y la variante MES-SA/MX2 en una mezcla 1:1 de medio Waymouth's MB 752/1 y McCoy's 5. En ambos casos, el medio de cultivo fue suplementado con 10 % de suero bovino inactivado con calor y 1 % de antimicótico. Las células se cultivaron a 37 °C, en incubadora humidificada con 5 % de CO<sub>2</sub>. La viabilidad de las células usadas en los experimentos (determinada por el ensayo de azul de tripano) fue mayor al 95 %.

El potencial quimiosensibilizante de los compuestos en las líneas celulares MES-SA y MES-SA/MX2 se determinó por medio de su inhibición usando el ensayo de sulforrodamina B.<sup>105</sup> Se realizaron ensayos de proliferación celular de doxorubicina (**105**) y mitoxantrona (**106**) (ambas en

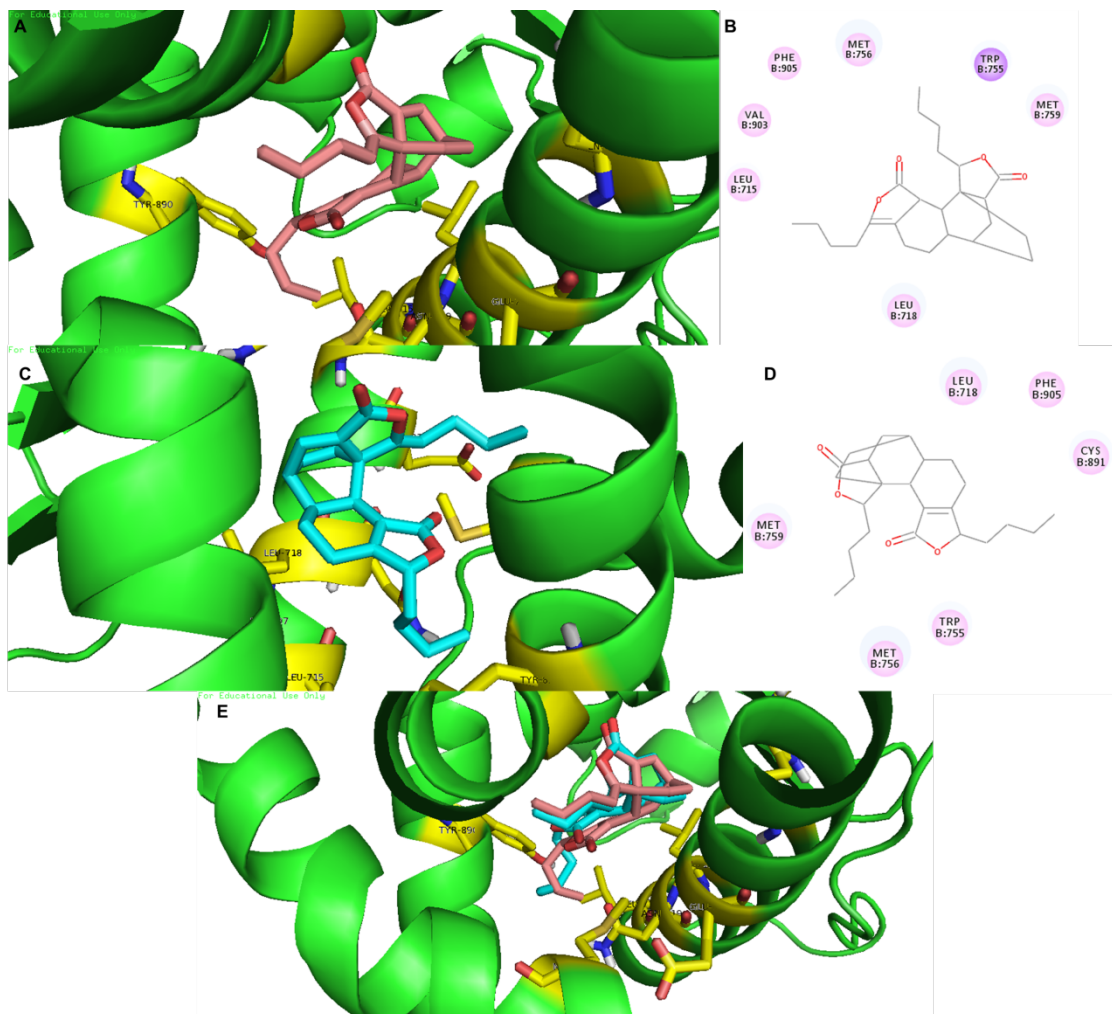
concentraciones de 0.01 a 10.0  $\mu\text{M}$ ) solas y en combinación con los compuestos prueba a 5  $\mu\text{M}$ . La viabilidad en cada caso se expresó como porcentaje respecto al blanco (que contiene células, el medio y el compuesto prueba a 5  $\mu\text{M}$ ). Verapamilo (**107**) y resveratrol (**108**) se usaron como controles a la misma concentración de los compuestos de prueba. Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

Una vez obtenida la  $\text{CI}_{50}$  de los fármacos **105** y **106** solos y con los compuestos, se expresó el índice de reversión como la relación entre la  $\text{CI}_{50}$  del fármaco en combinación con el compuesto de prueba, entre la  $\text{CI}_{50}$  del fármaco solo.

#### **8.4. Estudio de acoplamiento molecular**

##### Receptor de progesterona

Tres estructuras cristalográficas del RP (PDB ID: 4APU,<sup>74</sup> 3ZR1<sup>75</sup> y 1ZUC<sup>76</sup>) fueron descargadas del repositorio RCSB PDB. Las geometrías fueron optimizadas primero usando un modelo semiempírico Austin Model 1 (AM1).<sup>106</sup> MGL tools 1.5.4 (The Scripps Research Institute) con AutoDock 4.2<sup>107</sup> o AutoDock Vina,<sup>108</sup> se usaron para acoplar los ligantes, e identificar las entidades activas para los sitios de unión en las estructuras protericas del RP. Las moléculas se acoplaron sobre la proteína entera para identificar los sitios y forma de unión. Se implementaron algoritmos genéticos Lamarckianos<sup>109</sup> para los cálculos con AutoDock 4.2; y un algoritmo optimizado que combina procedimientos locales de optimización, incluyendo algoritmos genéticos, optimización por enjambre de partículas, anillación simulada y otros se usaron para AutoDock Vina.<sup>108</sup> Las posiciones finales de los compuestos se ordenaron por los valores de interacción menores (*docking score* expresado en kcal/mol y residuos de unión). Las interacciones de puentes de hidrógeno entre los ligantes y la proteína se exploraron. Los resultados obtenidos de AutoDock 4.2 y AutoDock Vina se analizaron con la paquetería de software PyMOL (Schrödinger, LLC, NY, USA) y Discovery Studio Visualizer (Dassault Systemes, BIOVIA Corp., CA, USA). Una posición de acoplamiento con un valor de desviación media de la raíz cuadrada  $< 2 \text{ \AA}$  se consideró efectuado exitosamente.<sup>110</sup>



**Figura 20.** Interacciones de *rac-5* y *rac-37* con RP (4APU)  
**A y B:** Interacción de van der Waals del compuesto *rac-5*. **C y D.** Interacción de van der Waals del compuesto *rac-37*. **E.** Sobreposicionamiento de *rac-5* y *rac-37*, apreciando el empalme de éstas dos estructuras.

### Glucoproteína P (MDR1)

La metodología en general fue la misma, que la descrita anteriormente, variando la estructura utilizada por la de gp-P (PDBID: 4M1M).



## 9. REFERENCIAS

- (1) Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79* (3), 629–661. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>.
- (2) Ntie-Kang, F.; Nyongbela, K. D.; Ayimele, G. A.; Shekfeh, S. “Drug-Likeness” Properties of Natural Compounds. *Phys. Sci. Rev.* **2019**, *0* (0), 1–14. <https://doi.org/10.1515/psr-2018-0169>.
- (3) Cantrell, C. L.; Dayan, F. E.; Duke, S. O. Natural Products As Sources for New Pesticides. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75* (6), 1231–1242. <https://doi.org/10.1021/np300024u>.
- (4) Dobson, C. M. Chemical Space and Biology. *Nature* **2004**, *432*, 824–828.
- (5) Lipinski, C.; Hopkins, A. Navigating Chemical Space for Biology and Medicine. *Nature* **2004**, *432* (7019), 855–861. <https://doi.org/10.1038/nature03193>.
- (6) Saldívar-González, F. I.; Pilón-Jiménez, B. A.; Medina-Franco, J. L. Chemical Space of Naturally Occurring Compounds. *Phys. Sci. Rev.* **2018**, *4* (5), 1–14. <https://doi.org/10.1515/psr-2018-0103>.
- (7) Athar, M.; Sona, A. N.; Bekono, B. D.; Ntie-Kang, F. Fundamental Physical and Chemical Concepts behind “Drug-Likeness” and “Natural Product-Likeness.” *Phys. Sci. Rev.* **2019**, *0* (0), 1–18. <https://doi.org/10.1515/psr-2018-0101>.
- (8) Gal, J. Molecular Chirality in Chemistry and Biology: Historical Milestones. *Helv. Chim. Acta* **2013**, *96* (9), 1617–1657. <https://doi.org/10.1002/hlca.201300300>.
- (9) *Chiral Drugs: Chemistry and Biological Action*; Lin, G.-Q., You, Q.-D., Cheng, J.-F., Eds.; Wiley: New Jersey, 2011.
- (10) Cossy, J. R. Introduction: The Importance of Chirality in Drugs and Agrochemicals. In *Comprehensive Chirality*; Carreira, E. M., Yamamoto, H., Eds.; Elsevier Science, 2012; Vol. 1, pp 1–7. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-095167-6.00101-4>.
- (11) Bye, R. A. Medicinal Plants of the Sierra Madre: Comparative Study of Tarahumara and Mexican Market Plants. *Econ. Bot.* **1986**, *40* (1), 103–124. <https://doi.org/10.1007/BF02858951>.
- (12) Bye, R. A.; Linares, E. Ethnobotanical Notes from the Valley of San Luis, Colorado (USA). *J. Ethnobiol.* **1986**, *6*, 289–306.
- (13) Linares, E.; Bye, R. A. A Study of Four Medicinal Plant Complexes of Mexico and Adjacent

- United States. *J. Ethnopharmacol.* **1987**, *19* (2), 153–183. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(87\)90039-0](https://doi.org/10.1016/0378-8741(87)90039-0).
- (14) Donkor, P. O.; Chen, Y.; Ding, L.; Qiu, F. Locally and Traditionally Used Ligusticum Species – A Review of Their Phytochemistry, Pharmacology and Pharmacokinetics. *J. Ethnopharmacol.* **2016**, *194*, 530–548. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2016.10.012>.
- (15) Gijbels, M. J. M.; Scheffer, J. J. C.; Baerheim Svendsen, A. Phthalides in Umbelliferae. *Riv. Ital. EPPOS* **1979**, *61*, 335–341.
- (16) Beck, J. J.; Chou, S.-C. The Structural Diversity of Phthalides from the Apiaceae. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70* (5), 891–900. <https://doi.org/10.1021/np0605586>.
- (17) León, A.; Del-Ángel, M.; Ávila, J. L.; Delgado, G. Phthalides: Distribution in Nature, Chemical Reactivity, Synthesis, and Biological Activity. In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*; Kinghorn, D. A., Falk, H., Gibbons, S., Kobayashi, J., Eds.; Springer, Cham, 2017; pp 127–246. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-45618-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-45618-8_2).
- (18) Tsai, N. M.; Chen, Y. L.; Lee, C. C.; Lin, P. C.; Cheng, Y. L.; Chang, W. L.; Lin, S. Z.; Harn, H. J. Triangeliphthalides A–D: Bioactive Phthalide Trimers with New Skeletons from *Angelica Sinensis* and Their Production Mechanism. *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 6221–6224. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04151.x>.
- (19) Delgado, G.; Reza-Garduño, R. G.; Toscano, R. A.; Bye, R.; Linares, E. Secondary Metabolites from the Roots of *Ligusticum Porteri* (Umbelliferae). X-Ray Structure of Z-6.6',7.3'a-Diligustilide. *Heterocycles* **1988**, *27* (6), 1305–1312.
- (20) Delgado, G.; Reza-Garduño, R. G.; Ríos, M. Y.; del Río, F. Phthalides and Monoterpenes of the Hexane Extract of the Roots of *Ligusticum Porteri*. *Planta Med.* **1992**, *58*, 570–571. <https://doi.org/10.1055/s-2006-961555>.
- (21) León, A.; Chávez, M. I.; Delgado, G. <sup>1</sup>H and DOSY NMR Spectroscopy Analysis of *Ligusticum Porteri* Rhizome Extracts. *Magn. Reson. Chem.* **2011**, *49* (8), 469–476. <https://doi.org/10.1002/mrc.2767>.
- (22) León, A.; Toscano, R. A.; Tortoriello, J.; Delgado, G. Phthalides and Other Constituents from *Ligusticum Porteri*; Sedative and Spasmolytic Activities of Some Natural Products and Derivatives. *Nat. Prod. Res.* **2011**, *25* (13), 1234–1242. <https://doi.org/10.1080/14786419.2010.534735>.
- (23) Pushan, W.; Xuanliang, G.; Yixiong, W.; Fukuyama, Y.; Miura, I.; Sugawara, M. Phthalides

- from the Rhizome of *Ligusticum Wallichii*. *Phytochemistry* **1984**, *23* (9), 2033–2038.  
[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)84965-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)84965-1).
- (24) Huang, J.; Lu, X. Q.; Zhang, C.; Lu, J.; Li, G. Y.; Lin, R. C.; Wang, J. H. Anti-Inflammatory Ligustilides from *Ligusticum Chuanxiong* Hort. *Fitoterapia* **2013**, *91*, 21–27.  
<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2013.08.013>.
- (25) Lim, L. S.; Shen, P.; Gong, Y. H.; Yong, E. L. Dimeric Progestins from Rhizomes of *Ligusticum Chuanxiong*. *Phytochemistry* **2006**, *67* (7), 728–734.  
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.01.024>.
- (26) Yang, J.-B.; Wang, A.-G.; Wei, Q.; Ren, J.; Ma, S.-C.; Su, Y.-L. New Dimeric Phthalides from *Ligusticum Sinense* Oliv Cv. Chaxiong. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2014**, *16* (7), 747–752.  
<https://doi.org/10.1080/10286020.2014.914501>.
- (27) Juárez-Reyes, K.; Ángeles-López, G. E.; Rivero-Cruz, I.; Bye, R.; Mata, R. Antinociceptive Activity of *Ligusticum Porteri* Preparations and Compounds. *Pharm. Biol.* **2014**, *52* (1), 14–20. <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.805235>.
- (28) Velázquez-Moyado, J. A.; Martínez-González, A.; Linares, E.; Bye, R.; Mata, R.; Navarrete, A. Gastroprotective Effect of Diligustilide Isolated from Roots of *Ligusticum Porteri* Coulter & Rose (Apiaceae) on Ethanol-Induced Lesions in Rats. *J. Ethnopharmacol.* **2015**, *174*, 403–409. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2015.08.030>.
- (29) Brindis, F.; Rodríguez, R.; Bye, R.; González-Andrade, M.; Mata, R. (Z)-3-Butylidenephthalide from *Ligusticum Porteri*, an  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitor. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74* (3), 314–320. <https://doi.org/10.1021/np100447a>.
- (30) Beck, J. J.; Stermitz, F. R. Addition of Methyl Thioglycolate and Benzylamine to (Z)-Ligustilide, a Bioactive Unsaturated Lactone Constituent of Several Herbal Medicines. An Improved Synthesis of (Z)-Ligustilide. *J. Nat. Prod.* **1995**, *58* (7), 1047–1055.
- (31) Ogawa, Y.; Mori, Y.; Maruno, M.; Wakamatsu, T. Diels-Alder Reaction of Ligustilide Giving Levistolide A and Tokinolide B. *Heterocycles* **1997**, *45* (10), 1869–1872.
- (32) Rios, M. Y.; Delgado, G.; Toscano, R. A. Chemical Reactivity of Phthalides. Relay Synthesis of Diligustilide, *Rel*-(3'*R*)-3',8'-Dihydrodiligustilide and Wallichilide. *Tetrahedron* **1998**, *54* (14), 3355–3366. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(98\)00080-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(98)00080-5).
- (33) Rios, M. Y.; Delgado, G. Lewis Acid Catalyzed Transformations of Z-Ligustilide. *J. Mex. Chem. Soc.* **1999**, *43* (3, 4), 127–132.

- (34) Quiroz-García, B.; Figueroa, R.; Cogordan, J. A.; Delgado, G. Photocyclodimers from Z-Ligustilide. Experimental Results and FMO Analysis. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46* (17), 3003–3006. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2005.03.024>.
- (35) Kaouadji, M.; De Pachtere, F.; Pouget, C.; Chulia, A.; Lavaitte, S. Three Additional Phthalide Derivatives, an Epoxy monomer and Two Dimers from *Ligusticum Walichii* Rhizomes. *J. Nat. Prod.* **1986**, *49* (5), 872–877.
- (36) León, A.; Toscano, R. A.; Cogordán, J. A.; Delgado, G. Differentiated Cyclization of the Ketoacid Derived from Tokinolide B. *Heterocycles* **2010**, *82* (2), 1567. [https://doi.org/10.3987/COM-10-S\(E\)113](https://doi.org/10.3987/COM-10-S(E)113).
- (37) Li, W.; Wu, Y.; Liu, X.; Yan, C.; Liu, D.; Pan, Y.; Yang, G.; Yin, F.; Weng, Z.; Zhao, D.; et al. Antioxidant Properties of Cis-Z,Z'-3a,7a',7a,3a'-Dihydroxy-Ligustilide on Human Umbilical Vein Endothelial Cells in Vitro. *Molecules* **2013**, *18* (1), 520–534. <https://doi.org/10.3390/molecules18010520>.
- (38) Aguilar Contreras, A. *Plantas Medicinales Del Herbario IMSS: Cuadros Básicos Por Aparatos y Sistemas Del Cuerpo Humano*; Instituto Mexicano del Seguro Social: Ciudad de México, 1994.
- (39) Rodríguez-Chávez, J. L.; Egas, V.; Linares, E.; Bye, R.; Hernández, T.; Espinosa-García, F. J.; Delgado, G. Mexican Arnica (*Heterotheca Inuloides* Cass. Asteraceae: Astereae): Ethnomedical Uses, Chemical Constituents and Biological Properties. *J. Ethnopharmacol.* **2017**, *195*, 39–63. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.11.021>.
- (40) Bohlmann, F.; Zdero, C. Natürlich Vorkommende Terpen-Derivate, 63. Über Die Inhaltsstoffe Von *Heterotheca Inuloides* Cass. *Chem. Ber.* **1976**, *109* (6), 2021–2025. <https://doi.org/10.1002/cber.19761090608>.
- (41) Kubo, I.; Muroi, H.; Kubo, A.; Chaudhuri, S.; Sanchez, Y.; Ogura, T. Antimicrobial Agents from *Heterotheca Inuloides*. *Planta Med.* **1994**, *60* (03), 218–221. <https://doi.org/10.1055/s-2006-959462>.
- (42) Kubo, I.; Ishiguro, K.; Chaudhuri, S. K.; Kubo, Y.; Sanchez, Y.; Ogura, T. A Plant Growth Inhibitory Sesquiterpenoid from *Heterotheca Inuloides*. *Phytochemistry* **1995**, *38* (2), 553–554. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(94\)00551-4](https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)00551-4).
- (43) Sagrero-Nieves, L.; Bartley, J. P. Volatile Components from the Leaves of *Heterotheca Inuloides* Cass. *Flavour Fragr. J.* **1996**, *11* (1), 49–51. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-)

1026(199601)11:1<49::AID-FFJ538>3.0.CO;2-J.

