

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química Orgánica

Programa de Doctorado en Química



**TRANSFORMACIÓN DEL ÁCIDO *TRANS*-COMÚNICO EN COMPUESTOS
CON ESQUELETO DE CASSANO Y RELACIONADOS. EVALUACIÓN DE LA
ACTIVIDAD ANTITUMORAL**

Tesis doctoral para aspirar al grado de Doctor en Química presentada por:

M^a SOUMICHA MAHDJOUR

Bajo la dirección de los doctores:

Enrique J. Álvarez-Manzaneda Roldán

Rachid Chahboun Karimi

GRANADA, 2020

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Soumicha Mahdjour
ISBN: 978-84-1306-677-6
URI: <http://hdl.handle.net/10481/64069>

TRANSFORMACIÓN DEL ÁCIDO *TRANS*-COMÚNICO EN COMPUESTOS CON ESQUELETO DE CASSANO Y RELACIONADOS. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL

UNIVERSIDAD DE GRANADA



Los doctores Enrique J. Álvarez-Manzaneda Roldán y Rachid Chahboun Karimi,

CERTIFICAN:

Que la presente memoria titulada “TRANSFORMACIÓN DEL ÁCIDO *TRANS*-COMÚNICO EN COMPUESTOS CON ESQUELETO DE CASSANO Y RELACIONADOS. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL” ha sido realizada en el Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Granada, bajo su dirección, por la Licenciada **M^a SOUMICHA MAHDJOUR** y autorizan su presentación para que sea calificada como Tesis Doctoral.

Granada, Junio 2020

Fdo: M^a Soumicha Mahdjour

Los directores de la Tesis:

Dr. D. Enrique J. Álvarez-Manzaneda Roldán

Catedrático de Química Orgánica

Dr. D. Rachid Chahboun Karimi

Profesor titular de Química Orgánica

INDICE

PORTADA

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

RESUMEN

INTRODUCCIÓN20

**I.- ISÍNTESIS DE DITERPENOS BIOLÓGICAMENTE ACTIVOS A PARTIR DE
ÁCIDO COMUNICO. CASSANOS, PODOCARPANOS, TOTARANOS Y ABIETANO**