- (44) Delgado, G.; Olivares, M. del S.; Chávez, M. I.; Ramírez-Apan, T.; Linares, E.; Bye, R.; Espinosa-García, F. J. Antiinflammatory Constituents from *Heterotheca Inuloides*. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 861–864. <https://doi.org/10.1021/np0005107>.
- (45) Egas, V.; Toscano, R. A.; Linares, E.; Bye, R.; Espinosa-García, F. J.; Delgado, G. Cadinane-Type Sesquiterpenoids from *Heterotheca Inuloides*: Absolute Configuration and Anti-Inflammatory Activity. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78* (11), 2634–2641. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00571>.
- (46) Egas, V.; Salazar-Cervantes, G.; Romero, I.; Méndez-Cuesta, C. A.; Rodríguez-Chávez, J. L.; Delgado, G. Anti- Helicobacter Pylori Metabolites from *Heterotheca Inuloides* (Mexican Arnica). *Fitoterapia* **2018**, *127*, 314–321. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.03.001>.
- (47) Stipanovic, R. D.; Puckhaber, L. S.; Reibenspies, J. H.; Williams, H. J. The Absolute Configuration of (À)-3-Hydroxy-a-Calacorene. **2006**. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.05.019>.
- (48) Kamatani, J.; Iwadate, T.; Tajima, R.; Kimoto, H.; Yamada, Y.; Masuoka, N.; Kubo, I.; Nihei, K. I. Stereochemical Investigation and Total Synthesis of Inuloidin, a Biologically Active Sesquiterpenoid from *Heterotheca Inuloides*. *Tetrahedron* **2014**, *70* (19), 3141–3145. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2014.03.057>.
- (49) Rodríguez-Chávez, J. L.; Gómez-Vidales, V.; Coballase-Urrutia, E.; Ortega-Cuéllar, D.; Delgado-Lamas, G. *Heterotheca Inuloides* (Mexican Arnica) Metabolites Protect *Caenorhabditis Elegans* from Oxidative Damage and Inhibit Nitric Oxide Production. *RSC Adv.* **2016**, *6* (15), 12032–12041. <https://doi.org/10.1039/C5RA21646J>.
- (50) Rodríguez-Chávez, J.; Coballase-Urrutia, E.; Sicilia-Argumedo, G.; Ramírez-Apan, T.; Delgado, G. Toxicological Evaluation of the Natural Products and Some Semisynthetic Derivatives of *Heterotheca Inuloides* Cass (Asteraceae). *J. Ethnopharmacol.* **2015**, *175*, 256–265. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.08.055>.
- (51) Castillo-Juárez, I.; González, V.; Jaime-Aguilar, H.; Martínez, G.; Linares, E.; Bye, R.; Romero, I. Anti-Helicobacter Pylori Activity of Plants Used in Mexican Traditional Medicine for Gastrointestinal Disorders. *J. Ethnopharmacol.* **2009**, *122* (2), 402–405. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2008.12.021>.
- (52) Rocha-González, H. I.; Blaisdell-López, E.; Granados-Soto, V.; Navarrete, A.

Antinociceptive Effect of 7-Hydroxy-3,4-Dihydrocadalin Isolated from *Heterotheca Inuloides*: Role of Peripheral 5-HT<sub>1</sub> Serotonergic Receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **2010**, *649* (1–3), 154–160. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.09.022>.

- (53) Rodriguez-Chavez, J. L.; Rufino-Gonzalez, Y.; Ponce-Macotela, M.; Delgado, G. In Vitro Activity of “Mexican Arnica” *Heterotheca Inuloides* Cass Natural Products and Some Derivatives against *Giardia Intestinalis*. *Parasitology* **2015**, *142* (4), 576–584. <https://doi.org/10.1017/S0031182014001619>.
- (54) Egas, V.; Millán, E.; Collado, J. A.; Ramírez-Apan, T.; Méndez-Cuesta, C. A.; Muñoz, E.; Delgado, G. Effect of Natural and Semi-Synthetic Cadinanes from *Heterotheca Inuloides* on NF- $\kappa$ B, Nrf2 and STAT3 Signaling Pathways and Evaluation of Their in Vitro Cytotoxicity in Human Cancer Cell Lines. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 3135–3147. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.03.069>.
- (55) McCormick, J. P.; Shinmyozu, T.; Pachlatko, J. P.; Schafer, T. R.; Gardner, J. W.; Stipanovic, R. D. Gossypium Cadinanes and Their Analogs: Synthesis of Lacinilene C, 2,7-Dihydroxycadalene, and Their Methyl Ethers. *J. Org. Chem.* **1984**, *49* (1), 34–40. <https://doi.org/10.1021/jo00175a007>.
- (56) Christena Lawrence, R.; Ganesan Subramaniapillai, S.; Ulaganathan, V.; Nagarajan, S. Tackling Drug Resistance with Efflux Pump Inhibitors: From Bacteria to Cancerous Cells. *Crit. Rev. Microbiol.* **2019**, *45* (3), 334–353. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2019.1607248>.
- (57) Nobili, S.; Lapucci, A.; Landini, I.; Coronello, M.; Roviello, G.; Mini, E. Role of ATP-Binding Cassette Transporters in Cancer Initiation and Progression. *Semin. Cancer Biol.* **2020**, *60*, 72–95. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.08.006>.
- (58) Gottesman, M. M.; Ambudkar, S. V. Overview: ABC Transporters and Human Disease. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2001**, *33* (6), 453–458. <https://doi.org/10.1023/A:1012866803188>.
- (59) Yakusheva, E. N.; Titov, D. S. Structure and Function of Multidrug Resistance Protein 1. *Biochem.* **2018**, *83* (8), 907–929. <https://doi.org/10.1134/S0006297918080047>.
- (60) Kodan, A.; Yamaguchi, T.; Nakatsu, T.; Matsuoka, K.; Kimura, Y.; Ueda, K.; Kato, H. Inward-and Outward-Facing X-Ray Crystal Structures of Homodimeric P-Glycoprotein CmABCB1. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 88. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08007-x>.
- (61) Yu, J.; Zhou, P.; Asenso, J.; Yang, X.-D.; Wang, C.; Wei, W. Advances in Plant-Based

Inhibitors of P-Glycoprotein. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2016**, *31* (6), 867–881.  
<https://doi.org/10.3109/14756366.2016.1149476>.

- (62) Pérez-Victoria, J. M.; Tincusi, B. M.; Jiménez, I. A.; Bazzocchi, I. L.; Gupta, M. P.; Castanys, S.; Gamarro, F.; Ravelo, A. G. New Natural Sesquiterpenes as Modulators of Daunomycin Resistance in a Multidrug-Resistant *Leishmania Tropica* Line. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4388–4393. <https://doi.org/10.1021/JM991066B>.
- (63) Kennedy, M. L.; Cortés-Selva, F.; Pérez-Victoria, J. M.; Jiménez, I. A.; González, A. G.; Muñoz, O. M.; Gamarro, F.; Castanys, S.; Ravelo, A. G. Chemosensitization of a Multidrug-Resistant *Leishmania Tropica* Line by New Sesquiterpenes from *Maytenus Magellanica* and *Maytenus Chubutensis*. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 4668–4676.  
<https://doi.org/10.1021/JM010970C>.
- (64) Muñoz-Martínez, F.; Lu, P.; Cortés-Selva, F.; Pérez-Victoria, J. M.; Jiménez, I. A.; Ravelo, A. G.; Sharom, F. J.; Gamarro, F.; Castanys, S. Celastraceae Sesquiterpenes as a New Class of Modulators That Bind Specifically to Human P-Glycoprotein and Reverse Cellular Multidrug Resistance. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 7130–7138. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-04-1005>.
- (65) Torres-Romero, D.; Muñoz-Martínez, F.; Jiménez, I. A.; Castanys, S.; Gamarro, F.; Bazzocchi, I. L. Novel Dihydro- $\beta$ -Agarofuran Sesquiterpenes as Potent Modulators of Human P-Glycoprotein Dependent Multidrug Resistance. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7* (24), 5166. <https://doi.org/10.1039/b915678j>.
- (66) Migliaccio, A.; Piccolo, D.; Castoria, G.; Di Domenico, M.; Bilancio, A.; Lombardi, M.; Gong, W.; Beato, M.; Auricchio, F. Activation of the Src/P21ras/Erk Pathway by Progesterone Receptor via Cross-Talk with Estrogen Receptor. *EMBO J.* **1998**, *17* (7), 2008–2018. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.7.2008>.
- (67) Migliaccio, A.; Piccolo, D.; Castoria, G.; Di Domenico, M.; Bilancio, A.; Lombardi, M.; Gong, W.; Beato, M.; Auricchio, F. Non-Transcriptional Action of Oestradiol and Progestin Triggers DNA Synthesis. *EMBO J.* **1999**, *18* (9), 2500–2510.  
<https://doi.org/10.1093/emboj/17.7.2008>.
- (68) Carnevale, R. P.; Proietti, C. J.; Salatino, M.; Urtreger, A.; Peluffo, G.; Edwards, D. P.; Boonyaratanakornkit, V.; Charreau, E. H.; de Kier Joffé, E. B.; Schillaci, R.; et al. Progestin Effects on Breast Cancer Cell Proliferation, Proteases Activation, and *in Vivo* Development

of Metastatic Phenotype All Depend on Progesterone Receptor Capacity to Activate Cytoplasmic Signaling Pathways. *Mol. Endocrinol.* **2007**, *21* (6), 1335–1358. <https://doi.org/10.1210/me.2006-0304>.

- (69) Azeez, J. M.; Prabhakar, J.; Radhakrishna Pillai, M. Progesterone Regulates the Proliferation of Breast Cancer Cells - in Vitro Evidence. *Drug Des. Devel. Ther.* **2015**, *9*, 5987–5999. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S89390>.
- (70) Kazmi, S. M.; Visconti, V.; Plante, R. K.; Ishaque, A.; Lau, C. Differential Regulation of Human Progesterone Receptor A and B Form-Mediated Trans-Activation by Phosphorylation. *Endocrinology* **1993**, *133* (3), 1230–1238. <https://doi.org/10.1210/endo.133.3.8365365>.
- (71) Hagan, C. R.; Daniel, A. R.; Dressing, G. E.; Lange, C. A. Role of Phosphorylation in Progesterone Receptor Signaling and Specificity. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2012**, *357* (1–2), 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.09.017>.
- (72) Piette, P. The History of Natural Progesterone, the Never-Ending Story. *Climacteric* **2018**, *21* (4), 308–314. <https://doi.org/10.1080/13697137.2018.1462792>.
- (73) Qiu, M.; Olsen, A.; Faivre, E.; Horwitz, K. B.; Lange, C. A. Mitogen-Activated Protein Kinase Regulates Nuclear Association of Human Progesterone Receptors. *Mol. Endocrinol.* **2003**, *17* (4), 628–642. <https://doi.org/10.1210/me.2002-0378>.
- (74) Lusher, S. J.; Raaijmakers, H. C. A.; Vu-Pham, D.; Kazemier, B.; Bosch, R.; McGuire, R.; Azevedo, R.; Hamersma, H.; Dechering, K.; Oubrie, A.; et al. X-Ray Structures of Progesterone Receptor Ligand Binding Domain in Its Agonist State Reveal Differing Mechanisms for Mixed Profiles of 11 $\beta$ -Substituted Steroids. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287* (24), 20333–20343. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.308403>.
- (75) Lusher, S. J.; Raaijmakers, H. C. A.; Vu-Pham, D.; Dechering, K.; Lam, T. W.; Brown, A. R.; Hamilton, N. M.; Nimz, O.; Bosch, R.; McGuire, R.; et al. Structural Basis for Agonism and Antagonism for a Set of Chemically Related Progesterone Receptor Modulators. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (40), 35079–35086. <https://doi.org/10.1074/JBC.M111.273029>.
- (76) Zhang, Z.; Olland, A. M.; Zhu, Y.; Cohen, J.; Berrodin, T.; Chippari, S.; Appavu, C.; Li, S.; Wilhem, J.; Chopra, R.; et al. Molecular and Pharmacological Properties of a Potent and Selective Novel Nonsteroidal Progesterone Receptor Agonist Tanaproget. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (31), 28468–28475. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504144200>.



- (77) Brameld, K. A.; Kuhn, B.; Reuter, D. C.; Stahl, M. Small Molecule Conformational Preferences Derived from Crystal Structure Data. A Medicinal Chemistry Focused Analysis. *J. Chem. Inf. Model.* **2008**, *48*, 1 – 24. <https://doi.org/10.1021/CI7002494>.
- (78) Lobo, R. A. The Role of Progestins in Hormone Replacement Therapy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **1992**, *166* (6 PART 2), 1997–2004. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(92\)91401-U](https://doi.org/10.1016/0002-9378(92)91401-U).
- (79) De Ziegler, D.; Fanchin, R. Progesterone and Progestins: Applications in Gynecology. In *Steroids*; Elsevier, 2000; Vol. 65, pp 671–679. [https://doi.org/10.1016/S0039-128X\(00\)00123-9](https://doi.org/10.1016/S0039-128X(00)00123-9).
- (80) Wang-Cheng, R.; Rosenfeld, jo A. *Hormone Replacement Therapy*; Elsevier Ltd, 2003; Vol. 327. <https://doi.org/10.1136/bmjusa.02090003>.
- (81) Erkkola, R.; Landgren, B. M. Role of Progestins in Contraception. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **2005**, *84* (3), 207–216. <https://doi.org/10.1111/j.0001-6349.2005.00759.x>.
- (82) Campagnoli, C.; Clavel-Chapelon, F.; Kaaks, R.; Peris, C.; Berrino, F. Progestins and Progesterone in Hormone Replacement Therapy and the Risk of Breast Cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2005**, *96* (2), 95–108. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2005.02.014>.
- (83) Sitruk-Ware, R.; Nath, A. The Use of Newer Progestins for Contraception. *Contraception* **2010**, *82* (5), 410–417. <https://doi.org/10.1016/j.contraception.2010.04.004>.
- (84) Chuit, C.; Foulon, J. P.; Normant, J. F. Réactivité Des Dérivés Organocuvreux Vis-à-Vis Des Aldéhydes A $\beta$ -Éthyléniques. *Tetrahedron* **1981**, *37* (7), 1385–1389. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)92455-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)92455-X).
- (85) Boger, D. L.; Weinreb, S. M. Hetero Diels-Alder Methodology in Organic Synthesis. *Methodology* **1987**, 190. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-091697-2.50002-0>.
- (86) Lipshutz, B. H.; Elsworth, E. L.; Siahaan, T. J. The Role of Boron Trifluoride Etherate in Reactions of Lower Order (Gilman) Organocuprates. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111* (4), 1351–1358. <https://doi.org/10.1021/ja00186a031>.
- (87) Clarke, P. A.; Nasir, N. M.; Sellars, P. B.; Peter, A. M.; Lawson, C. A.; Burroughs, J. L. Synthesis of 2,6-Trans- and 3,3,6-Trisubstituted Tetrahydropyran-4-Ones from Maitland–Japp Derived 2H-Dihydropyran-4-Ones: A Total Synthesis of Diospongin B. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14* (28), 6840–6852. <https://doi.org/10.1039/C6OB01182A>.
- (88) Lee, Y. R.; Jung, H. C.; Sang, H. Y. Efficient and General Method for the Synthesis of

Benzopyrans by Ethylenediamine Diacetate-Catalyzed Reactions of Resorcinols with  $\alpha,\beta$ -Unsaturated Aldehydes. One Step Synthesis of Biologically Active ( $\pm$ )-Confluentin and ( $\pm$ )-Daurichromenic Acid. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46* (44), 7539–7543.  
<https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2005.08.159>.

- (89) Kim, Y. M. A Novel Method for the Synthesis of Substituted Benzochromenes by Ethylenediamine Diacetate-Catalyzed Cyclizations of Naphthalenols to  $\alpha,\beta$ -Unsaturated Aldehydes. Concise Synthesis of the Natural Products. *Helv. Chim. Acta* **2007**, *90*, 2401–2413.
- (90) Chauder, B. A.; Lopes, C. C.; Lopes, R. S. C.; Silva, J. M. Phenylboronic Acid-Mediated Synthesis of 2 H-Chromenes. *Synthesis* **1998**, 279–282.
- (91) Partal Ureña, F.; Avilés Moreno, J. R.; López González, J. J. Conformational Flexibility in Terpenes: Vibrational Circular Dichroism (VCD), Infrared and Raman Study of *S*-(-)-Perillaldehyde. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112* (34), 7887–7893.  
<https://doi.org/10.1021/jp801099e>.
- (92) Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, 3rd.; Chichester, 2009.
- (93) Wendt, K. U. Enzyme Mechanisms for Triterpene Cyclization: New Pieces of the Puzzle. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2005**, *44* (26), 3966–3971. <https://doi.org/10.1002/anie.200500804>.
- (94) Dembitsky, V. M.; Smoum, R.; Al-Quntar, A.; Ali, H. A.; Pergament, I.; Srebnik, M. *Natural Occurrence of Boron-Containing Compounds in Plants, Algae and Microorganisms*.
- (95) Keles, Y.; Öncel, I.; Yenice, N. *Relationship between Boron Content and Antioxidant Compounds in Citrus Leaves Taken from Fields with Different Water Source*; 2004; Vol. 265.
- (96) Goldbach, H. E.; Wimmer, M. A. Boron in Plants and Animals: Is There a Role beyond Cell-Wall Structure? *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **2007**, *170* (1), 39–48.  
<https://doi.org/10.1002/jpln.200625161>.
- (97) Aller, S. G.; Yu, J.; Ward, A.; Weng, Y.; Chittaboina, S.; Zhuo, R.; Harrell, P. M.; Trinh, Y. T.; Zhang, Q.; Urbatsch, I. L.; et al. Structures of P-Glycoproteins Reveals a Molecular Basis for Poly-Specific Drug Binding. *Science* (80-. ). **2009**, *323* (5922), 1718–1722.  
<https://doi.org/10.1126/science.1168750>.
- (98) Abraham, I.; Jain, S.; Wu, C.-P.; Khanfar, M. A.; Kuang, Y.; Dai, C.-L.; Shi, Z.; Chen, X.;

- Fu, L.; Ambudkar, S. V.; et al. Marine Sponge-Derived Sipholane Triterpenoids Reverse P-Glycoprotein (ABCB1)-Mediated Multidrug Resistance in Cancer Cells. *Biochem. Pharmacol.* **2010**, *80* (10), 1497–1506. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2010.08.001>.
- (99) Lv, M.; Qiu, J.-G.; Zhang, W.-J.; Jiang, Q.-W.; Qin, W.-M.; Yang, Y.; Zheng, D.-W.; Chen, Y.; Huang, J.-R.; Wang, K.; et al. Wallichinine Reverses ABCB1-Mediated Cancer Multidrug Resistance. *Am. J. Transl. Res.* **2016**, *8* (7), 2969–2980.
- (100) Surendra, K.; Rajendar, G.; Corey, E. J. Useful Catalytic Enantioselective Cationic Double Annulation Reactions Initiated at an Internal  $\pi$ -Bond: Method and Applications. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *136*, 642–645. <https://doi.org/10.1021/ja4125093>.
- (101) Tietze, L. F.; von Kiedrowski, G.; Fahlbusch, K.-G.; Voss, E. Diastereoselective Formation of  $\alpha$ -Methoxycarbonyl Lactones through an Intramolecular Diels–Alder Reaction: (4RS,4aRS,6RS,8aRS)-, (4S,4aS,6S,8aS)- and (4R,4aR,6R,8aR)-4-Methoxycarbonyl-1-1-6-Trimethyl-1,4,4a,5,6,7,8,8a-Octahydro-2.3-Bezopyrone [Rac-5, (+)-. *Org. Synth.* **1993**, *8*, 353. <https://doi.org/10.15227/orgsyn.069.0031>.
- (102) Szakonyi, Z.; Sillanpää, R.; Fülöp, F. Stereoselective Synthesis of Perillaldehyde-Based Chiral  $\beta$ -Amino Acid Derivatives through Conjugate Addition of Lithium Amides. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10* (1), 2738–2742. <https://doi.org/10.3762/bjoc.10.289>.
- (103) Hansen, M. B.; Nielsen, S. E.; Berg, K. Re-Examination and Further Development of a Precise and Rapid Dye Method for Measuring Cell Growth/Cell Kill. *J. Immunol. Methods* **1989**, *119* (2), 203–210. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(89\)90397-9](https://doi.org/10.1016/0022-1759(89)90397-9).
- (104) Rodriguez-Lara, V.; Ignacio, G.-S.; Cerbón Cervantes, M. A. Estrogen Induces CXCR4 Overexpression and CXCR4/CXL12 Pathway Activation in Lung Adenocarcinoma Cells *in Vitro*. *Endocr. Res.* **2017**, 1–13. <https://doi.org/10.1080/07435800.2017.1292526>.
- (105) Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anti-Cancer Drug Screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82* (13), 1107–1112. <https://doi.org/10.1093/jnci/82.13.1107>.
- (106) Dewar, M. J. S.; Zoebisch, E. G.; Healy, E. F.; Stewart, J. J. P. AM1: A New General Purpose Quantum Mechanical Molecular Model. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 3902–3909. <https://doi.org/10.1021/ja00299a024>.
- (107) Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.-; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.;

- Olson, A. H. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30* (6), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc>.
- (108) Trott, O.; Olson, A. J. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *J. Comput. Chem.* **2009**, *31* (2), 455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.
- (109) Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function. *J. Comput. Chem.* **1998**, *19* (14), 1639–1662. <https://doi.org/10.1002/jcc.20634>.
- (110) Carugo, O.; Pongor, S. A Normalized Root-Mean-Square Distance for Comparing Protein Three-Dimensional Structures. *Protein Sci.* **2008**, *10* (7), 1470–1473. <https://doi.org/10.1110/ps.690101>.

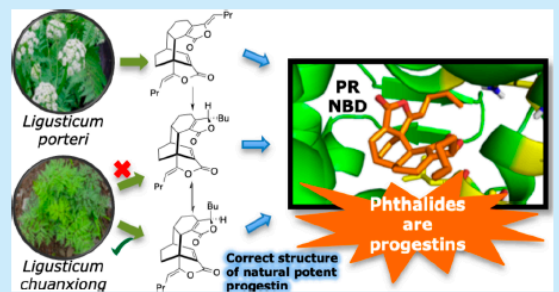
## Structural Reassignment of *rel*-(3'*Z*,3*R*,6*R*,7*R*,3*a'**R*,6'*R*)-3,8-Dihydrodiligustilide and the Activity of Diligustilide and 3,8-Dihydro- and 3,8,7',7*a'*-Tetrahydrodiligustilides as Progestins

José Luis Ávila, Ericka K. P. Almeida-Aguirre,<sup>†</sup> Carlos A. Méndez-Cuesta,<sup>‡</sup> Rubén A. Toscano, Marco A. Cerbón Cervantes,<sup>†</sup> and Guillermo Delgado\*<sup>§</sup>

Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, Ciudad de México, Mexico

**S** Supporting Information

**ABSTRACT:** Several phthalides were semisynthesized, including a 3,8-dihydrodiligustilide with progesterone-like activity, previously isolated from *Ligusticum chuanxiong*, the structure of which was earlier assigned to a semisynthetic product with nonidentical spectroscopic constants. The structure of this natural phthalide was reassigned with a proposal of its absolute configuration. Phthalides acted as progestins in cell viability assays, immunofluorescence microscopy, and docking analysis. Therefore, the structures for natural and semisynthetic phthalides with potential use in hormone-related therapies were reassigned.



Progestins are substances that act as progesterone receptor (PR) agonists and can induce the natural activity of progesterone.<sup>1</sup> These compounds are used in hormone replacement therapy<sup>2–4</sup> and contraception<sup>5,6</sup> and for the treatment of infertility, although there are risks associated with these uses, such as an increased breast cancer incidence, depending upon the progestin.<sup>4,7</sup> Therefore, identifying new progestins, with fewer side effects, that could be used for therapeutic purposes is warranted.

Phthalides are a group of compounds isolated from several natural sources, such as plants, fungi, and lichens,<sup>8</sup> and are secondary metabolites of some plants belonging to the Apiaceae family.<sup>9</sup> The latter are widely used in traditional medicines in Asia and North America.<sup>8–10</sup> For example, *Ligusticum porteri* is employed in folk medicine in Northern Mexico and Southern USA for headaches, colds, stomach disorders, diabetes, etc.<sup>11,12</sup> The bioactivity of phthalides correlates in several cases with the traditional uses of the plants; e.g., compound 1 has antinociceptive activity,<sup>13</sup> phthalides 1, 2, *rac*-3, and *rac*-4 have sedative effects,<sup>14</sup> and *rac*-3 is a gastroprotector (see Figure 1).<sup>15</sup>

Chuanxiong rhizome (*L. chuanxiong*) is recommended for menstrual disorders in traditional Chinese medicine, and this use correlates with the isolation of progestins *rac*-5 and, specifically, 6, which activate the PR according to a gene reporter assay.<sup>16,17</sup> However, structure 6 had been previously assigned to one of the hydrogenation products of *rac*-3.<sup>18</sup> Therefore, two sets of different physical data were allocated to the same structure, and one was incorrectly assigned. Analysis of the spectroscopic data allowed us to hypothesize that we were observing epimers at C3 of 3,8-dihydrodiligustilide.

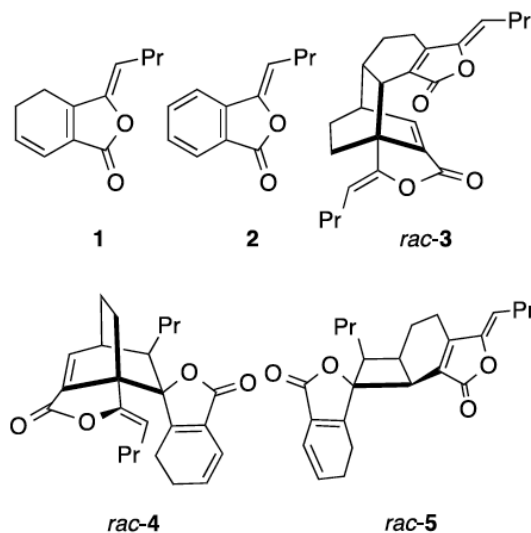


Figure 1. Phthalides from Apiaceae plants.

Herein, we report the semisynthesis of both C3 epimers of 3,8-dihydrodiligustilide from diligustilide (*rac*-3), the structural correction and absolute configuration of the bioactive Diels–Alder adduct of *L. chuanxiong* (reported as 6), as well as the

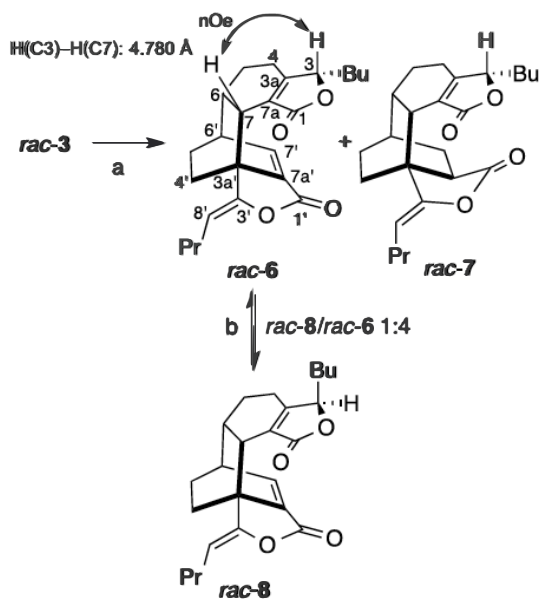
Received: August 6, 2019

Published: September 9, 2019

evaluation of these compounds as progestins. Theoretical calculations were also performed to explore the interaction between phthalides and PR.

In the first stage, the hydrogenation of the natural product *rac*-3 (reisolated from *L. porteri*) was achieved, yielding 3,8-dihydro- and 3,8,7',7a'-tetrahydro-derivatives, *rac*-6 and *rac*-7, respectively (Scheme 1), which were characterized through

Scheme 1. Derivatization of Diligustilide (*rac*-3)<sup>a</sup>



<sup>a</sup>Reagents: (a) H<sub>2</sub>/Pd-C (*rac*-6: 66%, *rac*-7: 12%); (b) DBU/THF (MW or reflux, *rac*-8: 18%).

spectroscopic methods. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR assignments of the obtained compounds (Table 1) were coincident with the semisynthetic products obtained previously in our group.<sup>18</sup> The orientation of the hydrogen attached to C3 of *rac*-6 was determined by the NOE existing between this hydrogen ( $\delta_{\text{H}}$  4.56) and the one bonded to C7 ( $\delta_{\text{H}}$  3.18), indicating that both atoms should be oriented toward the same side of the molecule. This observation was confirmed by X-ray crystallography, which showed that the butyl substituent pointed to the inner side of the molecule, and the calculated distance between hydrogens bound to C3 and C7 is 4.780 Å. The structure of the tetrahydroderivative (*rac*-7) was also confirmed by X-ray crystallography (see the Supporting Information), being consistent with the former observation. Consequently, the metabolite from *L. chuanxiong* could not be 6.

A substantial difference in the spectroscopic constants was the <sup>1</sup>H NMR chemical shift of the hydrogen bound to C3, which is  $\delta_{\text{H}}$  4.56 for the semisynthetic product (*rac*-6)<sup>18</sup> and  $\delta_{\text{H}}$  4.80 for the natural product isolated from *L. chuanxiong*.<sup>16</sup> We envisaged the possibility of epimerizing *rac*-6 to confirm that the natural product corresponded to *rac*-8. This task was attempted by reacting *rac*-6 with DBU in refluxing THF for 24 h and for 30 min upon microwave irradiation. By increasing the temperature, or the reaction length, a retro-Diels–Alder reaction was observed. As a result, a separable 1:4 mixture of *rac*-8 and *rac*-6 was obtained (<sup>1</sup>H NMR control). The

spectroscopic data of compound *rac*-8 were consistent with those reported for the *L. chuanxiong* metabolite (minor connections in <sup>13</sup>C NMR chemical shifts were performed for C4 and C8, Table 1). Therefore, the correct structure for this potent natural progestin is one of the enantiomers of *rac*-8.

The fact that the progestogenic 3,8-dihydrodilugustilide isolated from *L. chuanxiong* was found as an enantiomerically pure compound could be explained through a Diels–Alder reaction between (*Z*)-ligustilide (1) as a diene and one enantiomer of 3,8-dihydrodilugustilide as a dienophile. Thus, the absolute configuration of this substance could be deduced as follows: considering the characterization of the racemic epimers at C3 of 3,8-dihydrodilugustilides and that only the 3*S*-enantiomer of 3,8-dihydrodilugustilide has been characterized as a natural product (senkyunolide A, 9), then the biosynthetic Diels–Alder reaction for producing the enantiomerically pure adduct (the metabolite of *L. chuanxiong*)<sup>16</sup> should proceed via a face-differentiated *supra, supra* approach between the C3a'si, C6'si face of diene 1 and the C6si, C7re face of 9 (*endo-β* approach of the dienophile to the diene) to produce (3'*Z*, 3*S*, 6*R*, 7*R*, 3a'*R*, 6'*R*)-3,8-dihydrodilugustilide (*ent*-8 in Scheme 2).

Thus, *ent*-8 (not 6) is the structure of the phthalide isolated from *L. chuanxiong*. We then verified its activity (and that of the other phthalides) as progestin.

The T47D cancer cell line viability was determined through MTT assays. Given that it is a measure of the mitochondrial metabolic activity, the assay provides information on cell proliferation. The results showed that *rac*-6, *rac*-7, and *rac*-8 increased cell proliferation after 24 h of treatment, depending on the concentration (see Figure 2). Of note, *rac*-6 and *rac*-7 had a similar effect to that of progesterone (P4). In contrast, the effect of *rac*-3 was not significantly different than the control. The observed effect could be attributed to the interaction of phthalides with PR because this observation is consistent with the fact that progestins up-regulate the proliferation of T47D cells.<sup>19–22</sup>

The translocation of PR from the cytoplasm to the nucleus, due to the nuclear translocation signal depending on the hormone, and its retention there, may be a consequence of exposure to progestins, which induces PR phosphorylation, particularly at residue Ser 294.<sup>23,24</sup> It was observed through immunofluorescence microscopy (IMF) that after 20 min of treatment, phosphorylated PR (phospho<sup>294</sup>-PR) is distributed mainly throughout the cytoplasm for the control. The same occurs for *rac*-3 and *rac*-8 (shown in the Supporting Information). On the other hand, phospho<sup>294</sup>-PR was in perinuclear or nuclear localization after treatment with compounds *rac*-6 and *rac*-7 (see Figure 3). This result is evidence that this phthalide acts as a progestin, i.e., it is an agonist of PR, capable of inducing its phosphorylation, which in turn allows for the translocation of this nuclear receptor from the cytoplasm to the nucleus after 20 min, where it remains and activates signaling pathways concerning PR function.

Furthermore, molecular docking of tested phthalides (both enantiomers of *rac*-3, *rac*-6 and *rac*-8) on PR supported the agonist activity of these compounds toward this protein. Docking calculations between the studied phthalides and PR (using three different crystallized structures of this protein, 4APU,<sup>25</sup> 3ZR7,<sup>26</sup> and 1ZUC<sup>27</sup>), performed in both AutoDock 4.2<sup>28</sup> and AutoDock VINA,<sup>29</sup> showed that all of the tested phthalides interact with the protein near the ligand binding

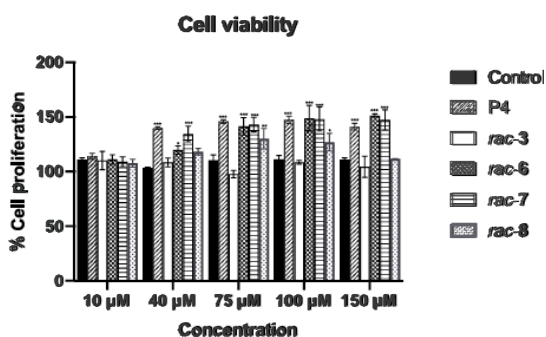
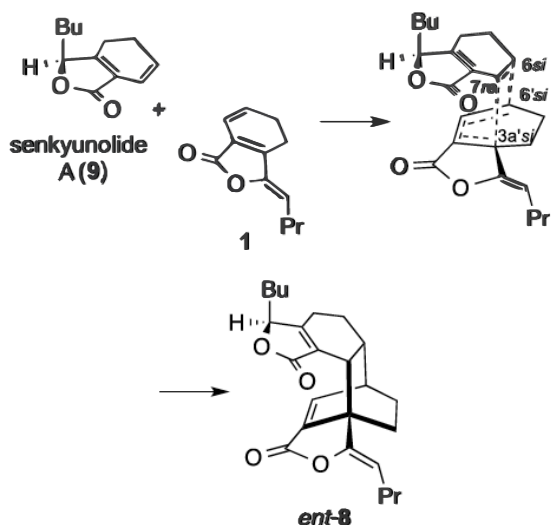
Table 1.  $^1\text{H}$  NMR (700 MHz) and  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz) Data for *rac-6*, *rac-7*, and *rac-8* ( $\text{CDCl}_3$ )

position	<i>rac-6</i>		<i>rac-7</i>		<i>rac-8</i>	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ , multiplicity (J, Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ , multiplicity (J, Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ , multiplicity (J, Hz)
1	171.9		171.7		172.2	
3	82.5	4.56, ddd (7.5, 4.0, 2.0)	83.3	4.55, dt (9.5, 3.0)	81.5	4.80, dd (7.5, 3.5)
3a	168.2		166.2		168.2	
4	22.4	2.08, dddd (17.5, 12.5, 5.0, 2.0); 1.99, dd (17.5, 4.5)	22.7	2.59, dddd (18.5, 12.5, 6.0, 2.5); 2.23, dd (18.5, 6.0)	21.7	2.07–1.97, m
5	28.8	1.54, dddd (13.5, 12.0, 7.0, 5.0); 1.90, dddd (13.5, 4.5, 1.0, 0.5)	27.5	1.92–1.88, m; 1.70–1.51, m	29.4	1.91, ddt (14.0, 4.5, 1.5); 1.50–1.44, m
6	38.3	2.54, t (8.0)	33.0	2.21–2.17, m	38.4	2.52, dd (8.0)
7	41.1	3.18, d (9.0)	38.0	2.86, d (10.0)	41.1	3.20, d (9.0)
7a	127.1		126.2		127.8	
8	32.2	1.68, dtd (8.0, 4.5, 1.9); 1.45–1.35, m	31.6	1.70–1.51, m	31.2	1.43–1.37, m; 1.36–1.22, m
9	26.5	1.35–1.25, m	28.3	1.70–1.5, m; 1.47–1.41, m	26.5	1.17, dddd (11.0, 4.5, 3.5, 2.0); 2.07–1.97, m
10	22.3	1.25–1.35, m	22.3	1.41–1.32, m	22.5	1.43–1.37, m; 1.36–1.22, m
11	13.7	0.90, t (7.0)	13.9	0.92, t (7.5)	14.0	0.85, t, (7.0)
1'	165.0		175.3		165.3	
3'	150.6		153.1		150.6	
3a'	47.4		43.8		47.6	
4'	30.9	2.03, ddd (12.5, 10.0, 5.0); 1.45–1.35, m	29.8	1.95, ddd (13.0, 9.5, 7.5); 1.85, ddd (13.0, 11.0, 1.5)	31.3	2.07–1.97, m; 1.81, dddd (14.0, 10.5, 4.5, 3.5)
5'	25.7	1.86, dq (9.8, 3.1); 1.35–1.25, m	27.3	1.83–1.78, m; 1.70–1.51	25.7	1.91, ddt (13.5, 4.5, 1.5); 1.87, ddt (13.5, 10.0, 3.5)
6'	41.6	2.97, dq (5.5, 2.5)	33.6	1.83–1.78, m	41.8	2.98, dq (6.5, 2.5)
7'	141.9	7.33, d (6.5)	23.0	1.83–1.78, m	142.2	7.33, d (6.5)
7a'	134.5		41.0	2.47 t (10.0)	134.6	
8'	108.6	4.98, t (7.5); 1.45–1.35, m	105.7	4.70, t (7.5)	108.9	4.98, dd (8.0, 7.0)
9'	27.5	2.18 m q (7.5)	27.1	2.13, q (7.5)	27.6	2.20–2.10, m
10'	22.3	1.51–1.45, m; 1.45–1.35, m	22.3	1.52–1.47, m; 1.41–1.32, m	22.3	1.51–1.4, m; 1.43–1.37, m
11'	14.0	0.92, t (7.5)	13.9	0.91, t (7.5)	14.1	0.91, t (7.5)

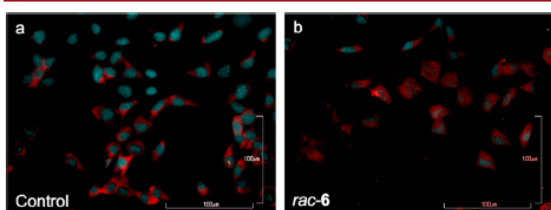
7462

DOI: 10.1021/acs.orglett.9b02762  
Org. Lett. 2019, 21, 7460–7465

**Scheme 2. Regio- and Stereo-Differentiated Biosynthetic Diels–Alder Reaction (1 + 9) for Producing *ent*-8**



**Figure 2.** T47D cell proliferation assays with tested compounds at 24 h. Proliferation increased upon treatment with *rac*-6, *rac*-7, and progesterone at 40, 75, 100, and 150  $\mu$ M. Results are presented as the means  $\pm$  SD ( $n = 3$ ); \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.002$ , \* $p < 0.033$  compared with the control.



**Figure 3.** Immunofluorescence microscopy showing subcellular localization of PR in T47D cells labeled with phospho<sup>254</sup> PR (red) and nucleus stained in blue with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for: (a) untreated cells, with PR located in the cytoplasm, and (b) cells after treatment with test *rac*-6, pPR is notably located inside the nucleus. Scale bars: 100  $\mu$ m.

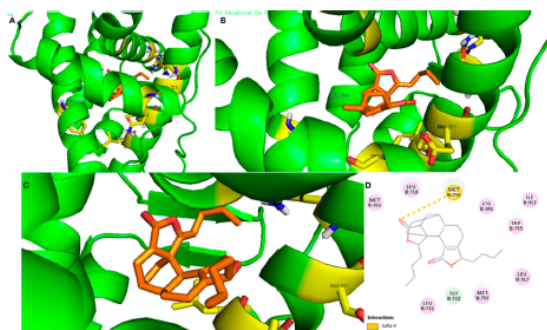
domain (LBD), similar to progesterone and other agonists.<sup>25,30</sup> The respective docking scores are shown in Table 2. On the

basis of these results, all proven natural and semisynthetic phthalides could be PR agonists.

**Table 2. Calculated Affinity Energies for Interaction between Phthalides and Different Crystallized Structures of PR**

compd	−ΔG (kcal/mol)					
	4APU		3ZR7		1ZUC	
	AD4	VINA	AD4	VINA	AD4	VINA
3	10.44	4.9	11.24	6.9	10.56	4.6
6	10.99	4.7	10.76	6.2	10.05	4.7
7	10.61	5.1	10.98	5.8	9.88	3.9
8	11.10	4.8	11.33	6.5	11.67	7.4
<i>ent</i> -3	10.71	4.9	10.96	6.5	9.81	5.0
<i>ent</i> -6	10.97	4.7	10.88	6.2	10.43	3.7
<i>ent</i> -7	10.79	4.6	10.87	6.7	9.46	3.7
<i>ent</i> -8	11.04	4.7	10.77	7.1	10.45	4.0
P4	11.14	5.3	22.48	7.6	24.27	10

As mentioned above, these compounds were located near the LBD, consistent with the experimental results of the activity of phthalides as progestins. Of note, the calculated affinity energies were similar among the tested compounds. For example, in the case of structure 4APU using AD4, the energies for all of the compounds are in the range of −10.44 and −11.14 kcal/mol, like P4. With VINA, a similar behavior was observed, and the range was between −4.7 and −5.3 kcal/mol, very close to, and similar to, P4. In particular, we found that compound 6 showed an interaction between the sulfur (from residue Met-756) and carbonyl oxygen from the ligand, as shown in Figure 4 (S–O attractive interactions, though



**Figure 4.** (A–C) Docking position of 6 with PR. (D) 2D interaction diagram between 6 and PR.

counterintuitive, are common).<sup>31</sup> The correct interaction of ligands with this residue is relevant to increase agonistic activity, which correlates with the *in vitro* results for *rac*-6.<sup>26</sup>

Hence, we demonstrated that, despite the misassignment of the structure of the compound from *L. chuanxiong* (*ent*-8), it actually acts as a progestin, as do other hydrodilugustilides. Furthermore, this class of compounds could be a family of phytoprogestins useful in therapy, different from the natural flavonoids displaying this activity.<sup>32,33</sup> The impact of any side effects of these phthalides and its optimization remain unstudied.