ANTECEDENTES24

1. Diterpenos tipo cassano.....25

1-1 Aislamiento y estructura.....25

1-2 Actividad biológica.....27

1-3 Síntesis de cassanos.....28

2. Diterpenos tipo totarano.....33

2-1 Aislamiento y estructura.....33

2-2 Actividad biológica.....36

2-3 Síntesis de totaranos.....36

3. Diterpenos tipo abietano.....41

3-1 Aislamiento y estructura.....41

3-2 Actividad biológica.....43

3-3 Síntesis de diterpenos con esqueleto de abietano.....45

4. Terpenos tipo podocarpano.....48

4-1 Aislamiento y estructura.....48

4-2 Actividad biológica.....50

4-4 Síntesis de podocarpanos.....52

5.	Procesos de obtención de terpenoides funcionalizados en el metilo axial del sistema <i>gem</i> -dimetilo.....	56
5-1	Procedimientos basados en procesos de ciclación:	57
5-2	Procedimientos a partir de terpenoides funcionalizados en C-4.	59
	OBJETIVOS.....	62
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	59
1.	Extracción del ácido <i>trans</i> -comúnico (141)	68
2.	Preparación de los dienos 144 y 145 a partir del cetoaldehído 143	68
3.	Preparación de compuestos con esqueleto de podocarpano, totarano y cassano, a partir de los furanos 144 y 145.....	71
4.	Aplicación de los fenoles 152 y 153 a la síntesis de diterpenos naturales.....	75
4-1	Síntesis de nuevos compuestos con esqueleto podocarpano a partir del fenol 153.	76
4-2	Obtención de terpenos con esqueleto totarano a partir del fenol 152.....	79
4-3	Aproximación a la síntesis de cassanos a partir del fenol 153.....	81
	PARTE EXPERIMENTAL.....	85
	<u>1</u> - General Procedures	92
	<u>2</u> - Experimental Procedures	93
	(1 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>aR</i>)- Methyl 1,4 <i>a</i> -dimethyl-6-oxo-5-(2-oxoethyl)decahydronaphthalene-1-carboxylate (211).....	93
	(5 <i>aR</i> ,6 <i>S</i> ,9 <i>aS</i>)-Methyl 6,9 <i>a</i> -dimethyl-4,5,5 <i>a</i> ,6,7,8,9,9 <i>a</i> -octahydronaphtho[2,1- <i>b</i>]furan-6-carboxylate (144).....	93
	2-((1 <i>R</i> ,4 <i>aR</i> ,5 <i>S</i> ,8 <i>aS</i>)-5-(Methoxycarbonyl)-5,8 <i>a</i> -dimethyl-2-oxodecahydronaphthalen-1-yl)acetic acid (146).....	94
	(5 <i>aR</i> ,6 <i>S</i> ,9 <i>aS</i>)-Methyl 6,9 <i>a</i> -dimethyl-2-oxo-1,2,4,5,5 <i>a</i> ,6,7,8,9,9 <i>a</i> -decahydronaphtho[2,1- <i>b</i>]furan-6-carboxylate (147).	95
	(5 <i>aR</i> ,6 <i>S</i> ,9 <i>aS</i>)- Methyl 12-acetoxy-6,9 <i>a</i> -dimethyl-4,5,5 <i>a</i> ,6,7,8,9,9 <i>a</i> -octahydronaphtho[2,1- <i>b</i>]furan-6-carboxylate (145).	95
	(1 <i>S</i> , 4 <i>aS</i> , 8 <i>aR</i> , 10 <i>aR</i>)-Dimethyl 8 <i>a</i> -acetoxy-1,4 <i>a</i> -dimethyl-6-oxo-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,6,8 <i>a</i> ,9,10,10 <i>a</i> -decahydrophenanthrene-1,7-dicarboxylate (149).....	96
	Diels-Alder cycloaddition of furan 144 and methyl propiolate by refluxing in toluene.....	97
2.8	(4 <i>S</i> ,4 <i>aR</i> ,6 <i>aR</i> ,7 <i>aS</i> ,8 <i>S</i> ,8 <i>aS</i> ,9 <i>aR</i> ,9 <i>bS</i> ,9 <i>cS</i>)-Trimethyl 4,9 <i>c</i> -dimethyl-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,5,6,7 <i>a</i> ,8,8 <i>a</i> ,9 <i>a</i> ,9 <i>c</i> -dodecahydro-8,9 <i>b</i> -ethenophenanthro[1,10 <i>a</i> - <i>b</i> :3,4 <i>b'</i>]bis(oxirene)-4,7 <i>a</i> ,10-tricarboxylate (151).....	97