In summary, we prepared two bioactive compounds, correcting the originally reported structure for the natural



progesterin isolated from *L. chuanxiong* and proposing its absolute configuration (formula (3'Z,3S,6R,7R,3a'R,6'R)-8). These compounds increased cell viability in hormonodependent T47D cancer cells and led to the phosphorylation of PR and its translocation into the nucleus, according to experimental and computational studies. These results are evidence of the progesterin-like activity of dimeric phthalides, such as dihydro- and tetrahydrodilugustilides, which may be considered as possible candidates for hormone replacement therapies.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.orglett.9b02762.

Experimental details, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra, and X-ray crystallography details (PDF)

### Accession Codes

CCDC 1921193–1921194 contain the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge via [www.ccdc.cam.ac.uk/data\\_request/cif](http://www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif), or by emailing [data\\_request@ccdc.cam.ac.uk](mailto:data_request@ccdc.cam.ac.uk), or by contacting The Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: +44 1223 336033.

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*E-mail: [delgado@unam.mx](mailto:delgado@unam.mx).

### ORCID

Guillermo Delgado: 0000-0002-1394-6300

### Present Addresses

<sup>†</sup>(E.K.P.A.-A., M.A.C.C.) Department of Biology, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, Ciudad de México, México.

<sup>‡</sup>(C.A.M.-C.) Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Ciudad de México 04960, México.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was taken in part from the PhD thesis of J.L.A. The authors thank Universidad Nacional Autónoma de México (Dirección General de Asuntos del Personal Académico, PAPIIT IG200318), Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Scholarship 249731 awarded to J.L.A.). The authors also thank María Isabel Chávez, Ángeles Peña (Instituto de Química de la UNAM), and Beatriz Quiroz and Nuria Esturau (LURMN-IQ-UNAM, funded by CONACYT, Grant No. 0224747).

## ■ REFERENCES

- Piette, P. The History of Natural Progesterone, the Never-Ending Story. *Climacteric* 2018, 21 (4), 308–314.
- Lobo, R. A. The Role of Progestins in Hormone Replacement Therapy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1992, 166 (6), 1997–2004.
- Wang-Cheng, R.; Rosenfeld, J. A. *Hormone Replacement Therapy*; Elsevier, Ltd., 2003; Vol. 327.
- Brinton, L. A.; Felix, A. S. Menopausal Hormone Therapy and Risk of Endometrial Cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2014, 142, 83–89.
- Erkkola, R.; Landgren, B. M. Role of Progestins in Contraception. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 2005, 84 (3), 207–216.
- Sitruk-Ware, R.; Nath, A. The Use of Newer Progestins for Contraception. *Contraception* 2010, 82 (5), 410–417.
- Campagnoli, C.; Clavel-Chapelon, F.; Kaaks, R.; Peris, C.; Berrino, F. Progestins and Progesterone in Hormone Replacement Therapy and the Risk of Breast Cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2005, 96 (2), 95–108.
- León, A.; Del-Ángel, M.; Ávila, J. L.; Delgado, G. Phthalides: Distribution in Nature, Chemical Reactivity, Synthesis, and Biological Activity. In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*; Kinghorn, D. A., Falk, H., Gibbons, S., Kobayashi, J., Eds.; Springer: Cham, 2017; pp 127–246.
- Beck, J. J.; Chou, S.-C. The Structural Diversity of Phthalides from the Apiaceae. *J. Nat. Prod.* 2007, 70 (5), 891–900.
- Gijbels, M. J. M.; Scheffer, J. J. C.; Baerheim Svendsen, A. Phthalides in Umbelliferae. *Riv. Ital. EPPOS* 1979, 61, 335–341.
- Linares, E.; Bye, R. A. A Study of Four Medicinal Plant Complexes of Mexico and Adjacent United States. *J. Ethnopharmacol.* 1987, 19, 153–183.
- Bye, R. A.; Linares, E. Ethnobotanical Notes from the Valley of San Luis, Colorado (USA). *J. Ethnobiol.* 1986, 6, 289–306.
- Juárez-Reyes, K.; Angeles-López, G. E.; Rivero-Cruz, I.; Bye, R.; Mata, R. Antinociceptive Activity of *Ligusticum porteri* Preparations and Compounds. *Pharm. Biol.* 2014, 52 (1), 14–20.
- León, A.; Toscano, R. A.; Tortoniello, J.; Delgado, G. Phthalides and Other Constituents from *Ligusticum porteri*; Sedative and Spasmodic Activities of Some Natural Products and Derivatives. *Nat. Prod. Res.* 2011, 25 (13), 1234–1242.
- Velázquez-Moyado, J. A.; Martínez-González, A.; Linares, E.; Bye, R.; Mata, R.; Navarrete, A. Gastroprotective Effect of Dilugustilide Isolated from Roots of *Ligusticum porteri* Coulter & Rose (Apiaceae) on Ethanol-Induced Lesions in Rats. *J. Ethnopharmacol.* 2015, 174, 403–409.
- Liam, L. S.; Shen, P.; Gong, Y. H.; Yong, E. L. Dimeric Progestins from Rhizomes of *Ligusticum chuanxiong*. *Phytochemistry* 2006, 67 (7), 728–734.
- Hempen, C.-H. Herbs That Regulate the Blood. In *A Materia Medica for Chinese Medicine*; Carl-Hermann Hempen, T. F., Ed.; Churchill Livingstone: London, 2009; pp 514–617. DOI: 10.1016/b978-0-443-10094-9.00015-7.
- Delgado, G.; Reza-Garduño, R. G.; Toscano, R. A.; Bye, R.; Linares, E. Secondary Metabolites from the Roots of *Ligusticum porteri* (Umbelliferae). X-Ray Structure of Z-6,6',7,3'-a-Dilugustilide. *Heterocycles* 1988, 27 (6), 1305–1312.
- Migliaccio, A.; Piccolo, D.; Castoria, G.; Di Domenico, M.; Bilancio, A.; Lombardi, M.; Gong, W.; Beato, M.; Auricchio, F. Activation of the Src/P21ras/Erk Pathway by Progesterone Receptor via Cross-Talk with Estrogen Receptor. *EMBO J.* 1998, 17 (7), 2008–2018.
- Migliaccio, A.; Piccolo, D.; Castoria, G.; Di Domenico, M.; Bilancio, A.; Lombardi, M.; Gong, W.; Beato, M.; Auricchio, F. Non-Transcriptional Action of Oestradiol and Progesterin Triggers DNA Synthesis. *EMBO J.* 1999, 18 (9), 2500–2510.
- Camevale, R. P.; Proietti, C. J.; Salatino, M.; Urtreger, A.; Peluffo, G.; Edwards, D. P.; Boonyaratankornkit, V.; Charreau, E. H.; de Kier Joffe, E. B.; Schillaci, R.; Elizalde, P. V. Progestin Effects on Breast Cancer Cell Proliferation, Proteases Activation, and in Vivo Development of Metastatic Phenotype All Depend on Progesterone Receptor Capacity to Activate Cytoplasmic Signaling Pathways. *Mol. Endocrinol.* 2007, 21 (6), 1335–1358.
- Sreeharshan, S.; Azeez, J.; Sithul, H.; Hantharan, I.; Sreekumar, S.; Prabhakar, J.; Pillai, M. Progesterone Regulates the Proliferation of Breast Cancer Cells - in Vitro Evidence. *Drug Des. Dev. Ther.* 2015, 9, 5987–5999.

(23) Qiu, M.; Olsen, A.; Faivre, E.; Horwitz, K. B.; Lange, C. A. Mitogen-Activated Protein Kinase Regulates Nuclear Association of Human Progesterone Receptors. *Mol. Endocrinol.* 2003, 17 (4), 628–642.

(24) Hagan, C. R.; Daniel, A. R.; Dressing, G. E.; Lange, C. A. Role of Phosphorylation in Progesterone Receptor Signaling and Specificity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2012, 357 (1–2), 43–49.

(25) Lusher, S. J.; Raaijmakers, H. C. A.; Vu-Pham, D.; Kazemier, B.; Bosch, R.; McGuire, R.; Azevedo, R.; Hamersma, H.; Dechering, K.; Oubrie, A.; van Duin, M.; de Vlieg, J. X-Ray Structures of Progesterone Receptor Ligand Binding Domain in Its Agonist State Reveal Differing Mechanisms for Mixed Profiles of 11 $\beta$ -Substituted Steroids. *J. Biol. Chem.* 2012, 287 (24), 20333–20343.

(26) Lusher, S. J.; Raaijmakers, H. C. A.; Vu-Pham, D.; Dechering, K.; Lam, T. W.; Brown, A. R.; Hamilton, N. M.; Nimz, O.; Bosch, R.; McGuire, R.; Oubrie, A.; Vlieg, J. de. Structural Basis for Agonism and Antagonism for a Set of Chemically Related Progesterone Receptor Modulators. *J. Biol. Chem.* 2011, 286 (40), 35079–35086.

(27) Zhang, Z.; Olland, A. M.; Zhu, Y.; Cohen, J.; Berrodin, T.; Chippari, S.; Appavu, C.; Li, S.; Wilhem, J.; Chopra, R.; Fensome, A.; Zhang, P.; Wrobel, J.; Unwalla, R. J.; Lyttle, C. R.; Winneker, R. C. Molecular and Pharmacological Properties of a Potent and Selective Novel Nonsteroidal Progesterone Receptor Agonist Tanaproget. *J. Biol. Chem.* 2005, 280 (31), 28468–28475.

(28) Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. H. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.* 2009, 30 (16), 2785–2791.

(29) Trott, O.; Olson, A. J. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *J. Comput. Chem.* 2009, 31 (2), 455–461.

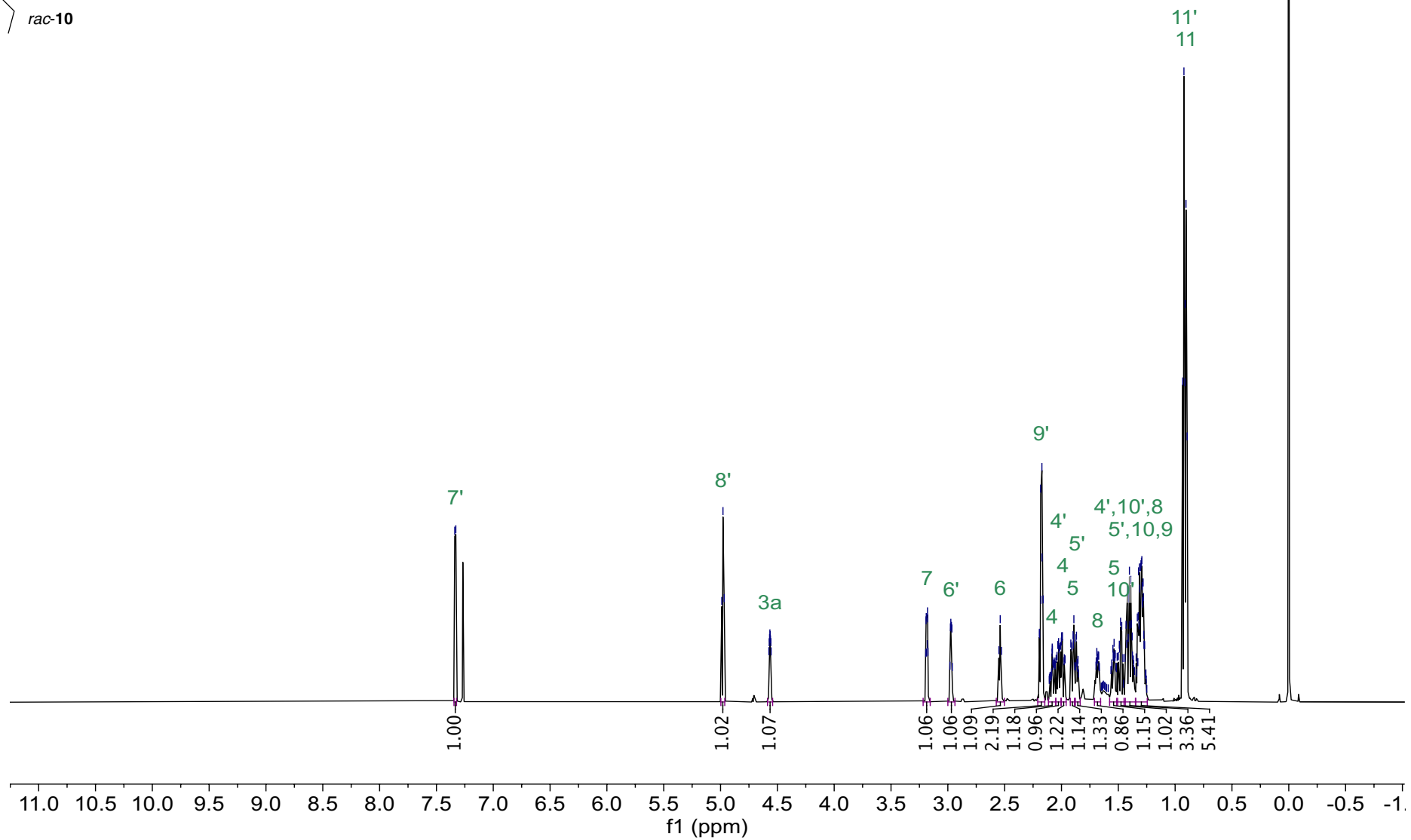
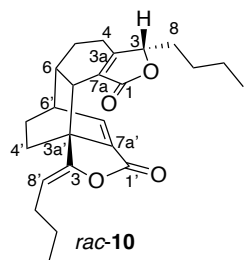
(30) Williams, S. P.; Sigler, P. B. Atomic Structure of Progesterone Complexed with Its Receptor. *Nature* 1998, 393 (6683), 392–396.

(31) Brameld, K. A.; Kuhn, B.; Reuter, D. C.; Stahl, M. Small Molecule Conformational Preferences Derived from Crystal Structure Data. A Medicinal Chemistry Focused Analysis. *J. Chem. Inf. Model.* 2008, 48, 1–24.

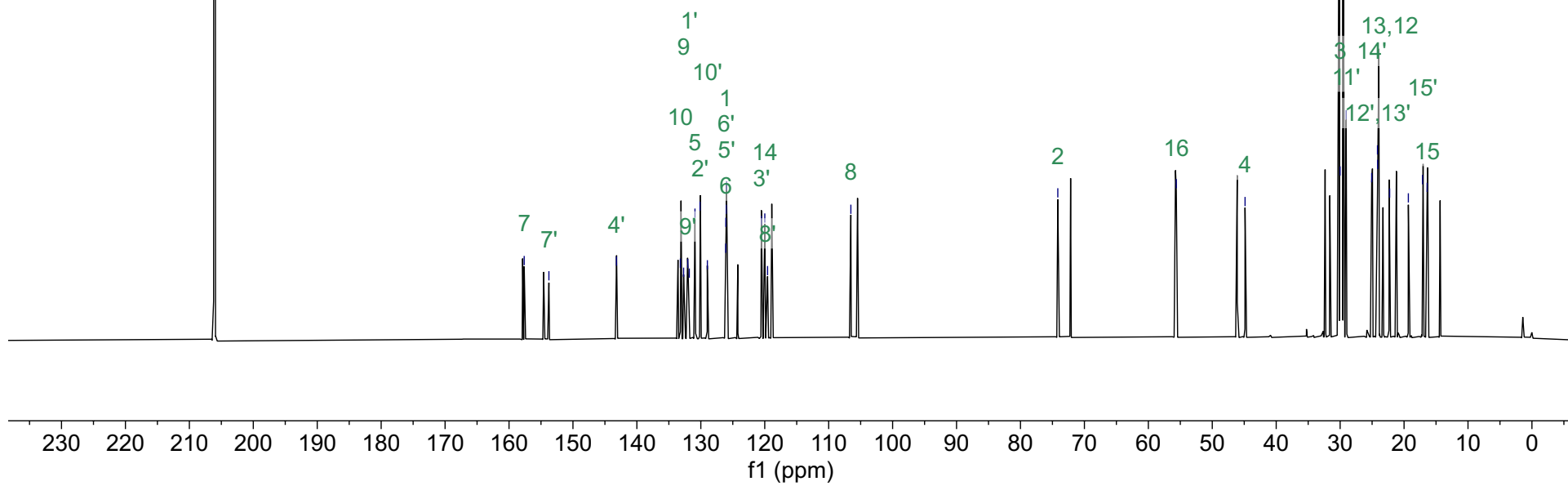
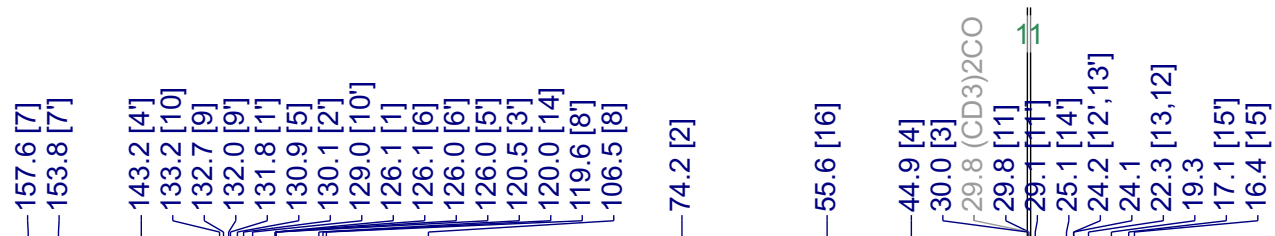
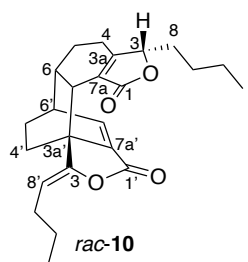
(32) Dean, M.; Murphy, B. T.; Burdette, J. E. Phytosteroids beyond Estrogens: Regulators of Reproductive and Endocrine Function in Natural Products. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2017, 442, 98–105.

(33) Dean, M.; Austin, J.; Jinhong, R.; Johnson, M. E.; Lantvit, D. D.; Burdette, J. E. The Flavonoid Apigenin Is a Progesterone Receptor Modulator with In Vivo Activity in the Uterus. *Horm. Cancer* 2018, 9 (4), 265–277.