(1 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,10 <i>aR</i>)-Dimethyl	6-hydroxy-1,4 <i>a</i> -dimethyl-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,9,10,10 <i>a</i> -octahydrophenanthrene-1,8-dicarboxylate (152).	98
(1 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,10 <i>aR</i>)-Dimethyl	6-hydroxy-1,4 <i>a</i> -dimethyl-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,9,10,10 <i>a</i> -octahydrophenanthrene-1,7-dicarboxylate (153).	99
	Diels-Alder cycloaddition of furan 144 and methyl propiolate with Et ₂ AlCl.	99
(1 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,10 <i>aR</i>)-Dimethyl	6-methoxy-1,4 <i>a</i> -dimethyl-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,9,10,10 <i>a</i> -octahydrophenanthrene-1,7-dicarboxylate (155).	99
(1 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,10 <i>aR</i>)-dimethyl	6-methoxy-1,4 <i>a</i> -dimethyl-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,9,10,10 <i>a</i>	100
(1 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,10 <i>aR</i>)-dimethyl	6-methoxy-1,4 <i>a</i> -dimethyl-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,9,10,10 <i>a</i> octahydrophenanthrene-1,7-dicarboxylate (157).	101
1-((4 <i>bS</i> ,8 <i>S</i> ,8 <i>aR</i>)-8-(hydroxymethyl)-3-methoxy-4 <i>b</i> ,8-dimethyl	4 <i>b</i> ,5,6,7,8,8 <i>a</i> ,9,10	
octahydrophenanthren-2-yl)ethanone (158)		102
1-((4 <i>bS</i> ,8 <i>S</i> ,8 <i>aR</i>)-3-hydroxy-8-(hydroxymethyl)-4 <i>b</i> ,8-dimethyl-4 <i>b</i> ,5,6,7,8,8 <i>a</i> ,9,10		
octahydrophenanthren-2-yl)ethanone (159)		103
(1 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,10 <i>aR</i>)-methyl	6-hydroxy-1,4 <i>a</i> -dimethyl-8-(prop-1-en-2-yl)1,2,3,4,4 <i>a</i> ,9,10,10 <i>a</i> -octahydrophenanthrene-1-carboxylate (160)	104
(1 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,10 <i>aR</i>)-methyl	6-hydroxy-8-isopropyl-1,4 <i>a</i> -dimethyl-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,9,10,10 ^a octahydrophenanthrene-1-carboxylate (161)	105
	Treatment of phenol 161 with (PhSeO) ₂ O. Obtention of compounds 162 and 163.	105
(1 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,10 <i>aR</i>)-methyl	8-isopropyl-1,4 <i>a</i> -dimethyl-5,6-dioxo-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,5,6,9,10,10 ^a decahydrophenanthrene-1-carboxylate (162)	106
(1 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,8 <i>aR</i>)-methyl	8 <i>a</i> -hydroxy-7-isopropyl-1,4 <i>a</i> -dimethyl-6-oxo1,2,3,4,4 <i>a</i> ,6,8 <i>a</i> ,9,10,10 <i>a</i> -decahydrophenanthrene-1 carboxylate (263)	106
(1 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,10 <i>aR</i>)-methyl	5,6-dihydroxy-8-isopropyl-1,4 <i>a</i> -dimethyl 1,2,3,4,4 <i>a</i> ,9,10,10 <i>a</i> -octahydrophenanthrene-1-carboxylate (232)	107
(4 <i>bS</i> , 8 <i>S</i> , 8 <i>aR</i>)-3-Methoxy	-8-(methoxycarbonyl)-4 <i>b</i> , 8-dimethyl-4 <i>b</i> , 5, 6,7,8,8 <i>a</i> ,9,10-octahydrophenanthrene-2-carboxylic acid (233).	107
(1 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,10 <i>aR</i>)-Dimethyl	6-(allyloxy)-1,4 <i>a</i> -dimethyl-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,9,10,10 <i>a</i> -octahydrophenanthrene-1,8-dicarboxylate (236)	108
(1 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,10 <i>aR</i>)-Methyl	6-(allyloxy)-8-(hydroxymethyl)-1,4 <i>a</i> -dimethyl-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,9,10,10 <i>a</i> -octahydrophenanthrene-1-carboxylate (240)	109
	Treatment of alcohol 240 with Et ₃ SiH and PdCl ₂	110
(1 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,10 <i>aR</i>)-Methyl	6-hydroxy-1,4 <i>a</i> ,8-trimethyl-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,9,10,10 <i>a</i> -octahydrophenanthrene-1-carboxylate (242).	110

(1 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,10 <i>aR</i>)-Methyl	1,4 <i>a</i> ,8-trimethyl-6-propoxy-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,9,10,10 <i>a</i> -octahydrophenanthrene-1-carboxylate (241).	111
(1 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,10 <i>aR</i>)-Methyl	6-hydroxy-8-(hydroxymethyl)-1,4 <i>a</i> -dimethyl-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,9,10,10 <i>a</i> -octahydrophenanthrene-1-carboxylate (244).	111
	Synthesis of methyl phenol 242 from hydroxy phenol 244.	112
(1 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,10 <i>aR</i>)-Methyl	6-(2,2-dimethoxyethoxy)-1,4 <i>a</i> ,8-trimethyl-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,9,10,10 <i>a</i> -octahydrophenanthrene-1-carboxylate (243).	113
	Synthesis of <i>benthaminin 1</i> (15) from 243.	113
(1 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,10 <i>aR</i>)-Methyl	7-formyl-6-hydroxy-1,4 <i>a</i> ,8-trimethyl-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,9,10,10 <i>a</i> -octahydrophenanthrene-1-carboxylate (246).	114
(1 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,10 <i>aR</i>)-Methyl	6-hydroxy-7-((<i>Z</i>)-2-methoxyvinyl)-1,4 <i>a</i> ,8-trimethyl-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,9,10,10 <i>a</i> -octahydrophenanthrene-1-carboxylate (247).	115
	Synthesis of <i>benthaminin 1</i> (15) from from enol ether 247.	116
II. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL		
1.	Generalidades sobre el cáncer	120
1-1	Cáncer de colon	121
1-2	Cáncer de mama	123
1-3	Cáncer de pulmón	126
2.	Ciclo celular	130
3.	Apoptosis	131
	OBJETIVOS	134
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	137
1.	Actividad antiproliferativa en células tumorales	136
2.	Lipofilia	140
3.	Citotoxicidad en células normales (PBMC)	140
4.	Análisis del ciclo celular y apoptosis	142
	PARTE EXPERIMENTAL	143
	MATERIALES Y MÉTODOS	148
1.	Preparación de la muestra	148
2.	Evaluación de la actividad citotóxica	148
2-1	Lineas celulares	148
2-2	Cultivo y conservación	148
2-3	Descongelación de las líneas celulares	149
2-4	Recuento Y Comprobación De Viabilidad	149

3. Ensayo Citotóxico Por El Método De Sulforodamina B	150
4. Ensayo De Citotoxicidad En Pbmcs De Muestras De Sangre Periférica De Pacientes Sanos	151
5. Índice De Selectividad	151
6. Análisis Estadístico	152
7. Ensayo De Ciclo Celular	152
7-1 Tinción Con Yoduro De Propidio	153
7-2 Inducción De Apoptosis Con Anexina V	153
8. Análisis De La Expresión De Proteínas Mediante Western Blot ..	153
CONCLUSIONES	161

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

5-Fu: 5-Fluorouracilo

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

AMCPB: Ácido meta-cloroperbenzoico.

APTS: Ácido para-toluensulfónico.

Bn: Bencilo.

CAN: Nitrato de amonio y cerio.

CCF: Cromatografía en capa fina.

CSA: Ácido canforsulfónico.

DBU: 1,8-diazabicyclo [5.4.0] undec-7-eno.

DDQ: 2,3-dicloro-5,6-diciano-p-benzoquinona.

DMAP: 4-(Dimetilamino) piridina.

DME: Dimetoxietano.

DMF: Dimetilformamida.

DMP: Dess-Martin periodinano.

DMSO: Dimetilsulfoxido.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

h: Hora.

HMPA: Hexametilsosforoamida.

HRMS: Espectrometría de masas de alta resolución.

IC₅₀: Concentración inhibitoria 50, del inglés “inhibitory concentration 50”

min: Minutos.

NAC: N-acetil cisteína

NAD: Nicotinamida adenina dinucleótido.

NBS: N-Bromosuccinimida

NOE: Efecto nuclear overhauser

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBS: Tampón fosfato salino, del inglés “phosphate-buffered saline”

PCC: Clorocromato de piridinio.

PDC: Dicromato de piridinio.

Ph: Fenilo.

P(o-tol)3: Tri-(o-tolil)fosfina

Pyr: Piridina.

IR: Espectroscopía infrarroja.

RMN-13C: Resonancia magnética nuclear de carbono.

RMN-1H: Resonancia magnética nuclear de protones.

ROS: Especies reactivas de oxígeno, del inglés “reactive oxygen species”

t.a: Temperatura ambiente.