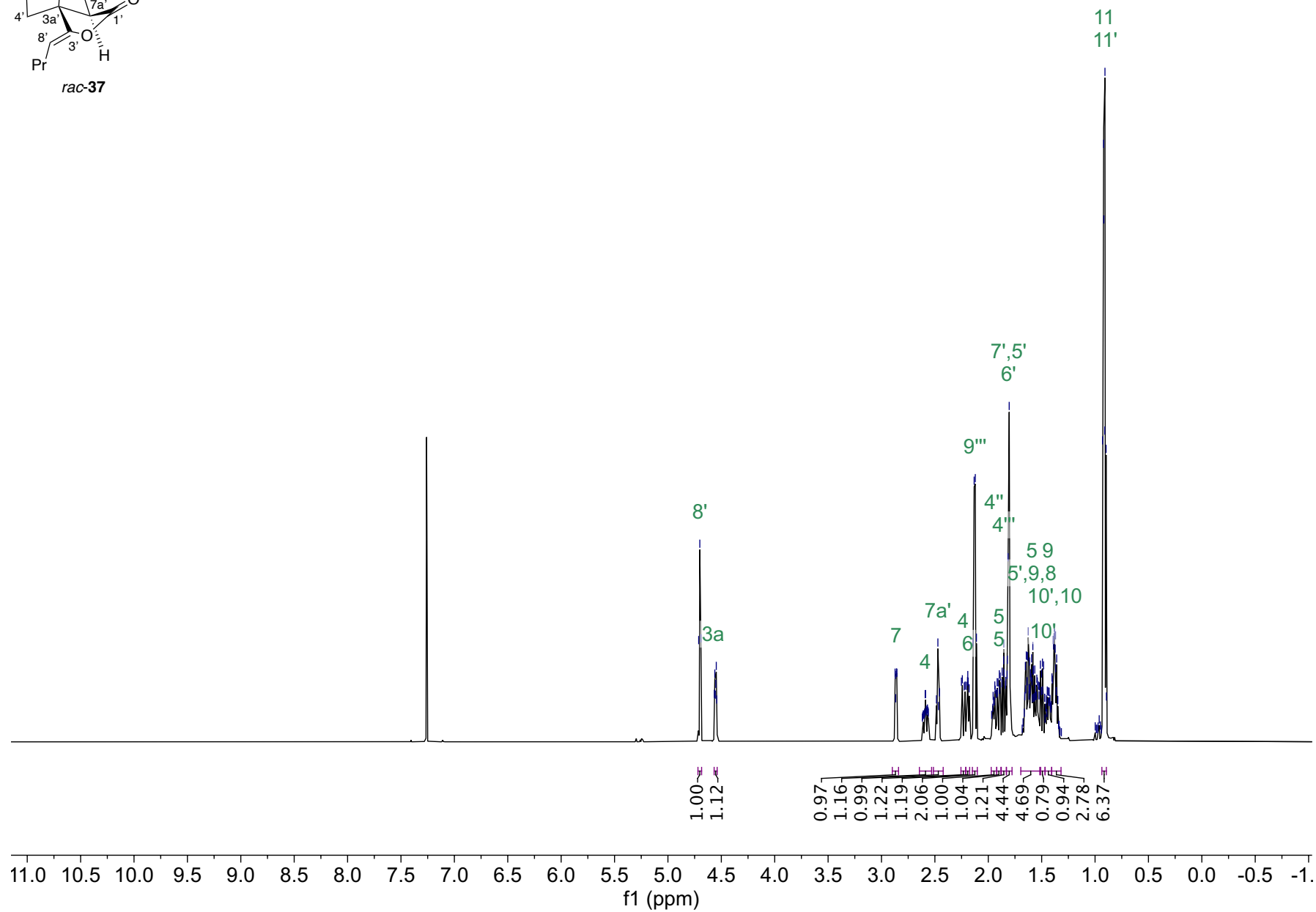
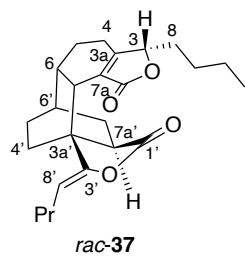
# Espectros



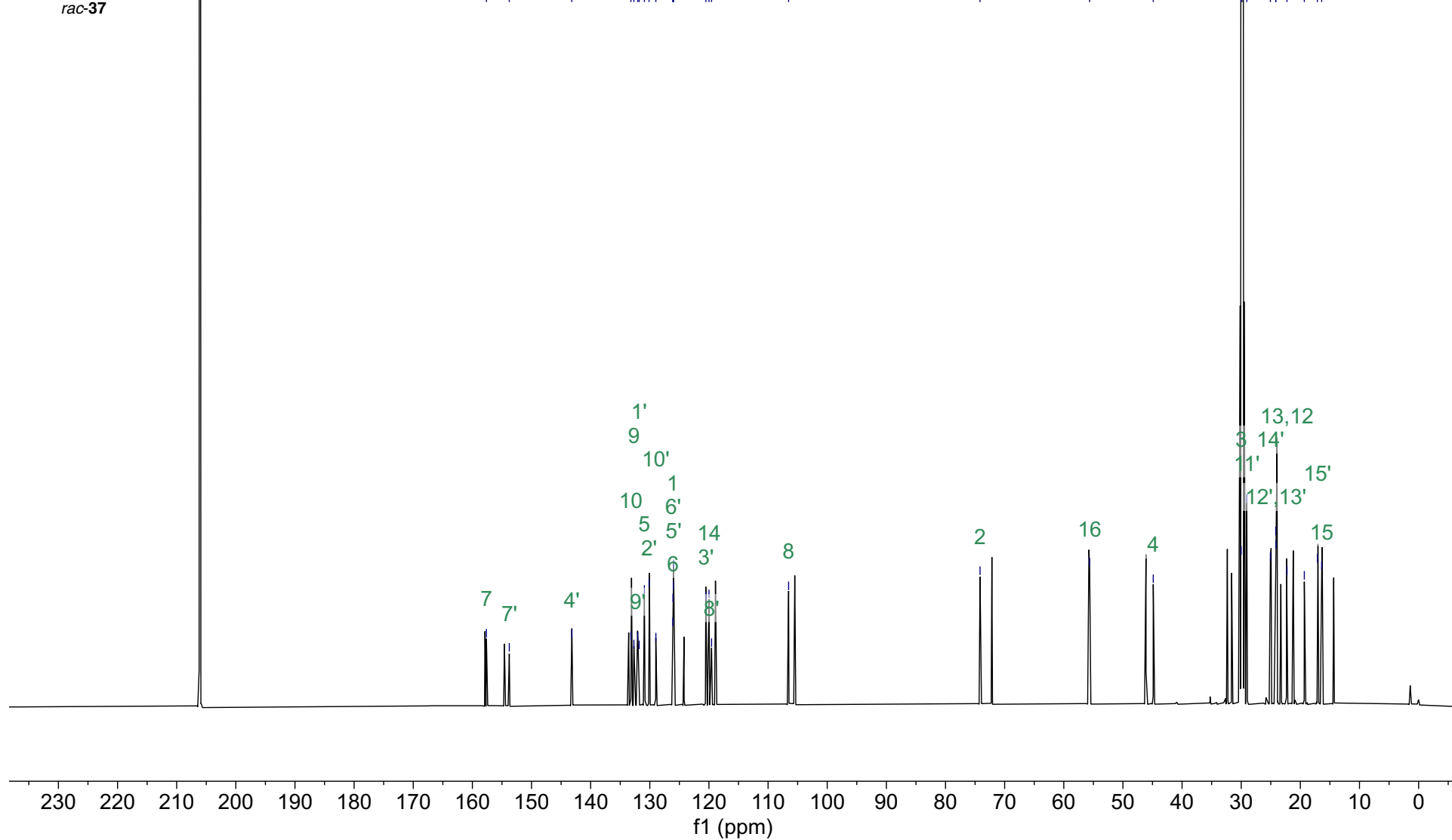
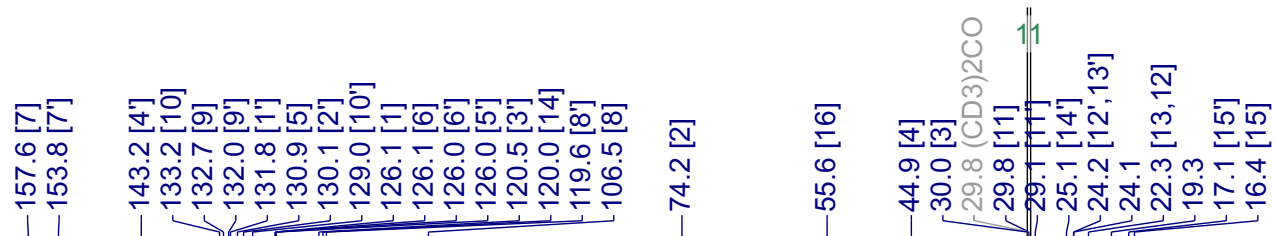
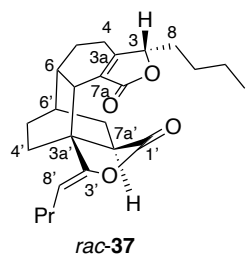
**E1.** Espectro RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 700 MHz) de *rac-10*.



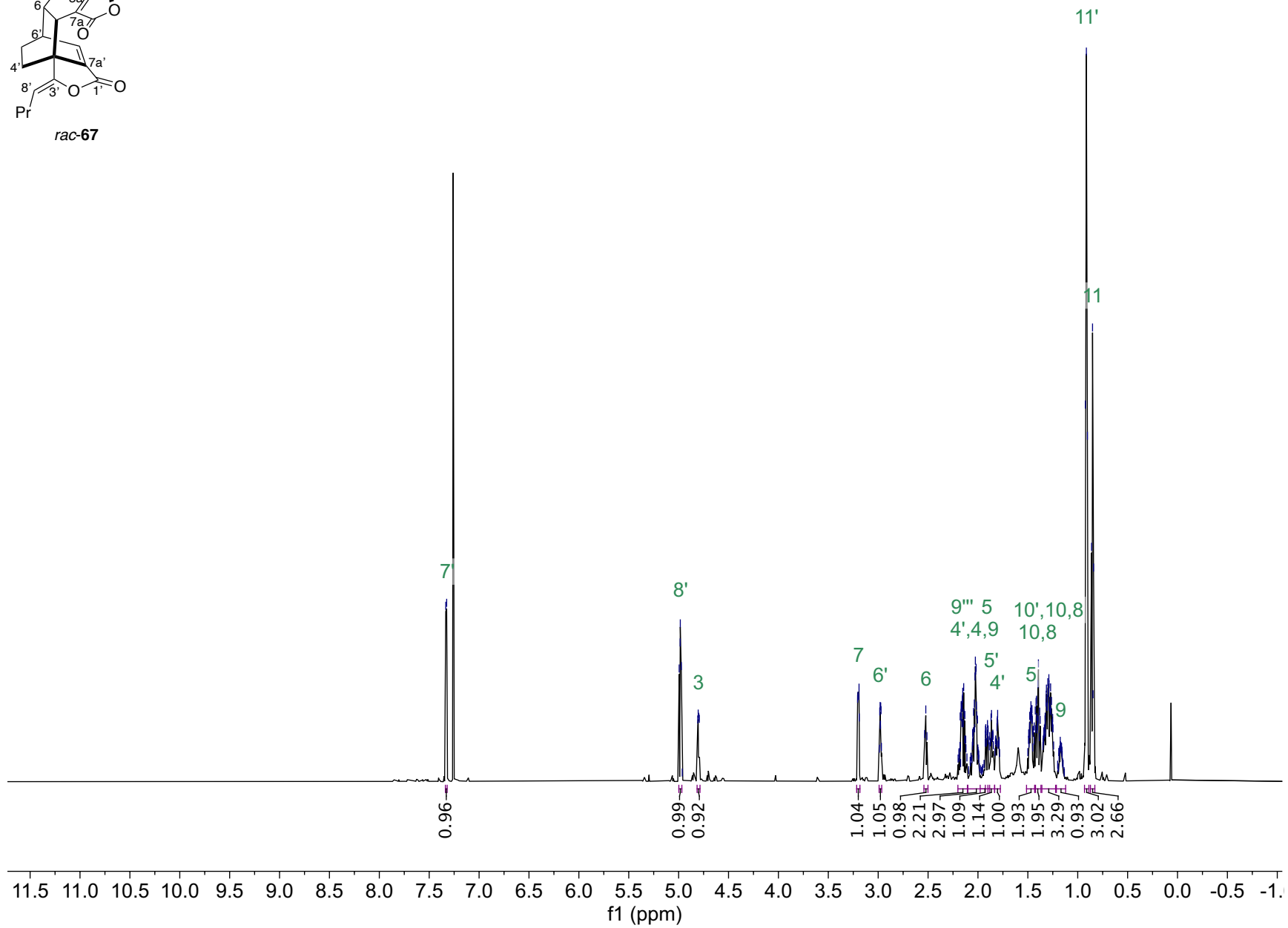
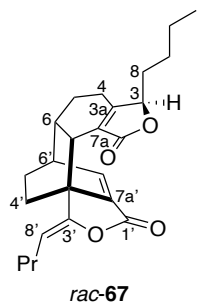
E2. Espectro RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 175 MHz) de *rac-10*.



**E3.** Spectro RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 700 MHz) de *rac-37*.

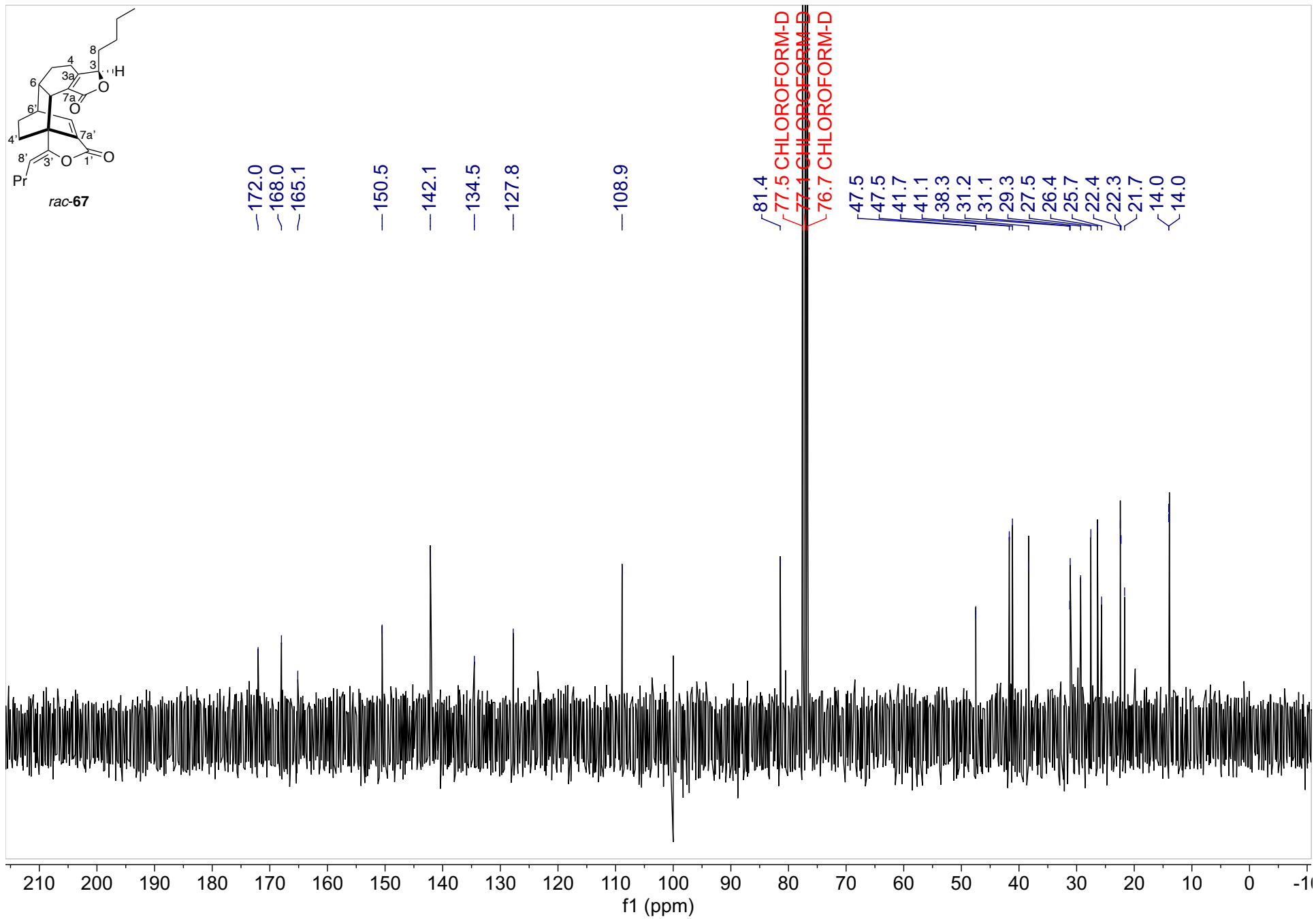


E4. Espectro RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 175 MHz) de *rac-37*.

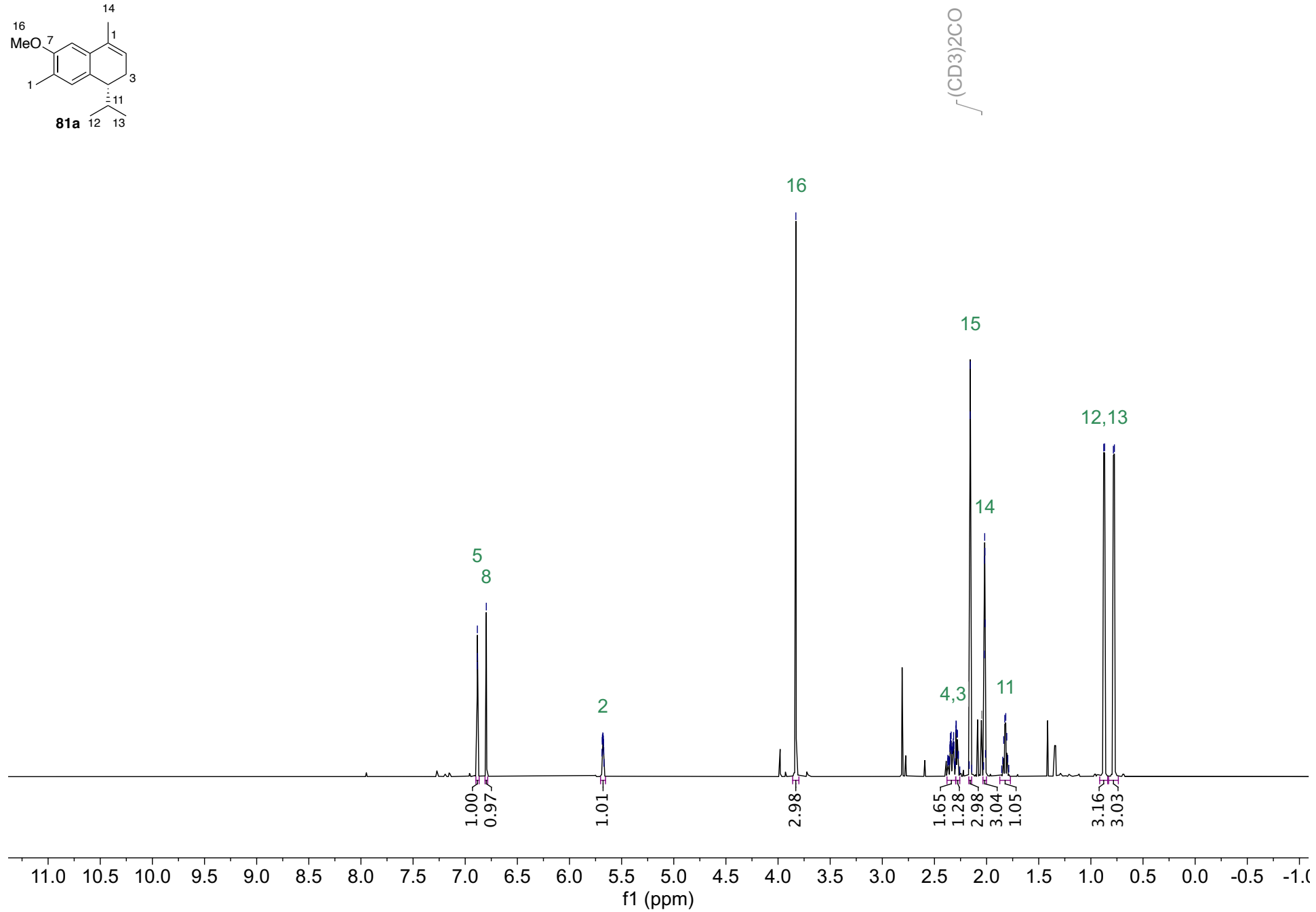
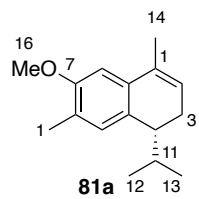


**E5.** Espectro RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 700 MHz) de *rac-67*.

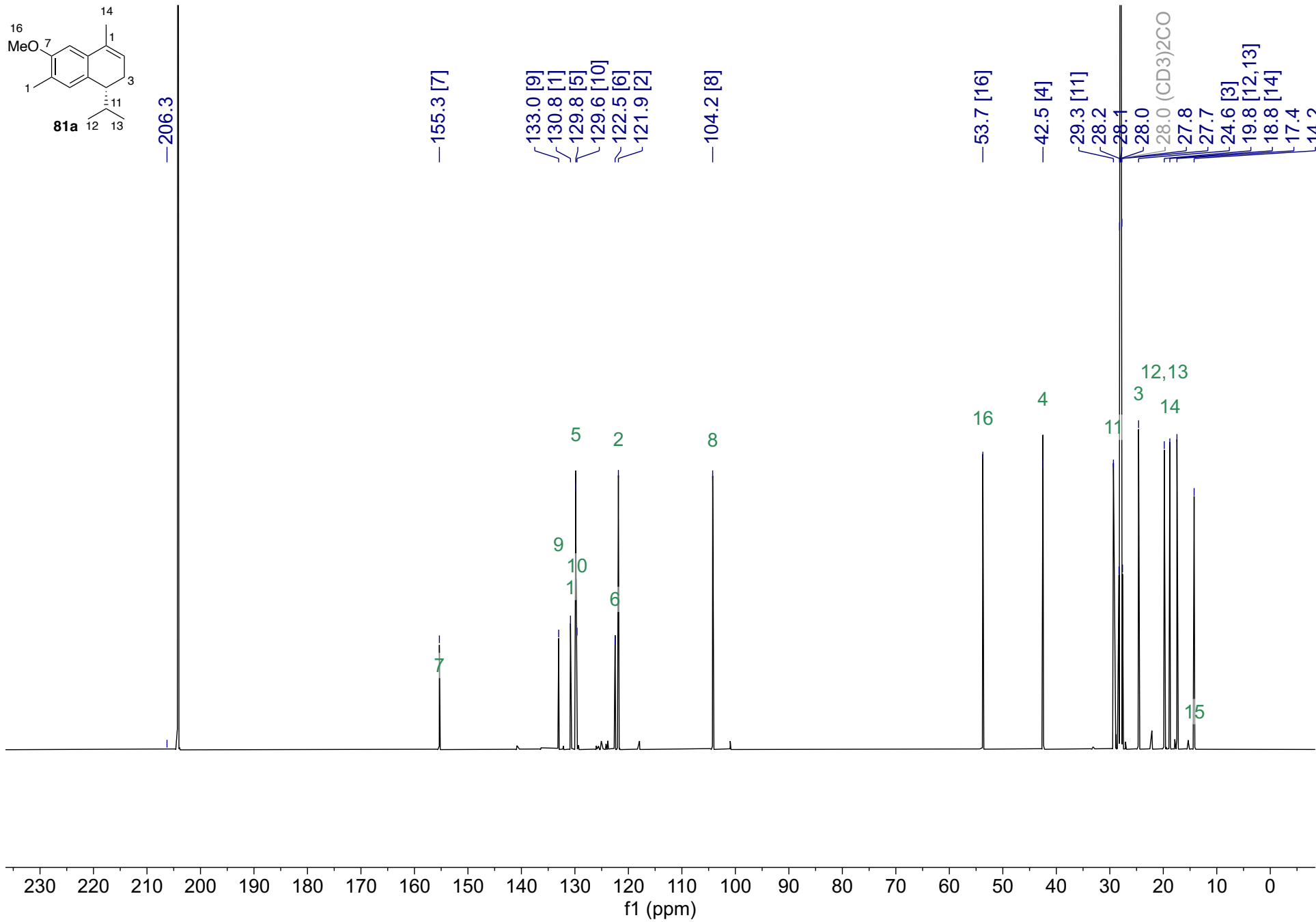
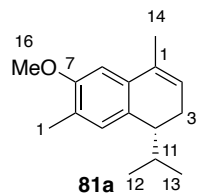