TBAF: Fluoruro de tetrabutil amonio.

TBS: tert-Butildimetilsililo.

TfOTMS: Trifluorometanosulfonato.

THF: Tetrahidrofurano.

TMS: Tetrametilsilano.

TMSOTf: Trimetilsilil trifluorometanosulfonato.

Ts: Tosilo.

TsOH: Ácido p-toluenosulfónico

RESUMEN

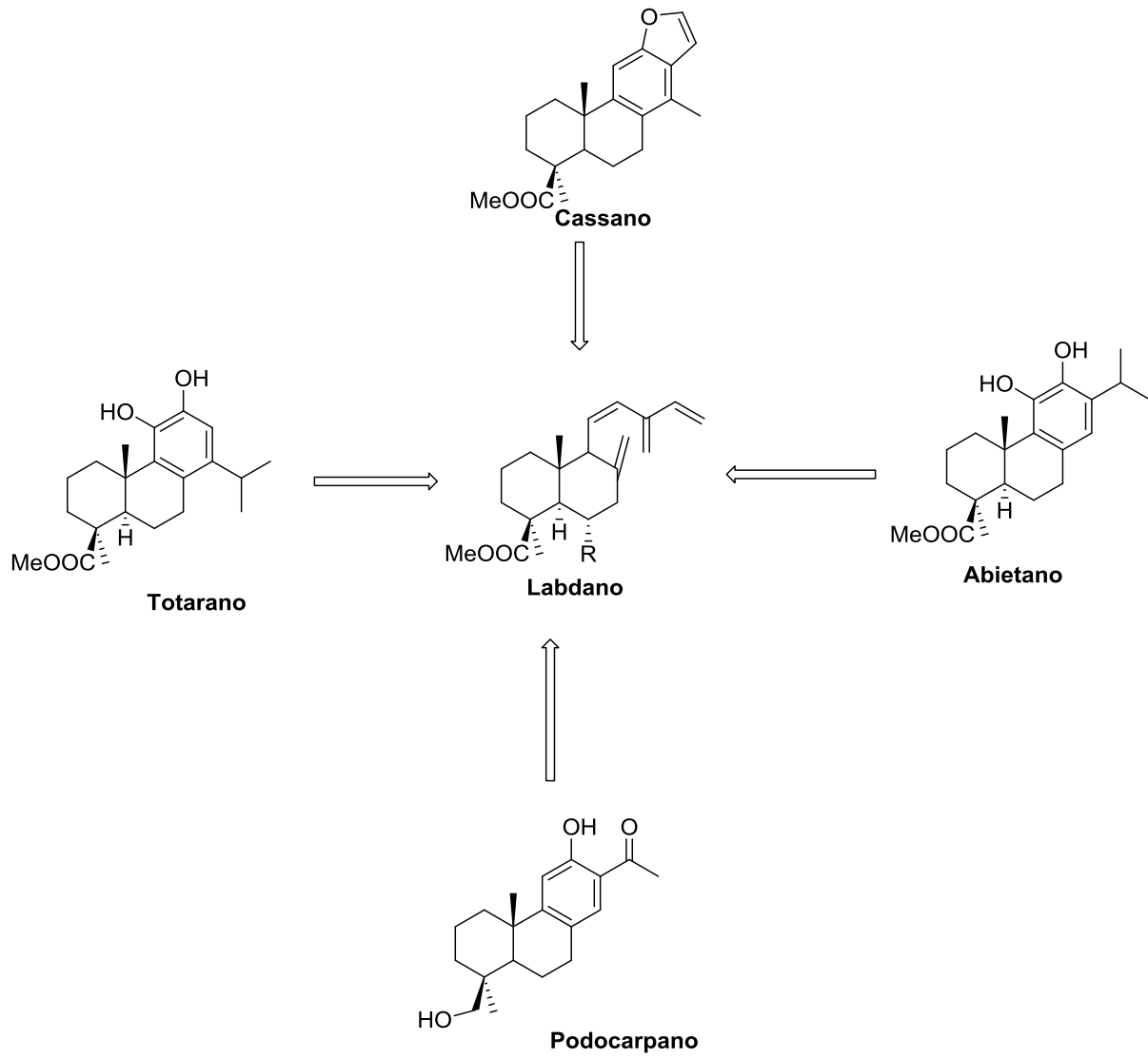
RESUMEN

Esta tesis doctoral, se engloba dentro de una de las principales líneas de investigación seguida por nuestro grupo, llamada “*Productos Naturales y Síntesis Orgánica Aplicada*”, en el campo de la síntesis de productos con actividad biológica a partir de compuestos aislados de fuentes naturales.

Empleando como producto de partida el ácido *trans*-comúnico (aislado de *Cupressus sempervirens*), se ha llevado a cabo la síntesis de diterpenos tipo cassano con anillo furánico (*Benthaminin I*). En dicha síntesis, se ha puesto a punto una estrategia que permite el acceso a la posición X del esqueleto labdano y, de este modo, su adecuada funcionalización.

Desde el mismo producto de partida, se ha completado el estudio para la obtención de diterpenos tricíclicos de esqueleto Totarano con excelente rendimiento. Mediante la aplicación de esta metodología, se han llevado a cabo las síntesis de dos diterpenos tricíclicos naturales biológicamente activos: 12,19-dihydroxy-13-acetyl-8,11,13-podocarpatriene y sugikurojin A.

La segunda parte de la presente tesis plantea la evaluación de la actividad antitumoral. Cinco compuestos demostraron una potente actividad citotóxica frente a las líneas celulares humanas de cáncer de mama, colon y pulmón; destacando el compuesto **164** o Catechol, con una gran actividad y especificidad frente a la línea de cáncer de pulmón A-549. La actividad antitumoral de catechol estuvo mediada por producción de estrés oxidativo, bloqueo del ciclo celular en las fases G0-G1 e inducción de apoptosis.



INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Los seres vivos constituyen una importante fuente de compuestos orgánicos, originados en su metabolismo.

Aquellos que desempeñan un papel esencial en los procesos vitales, como los hidratos de carbono, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, se denominan metabolitos primarios.