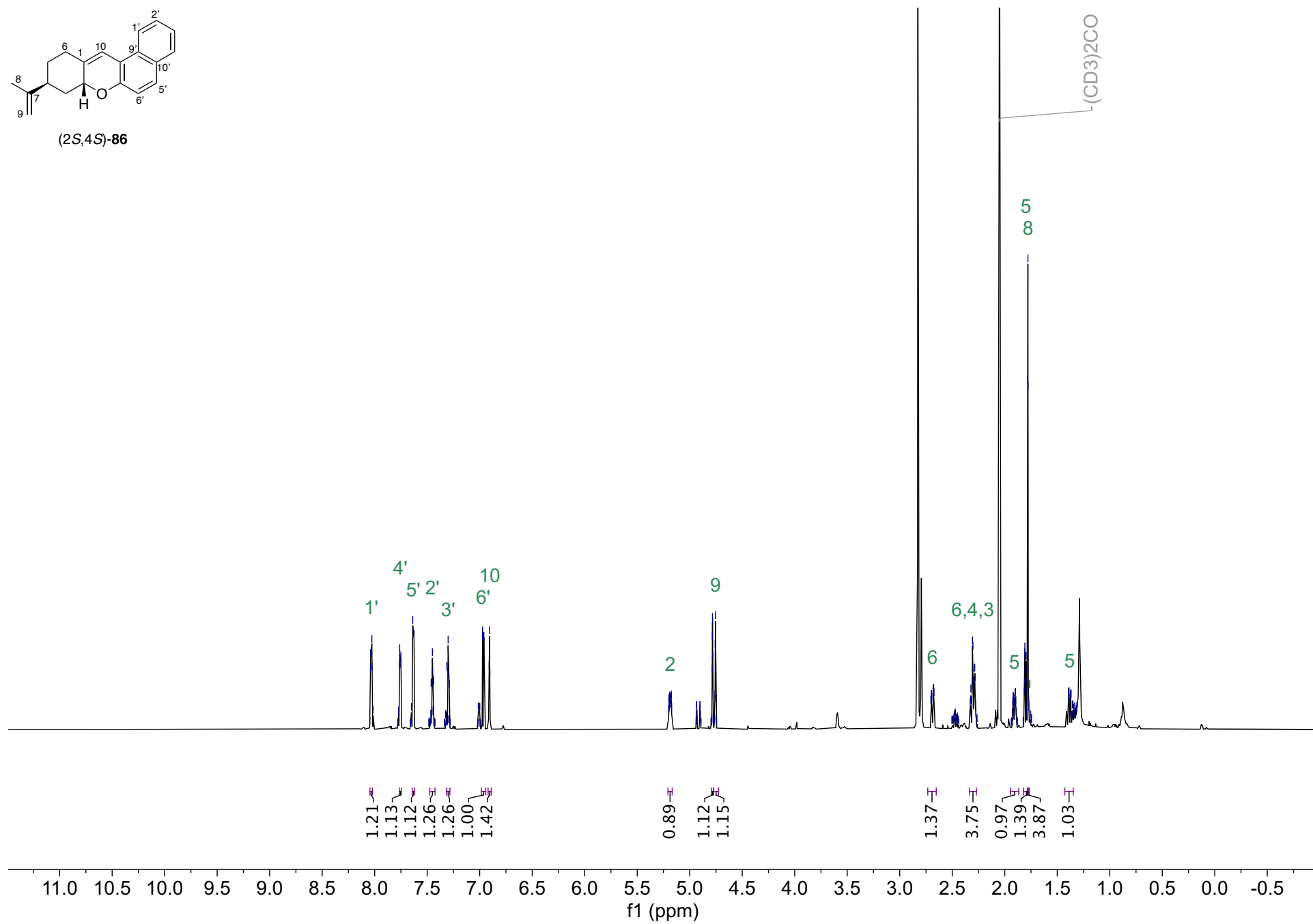
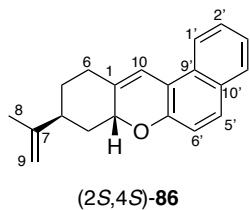
**E6.** Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 175 MHz) de *rac-67*.



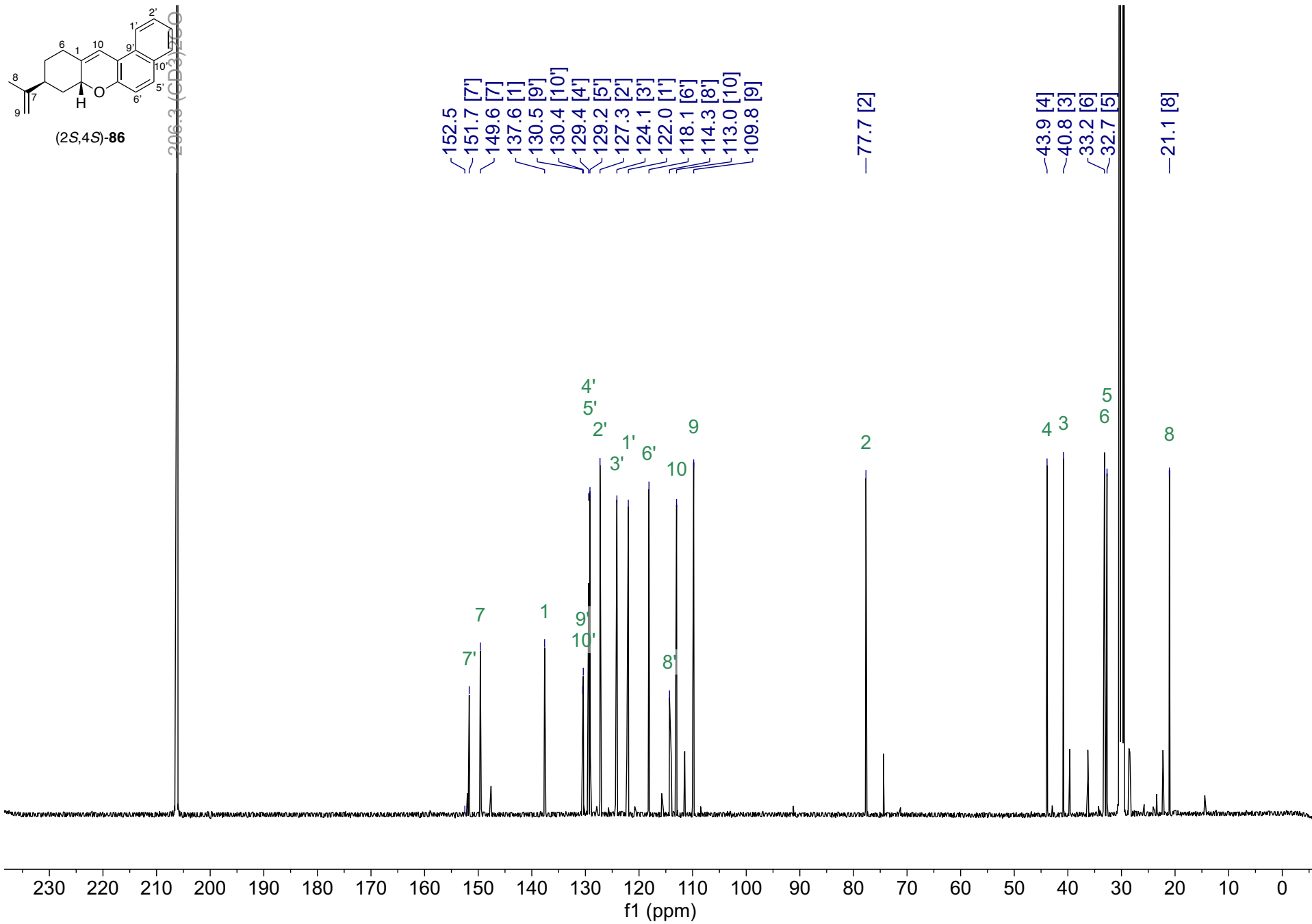
E7. Espectro RMN <sup>1</sup>H (acetona-d<sub>6</sub>, 700 MHz) de **81a**.



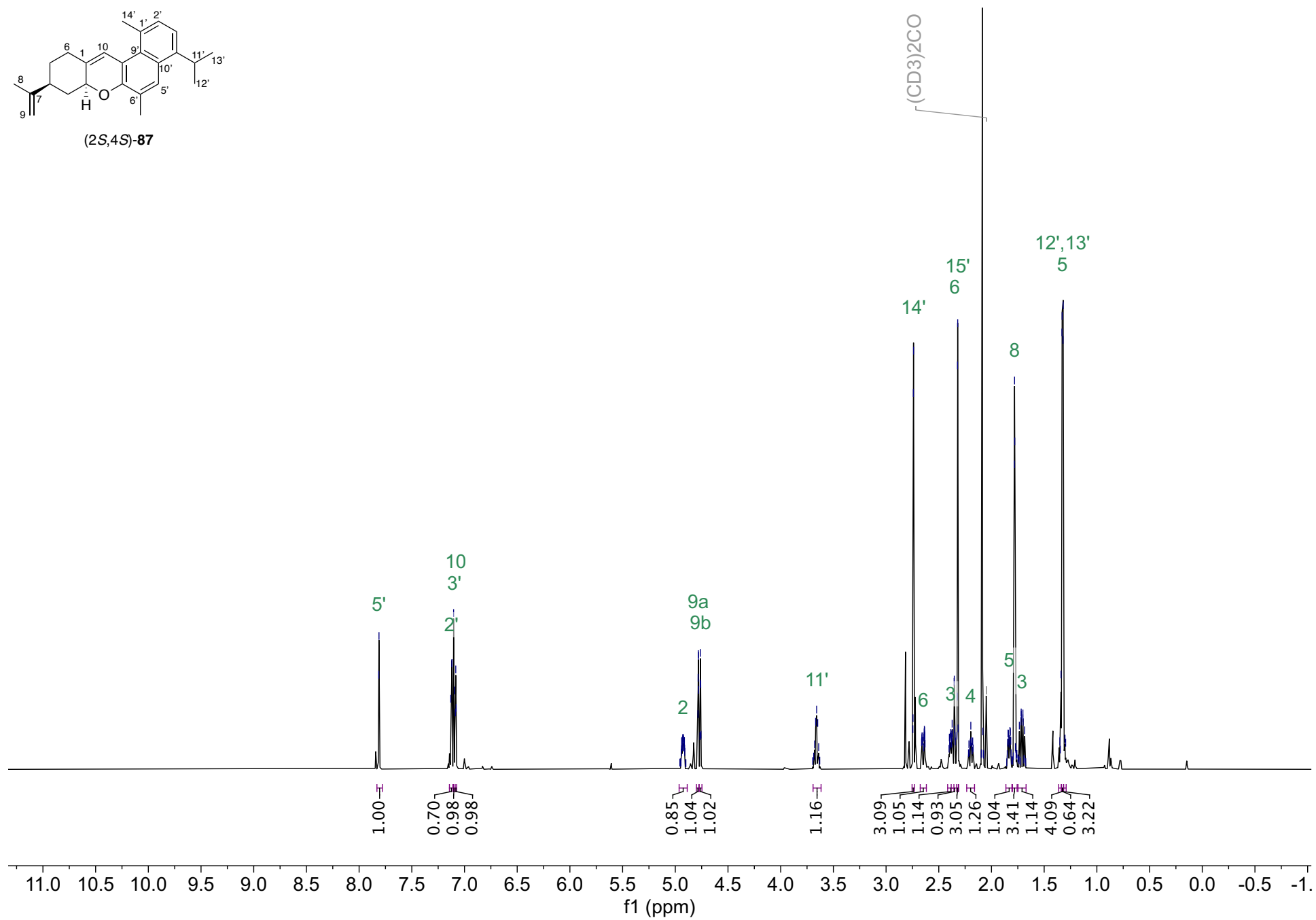
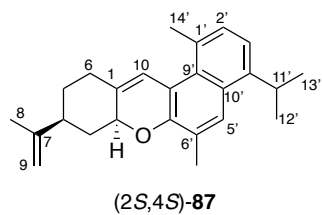
**E8.** Espectro RMN <sup>13</sup>C (acetona-d<sub>6</sub>, 175 MHz) de **81a**.



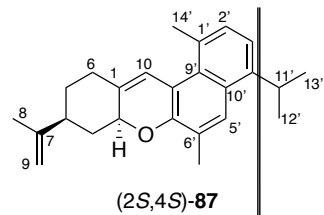
**E9.** Espectro RMN <sup>1</sup>H (acetona-d<sub>6</sub>, 700 MHz) de (2*S*,4*S*)-**86**.



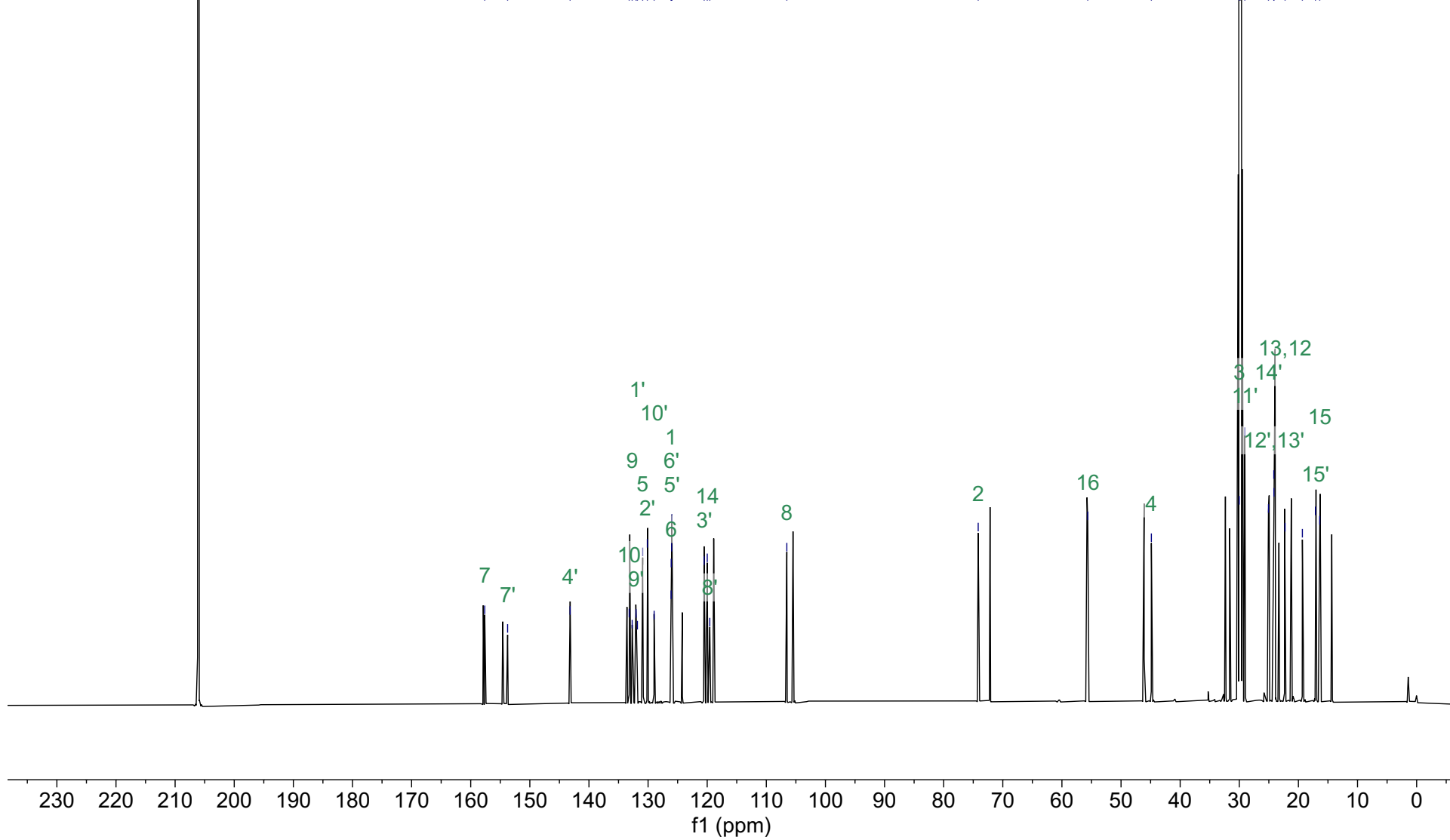
**E10.** Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  (acetona- $d_6$ , 175 MHz) de (2R,4S)-86.



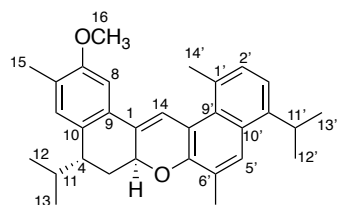
**E11.** Espectro RMN <sup>1</sup>H (acetona-d<sub>6</sub>, 700 MHz) de (2*S*,4*S*)-**87**.