Aquellos otros que no son imprescindibles para la supervivencia del organismo se conocen con el nombre de metabolitos secundarios. Aunque el papel biológico que éstos desempeñan no se conoce en algunos casos, se comprueba que se encuentran de forma específica en un organismo o serie de organismos, y pueden ser una expresión de la individualidad de la especie. La proporción en que se encuentran en los organismos que los contienen varían frecuentemente según las condiciones en que se biosintetizan, siendo su abundancia muy escasa, en algunos casos.

Dentro de los metabolitos secundarios, merecen especial mención los terpenoides, debido a su amplia presencia en una gran variedad de seres vivos, que incluyen microorganismos, insectos, plantas y animales. Este extenso grupo de compuestos, que se biosintetizan a partir del ácido mevalónico, están constituidos por unidades de isopreno, de cinco carbonos. La gran variedad de maneras en que estas unidades pueden combinarse, sufriendo reordenamientos y procesos de ciclación, da lugar a una gran diversidad de estructuras. El gran interés que ha despertado el estudio de los terpenoides se debe no sólo a su enorme diversidad estructural, sino también al amplio rango de actividades biológicas que exhiben algunos de ellos, como la anticancerígena, antiinflamatoria, antiviral, antiparasitaria, antifúngica o antibacteriana, entre otras. Por ello, han alcanzado un interés creciente en la industria farmacéutica, agroalimentaria y cosmética.

Durante las últimas décadas se han aislado un gran número de terpenoides de diversas fuentes naturales, que podrían usarse potencialmente como fármacos en el tratamiento de enfermedades. Sin embargo, la escasa cantidad en la que frecuentemente se encuentran esos productos en sus fuentes naturales dificulta un adecuado estudio de sus propiedades, y su posible aplicación como fármaco. Ello ha impulsado, durante los últimos años, a numerosos

grupos de investigación, a la búsqueda de métodos eficientes de preparación, con objeto de disponer de cantidades suficientes de tales compuestos.

Nuestro grupo de investigación, denominado “*Productos Naturales y Síntesis Orgánica Aplicada*”, posee entre sus principales líneas de investigación, el uso de productos naturales, abundantes en sus fuentes, y por tanto económicamente accesibles, en la síntesis de terpenos y compuestos relacionados de alto valor añadido, en la que posee más de 20 años de experiencia. Paralelamente a esta línea de investigación, el grupo viene desarrollando la búsqueda de nuevas transformaciones químicas que faciliten estos procesos sintéticos.

Entre la gran variedad de compuestos naturales usados en síntesis, nuestro grupo ha utilizado ampliamente, entre otros, el ácido *trans*-comúnico (**141**), un labdano muy abundante en algunas especies de *Juniperus* y *Cupressus*,¹ que posee la adecuada funcionalización para realizar la síntesis de las moléculas objetivo.

Esta Tesis Doctoral se enmarca dentro de la línea de investigación de síntesis de productos naturales y relacionados, con actividad biológica, a partir de diterpenos abundantes en la naturaleza.

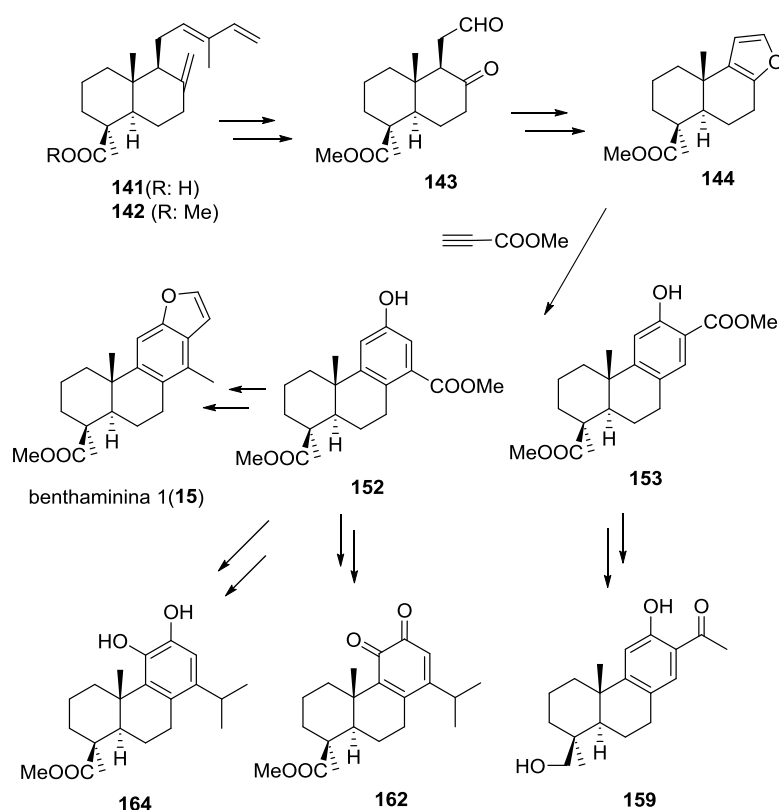
En la Parte I de esta Memoria se describe una nueva estrategia para llevar a cabo la construcción del esqueleto de diterpenos tricíclicos relacionados con cassanos, podocarpanos, totaranos y abietanos, a partir de ácido *trans*-comúnico (**141**). Mediante degradación oxidativa del ester metílico **142** se obtuvo el cetoaldehído **143**, que se transformó en el furanoditerpeno **144**. El tratamiento de éste con propiolato de metilo en caliente proporcionó los hidroxiésteres **152** y **153**. El compuesto **152** es un precursor adecuado de diterpenos con esqueleto de cassano y totarano. Así, se obtuvo el derivado de cassano, *benthaminina 1* (**15**), y los derivados con esqueleto de totarano **164** y **162**. El hidroxiéster **153**, por su parte, es un precursor adecuado de diterpenos de tipo abietano; su O-acetilderivado ha sido transformado previamente por nuestro grupo en sugikurojin A y en el citotóxico 19-hidroxiferruginol.² El