- 157.6 [7]
- 153.8 [7]
- 143.2 [4']
- 133.2 [10]
- 132.7 [9]
- 132.0 [9]
- 131.8 [1']
- 130.9 [5]
- 130.1 [2]
- 129.0 [10']
- 126.1 [1]
- 126.1 [6]
- 126.0 [6']
- 126.0 [5']
- 120.5 [3']
- 120.0 [14]
- 119.6 [8']
- 106.5 [8]
- 74.2 [2]
- 55.6 [16]
- 44.9 [4]
- 30.0 [3]
- 29.8 (CD3)2CO
- 29.8 [11]
- 29.1 [11]
- 25.1 [14]
- 24.2 [12', 13']
- 24.1
- 22.3 [13, 12]
- 19.3
- 17.1 [15']
- 16.4 [15]

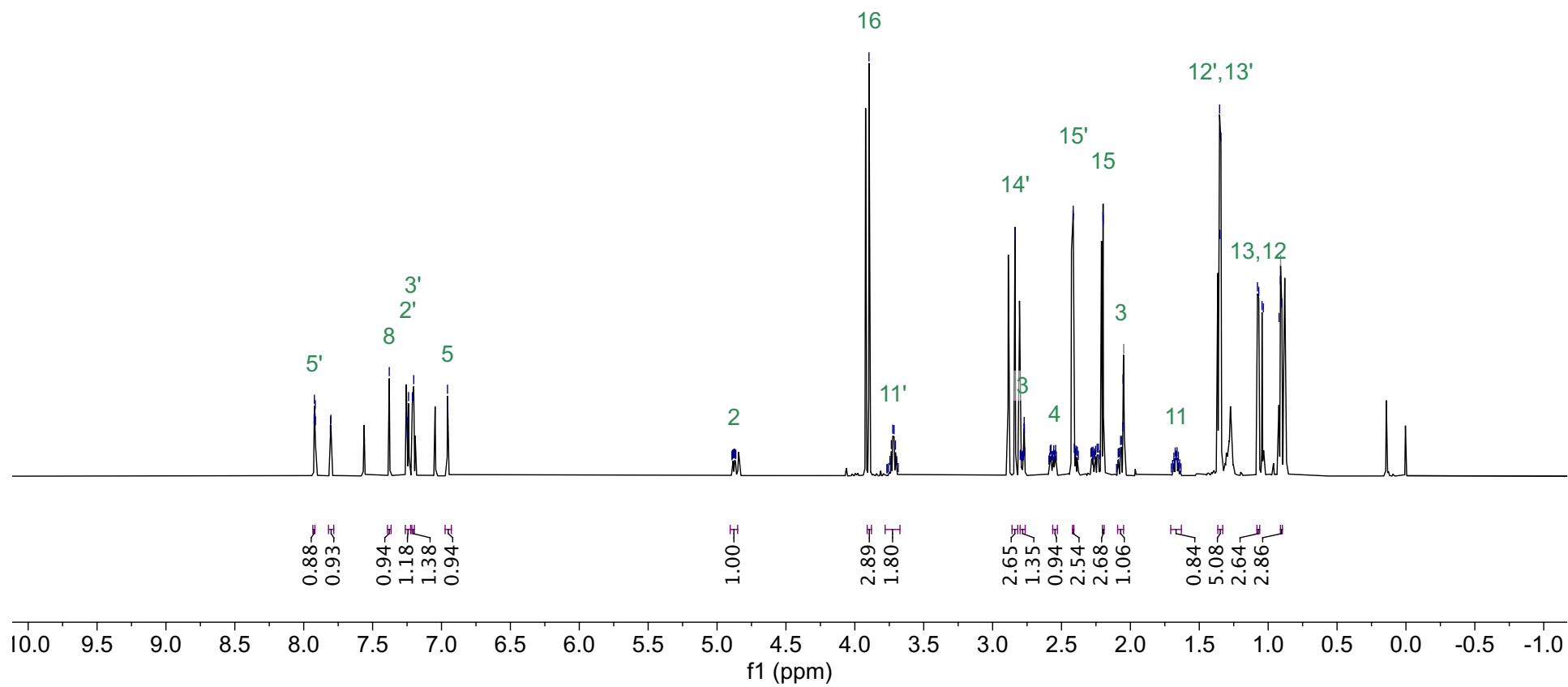


**E12.** Espectro RMN <sup>13</sup>C (acetona-d<sub>6</sub>, 175 MHz) de (2S,4S)-87.



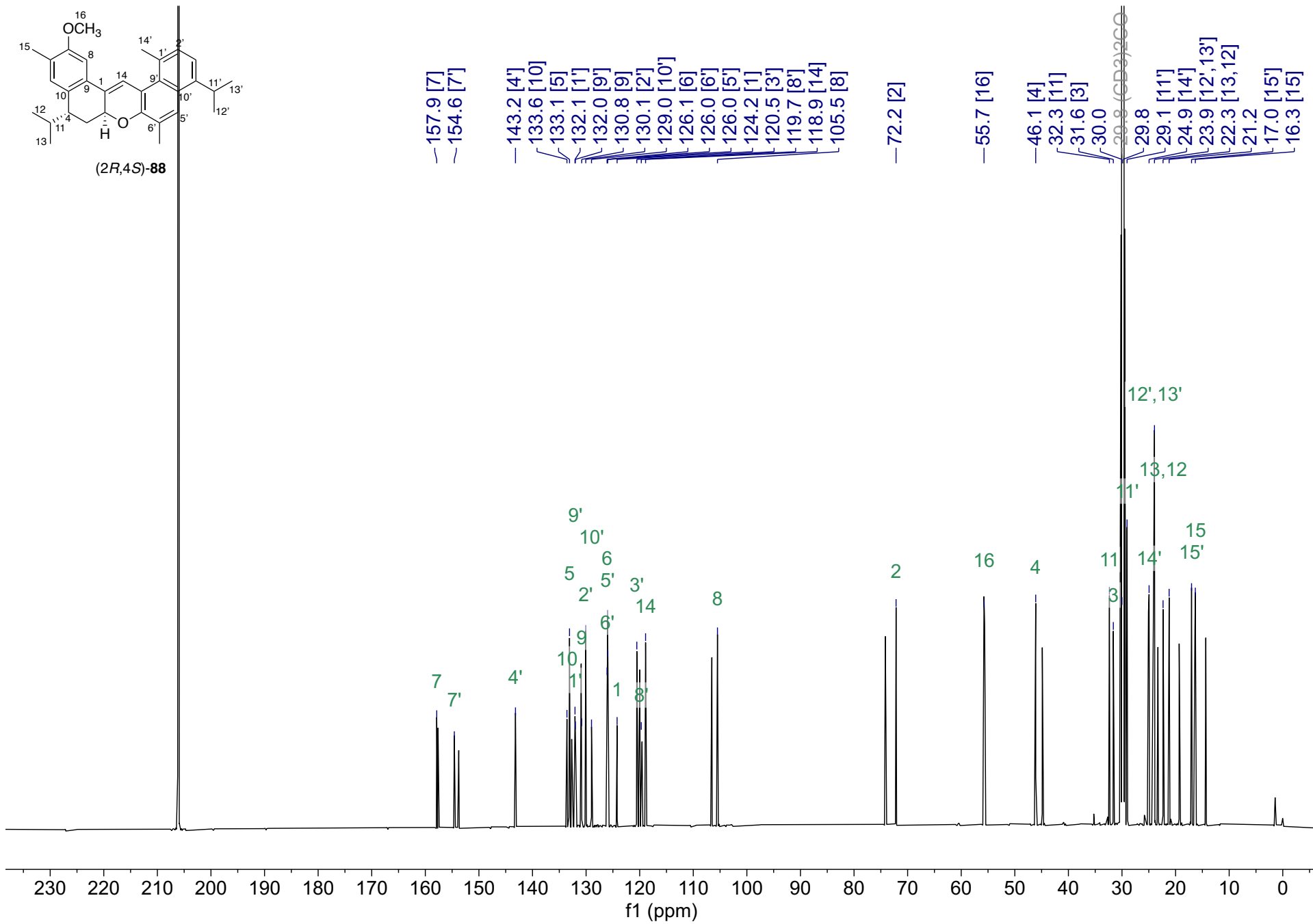
(2R,4S)-88

(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO

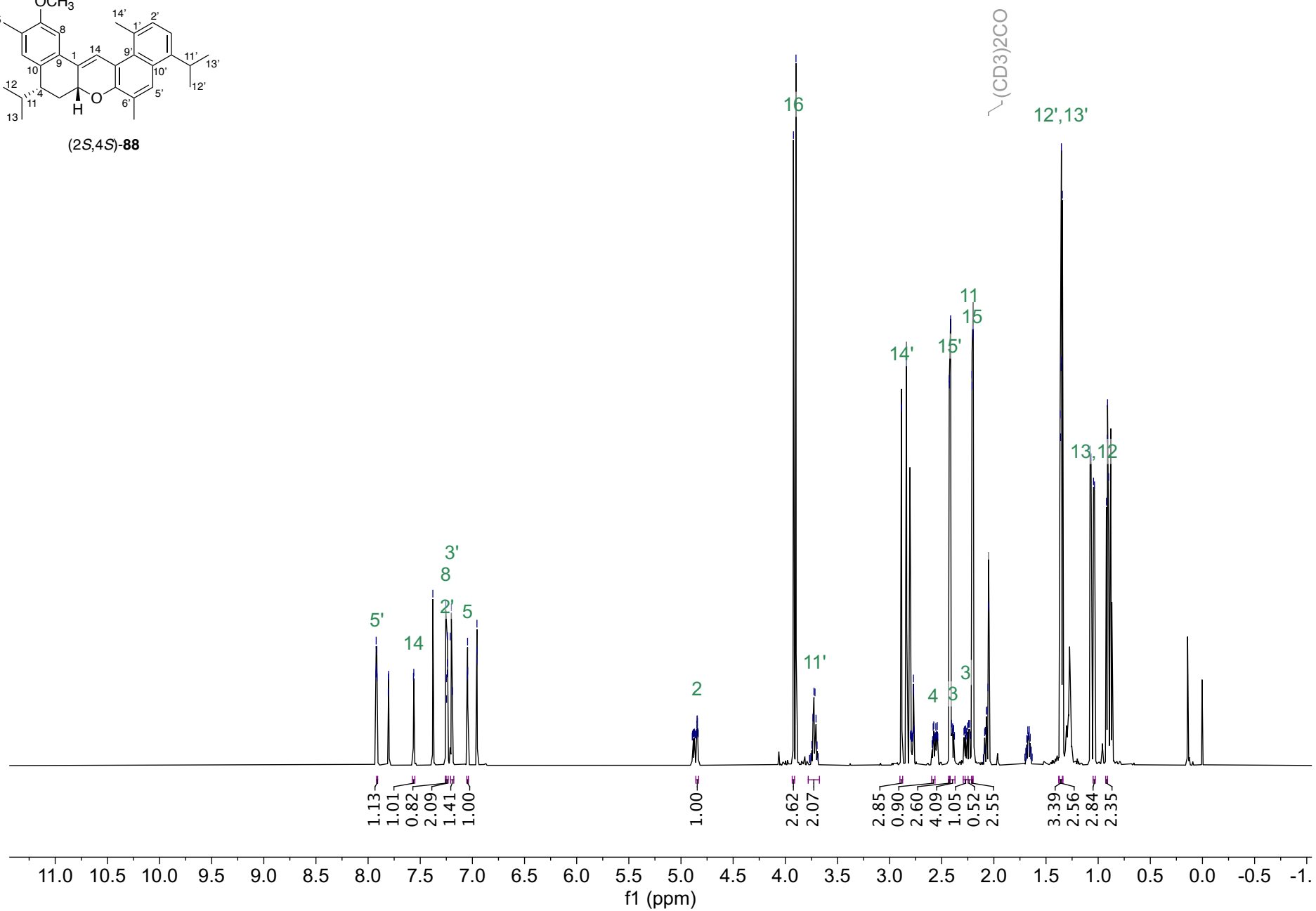
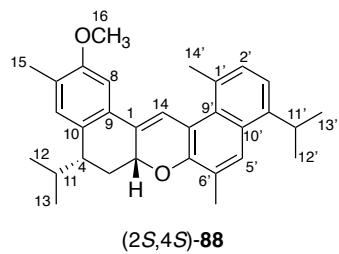


E13. Espectro RMN <sup>1</sup>H (acetona-d<sub>6</sub>, 700 MHz) de (2R,4S)-88.

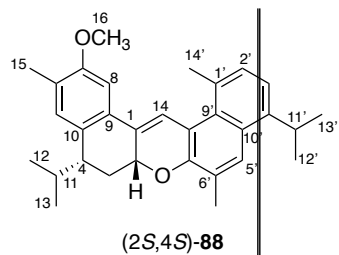




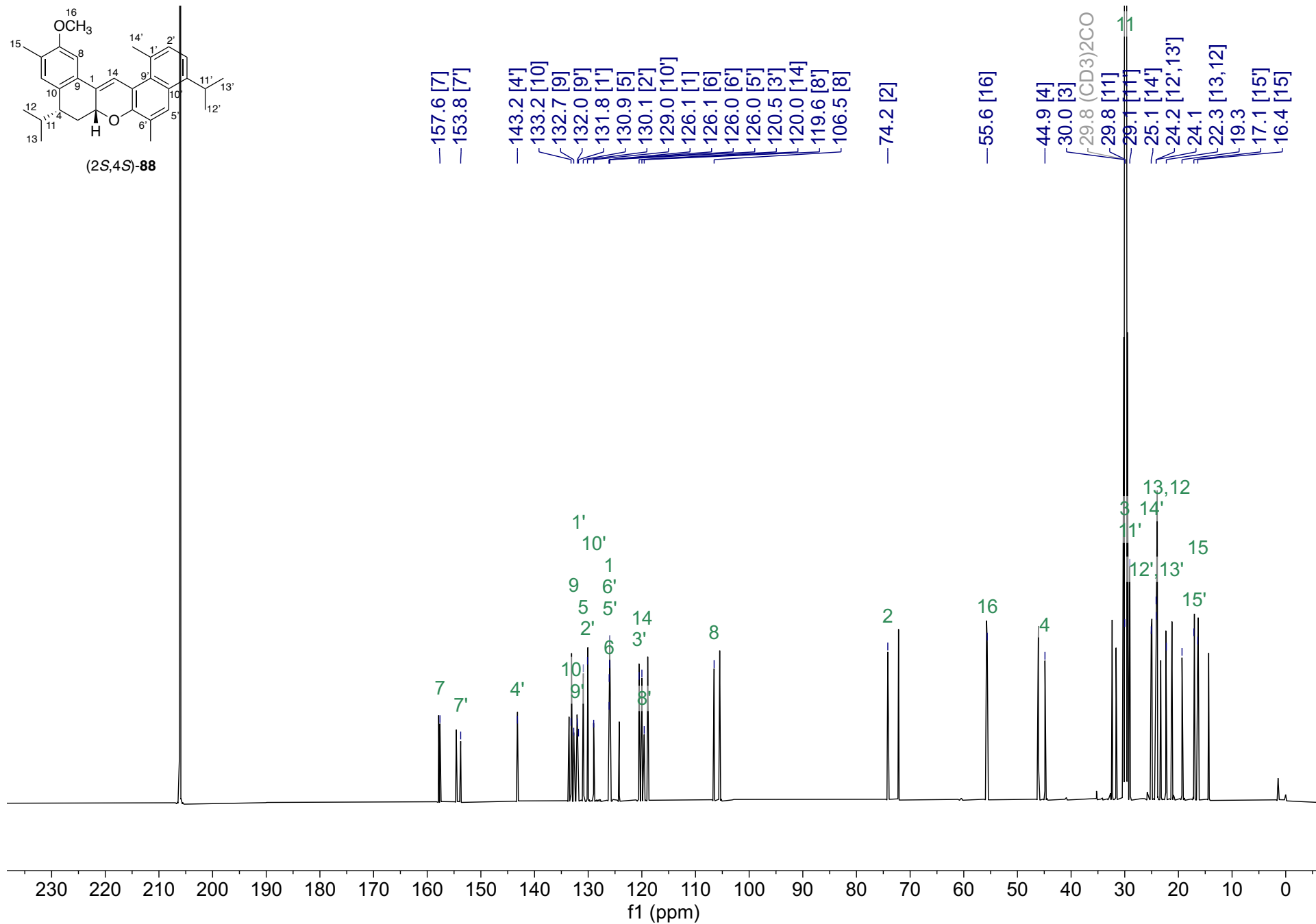
E14. Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN (acetona- $\text{d}_6$ , 175 MHz) de (2R,4S)-88.



**E15.** Espectro RMN  $^1\text{H}$  (acetona- $d_6$ , 700 MHz) de (2*S*,4*S*)-**88**.

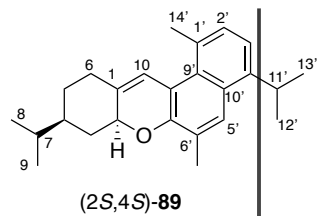


— 157.6 [7]	— 143.2 [4']	— 74.2 [2]	— 55.6 [16]
— 153.8 [7']	— 133.2 [10]		— 44.9 [4]
	— 132.7 [9]		— 30.0 [3]
	— 132.0 [9']		— 29.8 (CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO
	— 131.8 [1']		— 29.8 [11]
	— 130.9 [5]		— 29.1 [11']
	— 130.1 [2]		— 25.1 [14]
	— 129.0 [10']		— 24.2 [12', 13']
	— 126.1 [1]		— 24.1
	— 126.1 [6]		— 22.3 [13, 12]
	— 126.0 [6']		— 19.3
	— 126.0 [5']		— 17.1 [15']
	— 120.5 [5]		— 16.4 [15]
	— 120.0 [3']		
	— 120.0 [14]		
	— 119.6 [8']		
	— 106.5 [8]		



**E16.** Espectro RMN <sup>13</sup>C (acetona-d<sub>6</sub>, 175 MHz) de (2*S*,4*S*)-**88**.





— 152.0 [7']  
 — 143.1 [4']  
 133.8 [1]  
 131.5 [1']  
 130.9 [9]  
 130.2 [2']  
 128.9 [10']  
 126.0 [6']  
 125.1 [5']  
 119.9 [3']  
 118.9 [10]  
 117.1 [8']

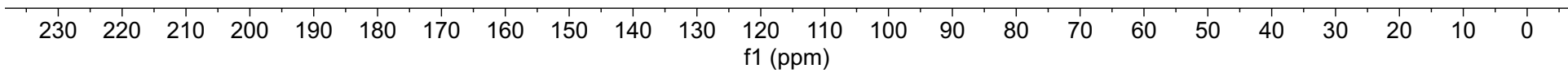
— 75.7 [2]

42.2 [4]  
 37.8 [3]  
 33.2 [7]  
 32.7 [6]  
 29.8 (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO  
 29.6 [5]  
 29.1 [14']  
 26.3 [14']  
 24.1 [12',13']  
 23.9  
 20.0 [9,8]  
 19.9  
 17.1 [15']

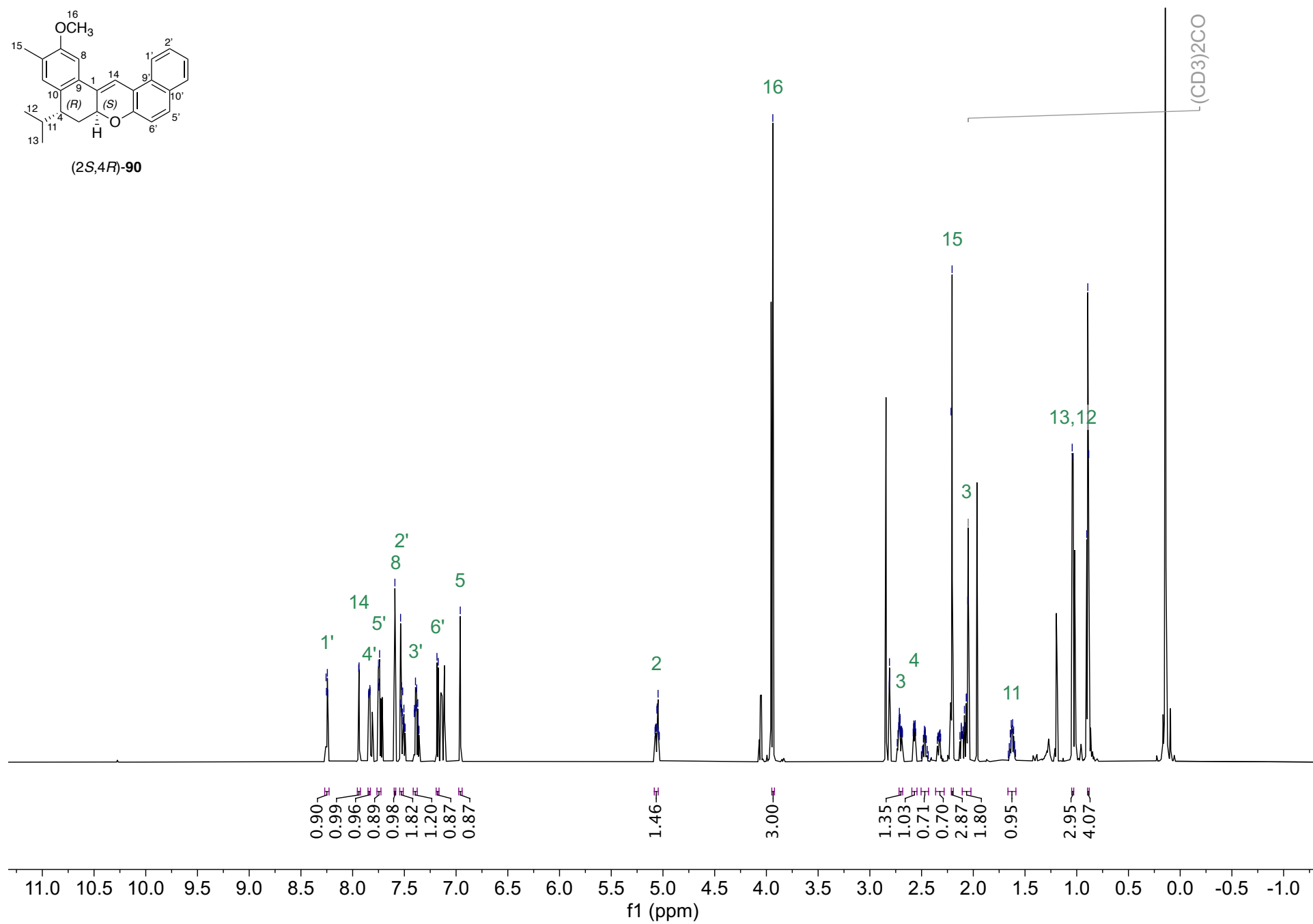
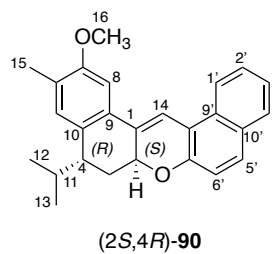
7'  
 4'  
 1  
 9'  
 10'  
 1'  
 6'  
 2'  
 5'  
 10  
 3'  
 8'

2

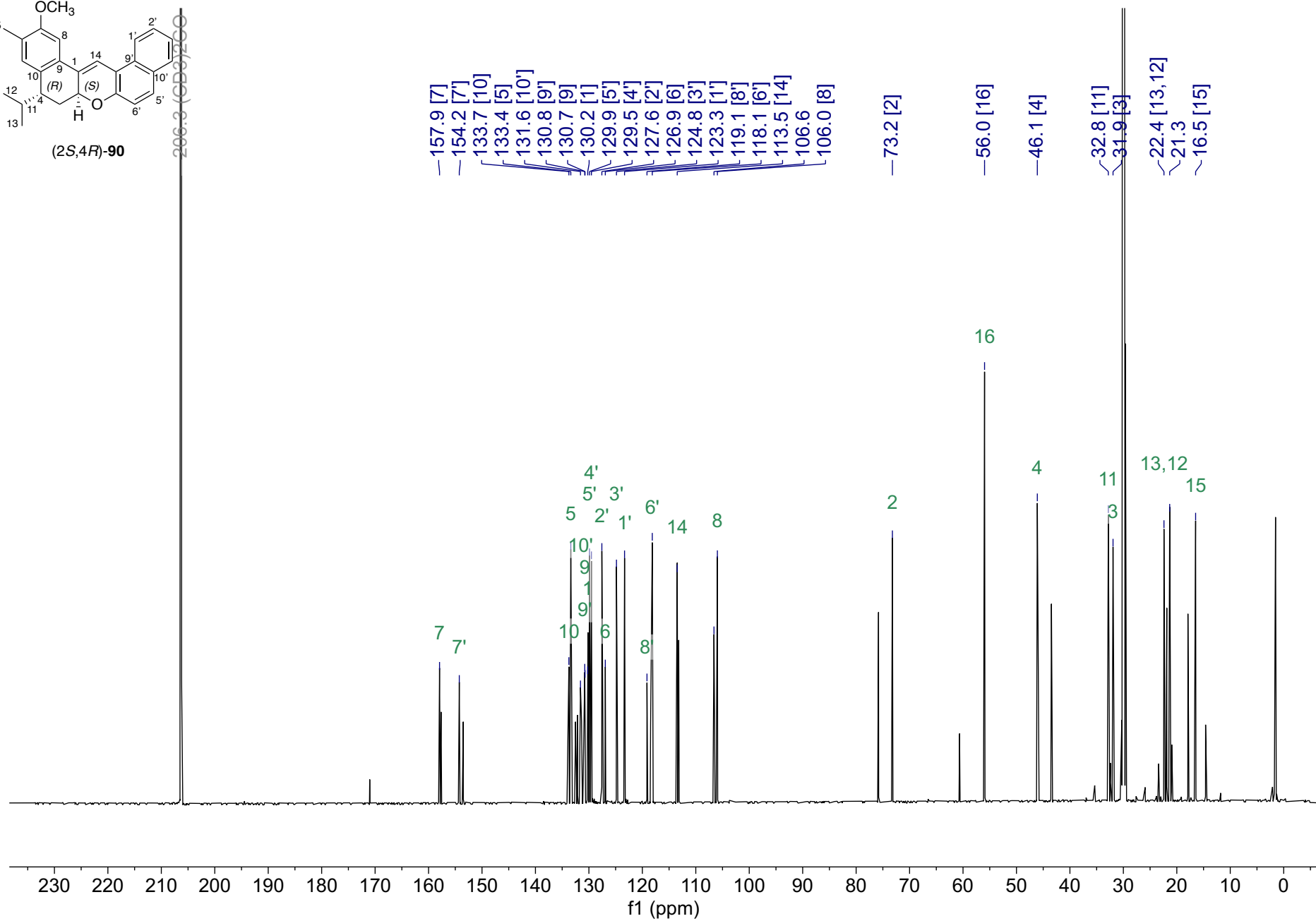
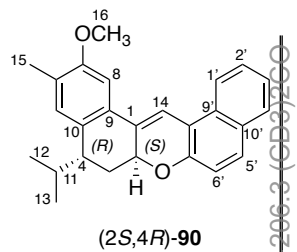
4  
 3  
 7  
 6  
 5  
 11'  
 14'  
 12',13'  
 9,8  
 15'



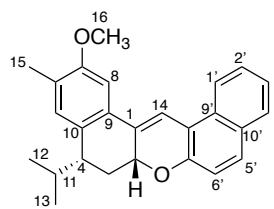
**E18.** Espectro RMN <sup>13</sup>C (acetona-d<sub>6</sub>, 175 MHz) de (2*S*,4*S*)-**89**.



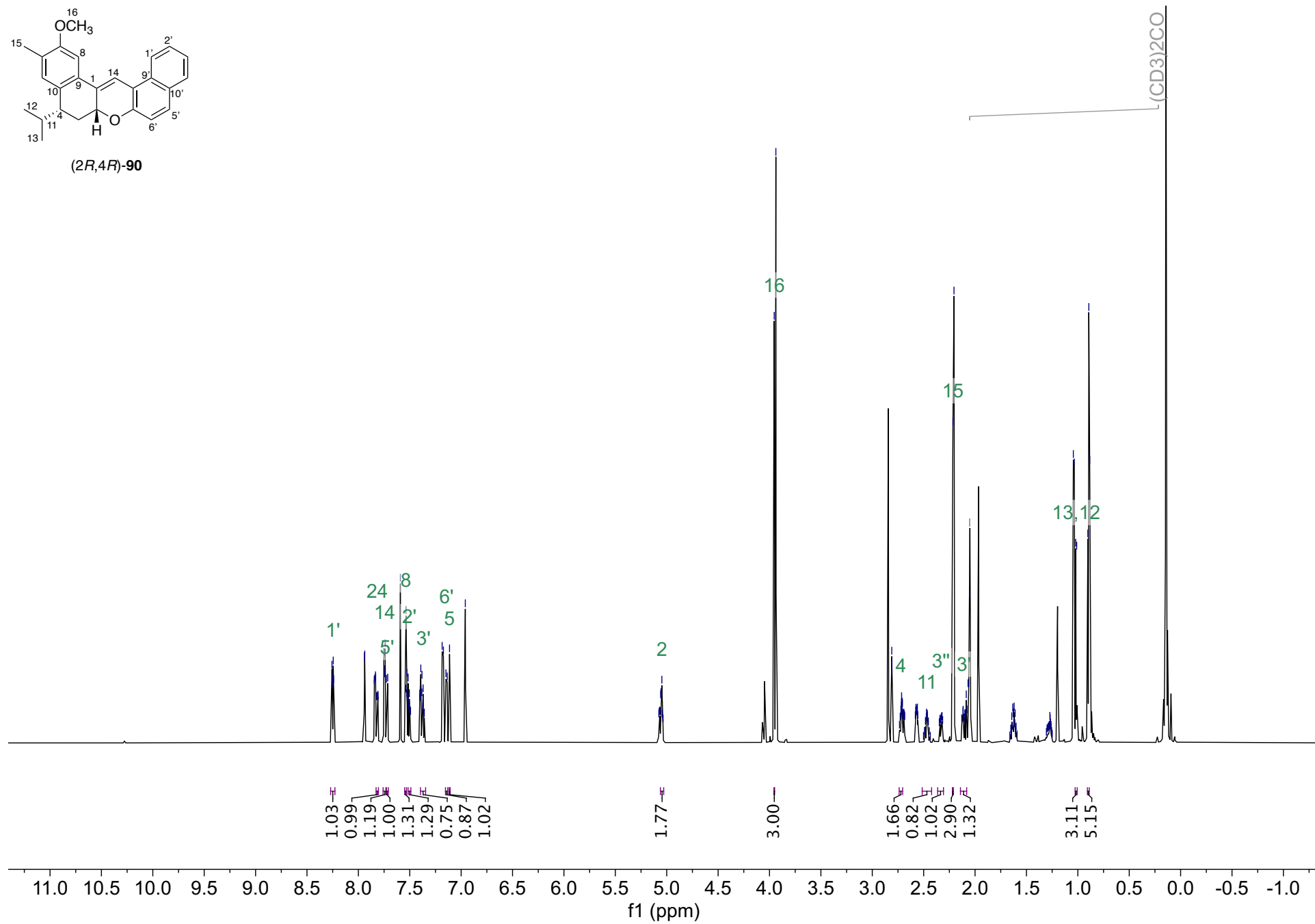
**E19.** Espectro RMN  $^1\text{H}$  (acetona- $d_6$ , 700 MHz) de (2*S*,4*R*)-90.



**E20.** Espectro RMN <sup>13</sup>C (acetona-d<sub>6</sub>, 175 MHz) de (2*S*,4*R*)-**90**.

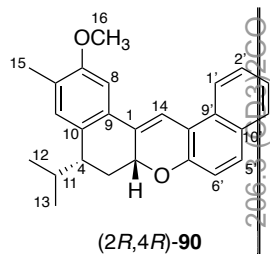


(2R,4R)-90



E21. Espectro RMN <sup>1</sup>H (acetona-d<sub>6</sub>, 700 MHz) de (2S,4S)-90.





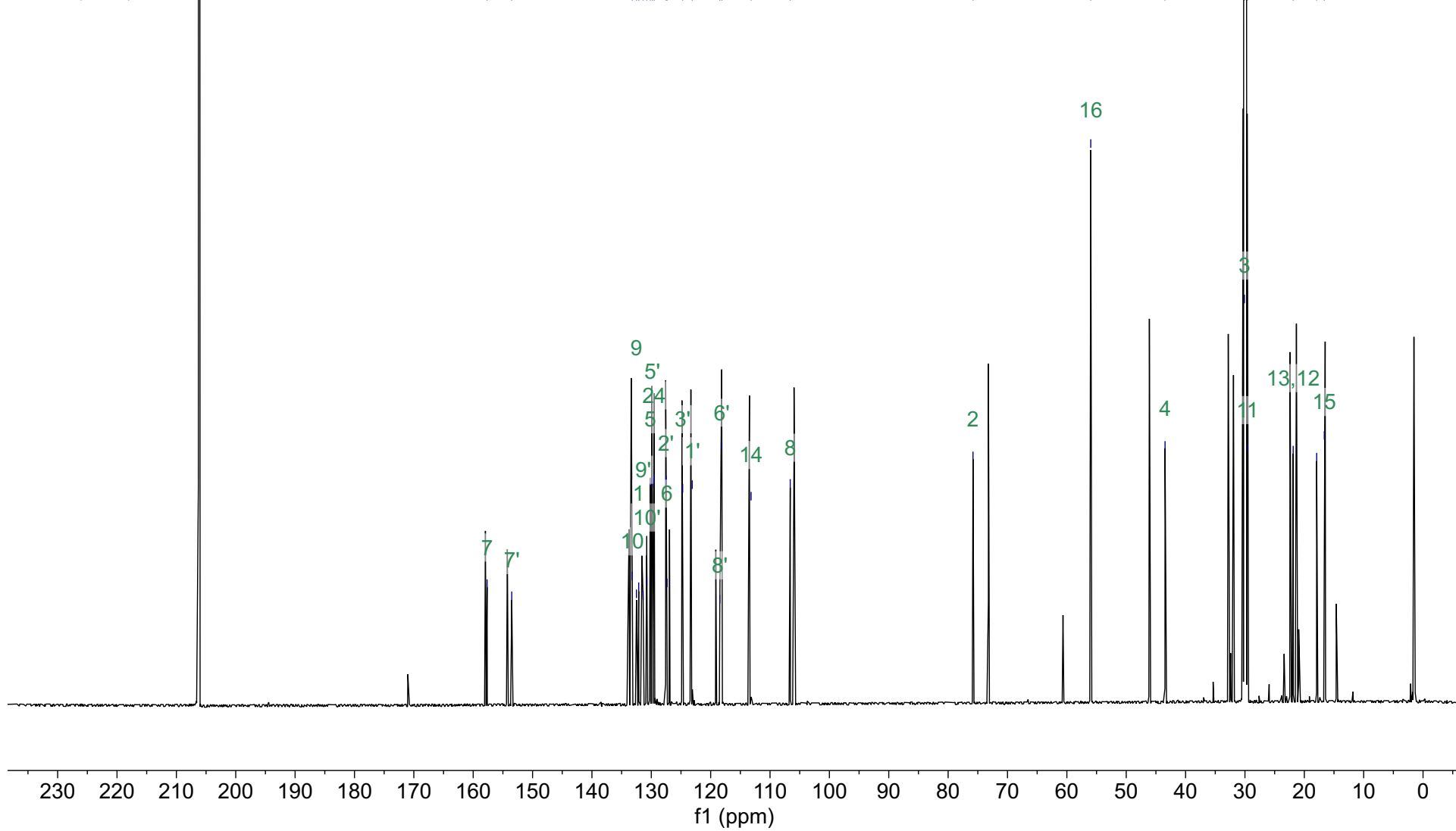
— 157.7 [7]  
 — 153.5 [7]  
 — 133.2 [10]  
 — 132.5 [9]  
 — 132.1 [1]  
 — 131.4 [9]  
 — 130.8 [10]  
 — 130.2 [5]  
 — 129.8 [5]  
 — 129.5 [24]  
 — 127.5 [2]  
 — 127.3 [6]  
 — 124.7 [3]  
 — 123.1 [1]  
 — 118.5 [8]  
 — 118.1 [6]  
 — 113.2 [14]  
 — 106.6 [8]

— 75.8 [2]

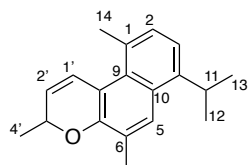
— 56.0 [16]

— 43.5 [4]

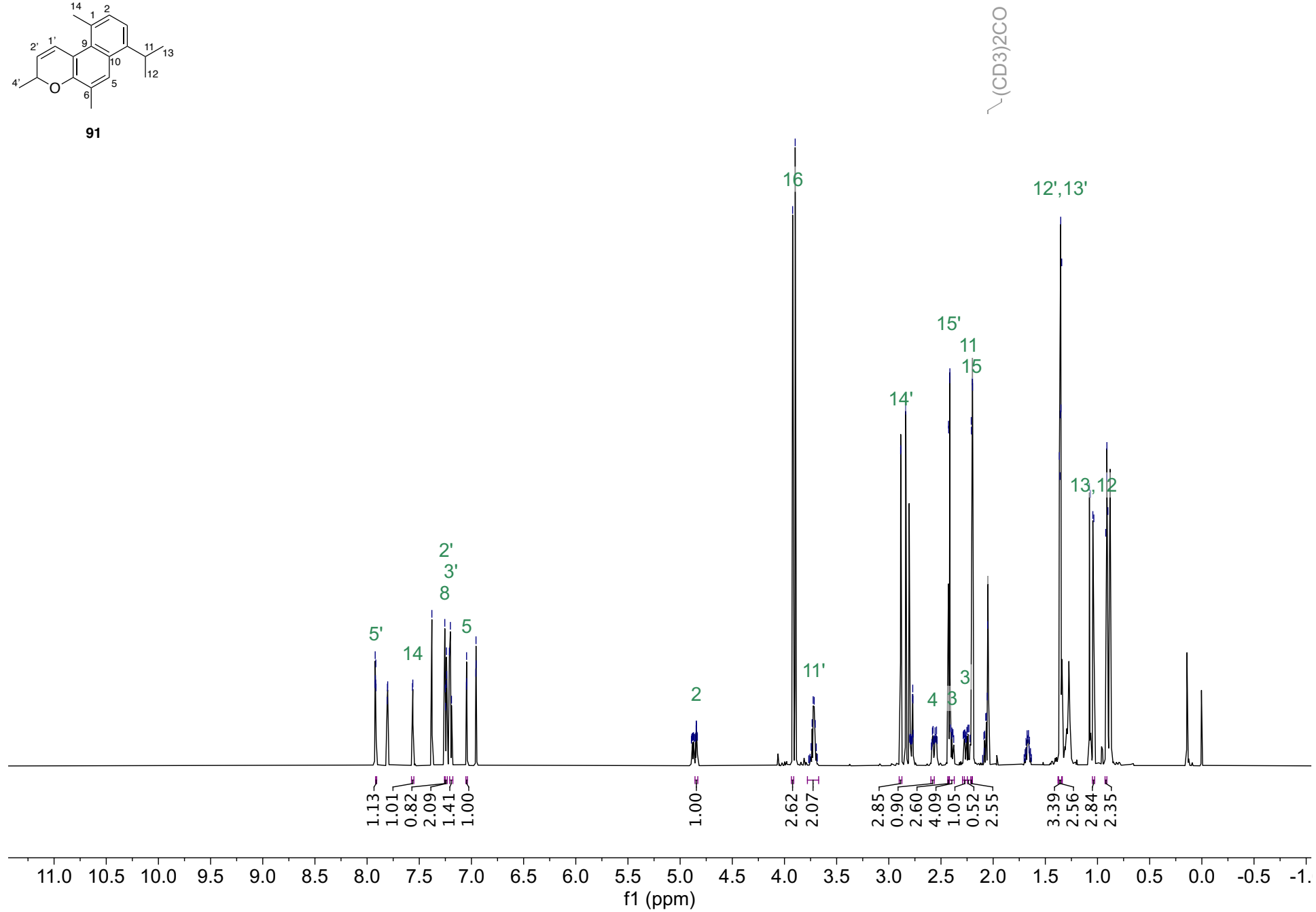
— 30.1 [3]  
 — 29.6 [11]  
 — 21.9 [13,12]  
 — 17.9  
 — 16.6 [15]



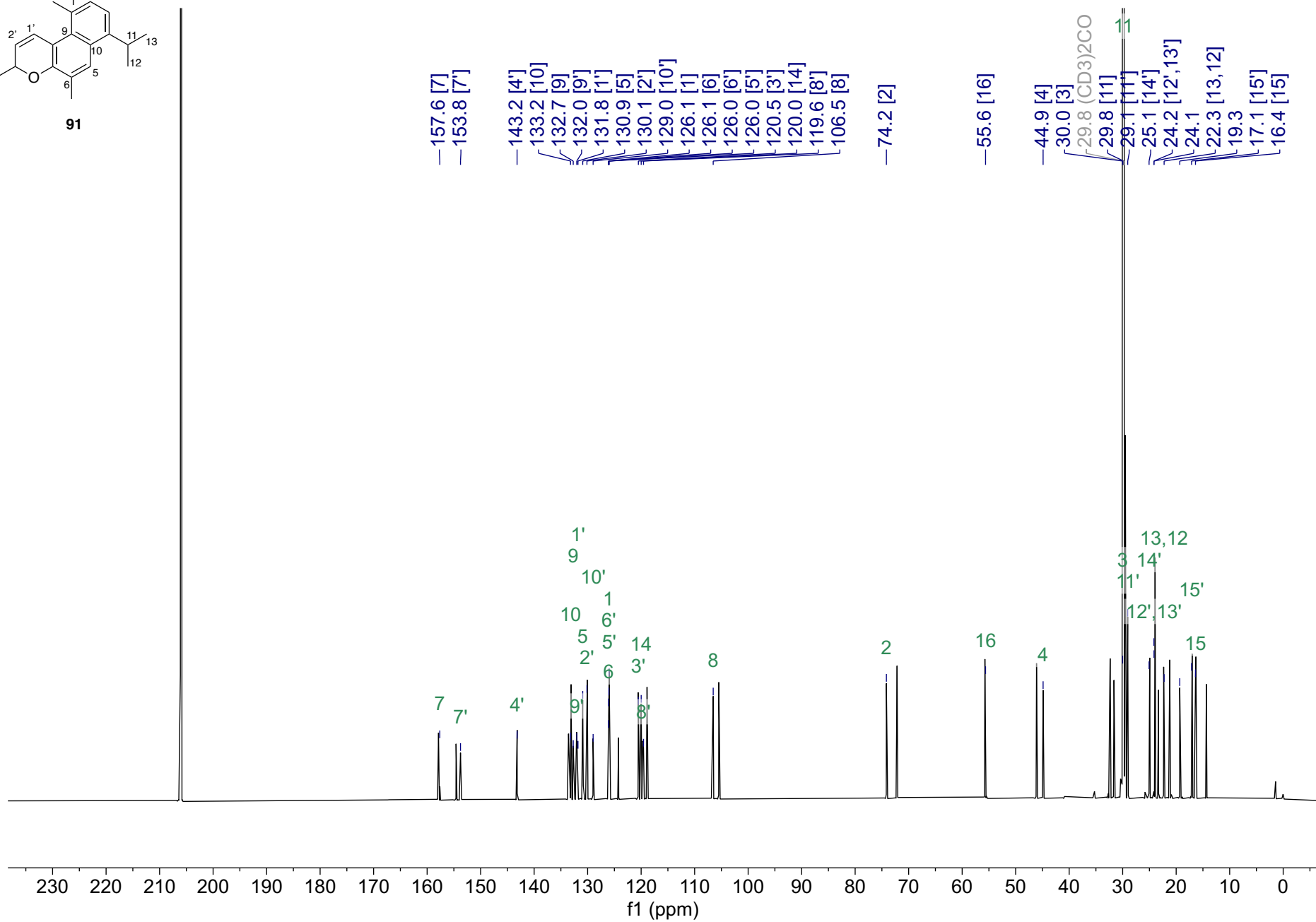
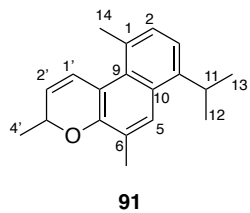
**E22.** Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  (acetona- $\text{d}_6$ , 175 MHz) de (2*R*,4*R*)-**90**.



**91**



**E23.** Espectro RMN  $^1\text{H}$  (acetona-d<sub>6</sub>, 700 MHz) de **91**.



**E24.** Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  (acetona- $\text{d}_6$ , 175 MHz) de **91**.