¹ a) de Pascual, J.; San Feliciano, A.; Miguel del Corral, J. M.; Barrero, A. F. *Phytochemistry* **1983**, *22*, 300–301. b) Ahond, A.; Carnero, P.; Gastambide, B. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1964**, 348–349. c) Alvarez-Manzaneda Roldán, E.; Chahboun, R. *Span.* **2007**, ES 2284341 A1 20071101.

² Alvarez-Manzaneda, E.; Chahboun, R.; Cabrera, E.; Alvarez, E.; Alvarez-Manzaneda, R.; Lachkar, M.; Messouri, I. *Synlett* **2007**, 2425–2429.

compuesto **153** ha sido transformado asimismo en el derivado **159**, podocarpano aislado de *Gaultheria yunnanensis*.³

En la Parte II de la Memoria se describe el estudio de la actividad citotóxica de algunos de los compuestos anteriores, e intermedios sintéticos seleccionados, frente a líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7), pulmón (T-84) y colon (A-549). Cinco de los compuestos ensayados mostraron una potente actividad, en particular los derivados de tipo totarano, catecol **162** y orto-quinona **162**.



Esquema 1. Síntesis del cassano **15**, totaranos **164** y **162**, y podocarpano **159**, a partir de ácido *trans*-comúnicico (**141**).

³ Gao, Y.-P.; She, Y.-H.; Xu, X.-K.; Tian, J.-M.; Zeng, H.-W.; Lin, S.; Liu, C.-M.; Zhang, W.-D *Phytochem. Lett.* **2014**, *8*, 6-9.

SÍNTESIS DE DITERPENOS BIOLÓGICAMENTE ACTIVOS A PARTIR
DE ÁCIDO COMUNICO. CASSANOS, PODOCARPANOS, TOTARANOS
Y ABIETANOS

ANTECEDENTES

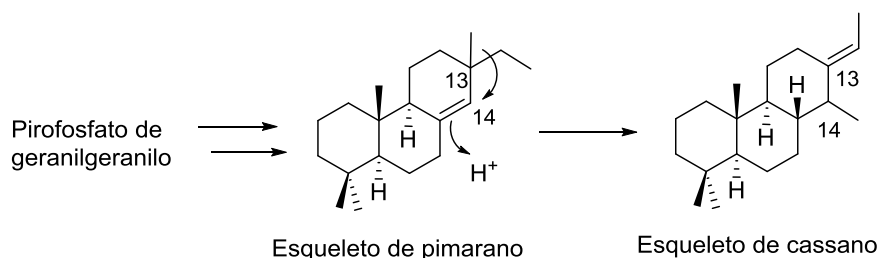
Entre los metabolitos secundarios con estructura terpénica merecen ser destacados los diterpenos tricíclicos con esqueleto de abietano y otros compuestos relacionados, como los de tipo cassano, totarano y podocarpano. Se conocen una gran variedad de productos naturales con este tipo de estructuras, algunos de ellos con una significativa actividad biológica.

Diterpenos tipo cassano.

1-1-1 Aislamiento y estructura.

Los cassanos constituyen un grupo de metabolitos diterpénicos, que han sido aislados durante las últimas décadas de distintas especies de plantas medicinales pertenecientes al género *Caesalpinia*, que han despertado considerable interés debido a su actividad biológica.⁴

El esqueleto básico de cassano se caracteriza por una estructura tricíclica, con un grupo etilo en C-13 y otro metilo en C-14. Se considera que este deriva de un precursor pimaránico, mediante migración de un grupo metilo de C-13 a C-14.⁵



Esquema 2. Ruta biosintética propuesta para los diterpenos tipo cassano.

El grupo etilo en C-14 usualmente forma parte de un cuarto anillo de tipo furano o lactona, y el anillo C tiene carácter aromático en algunos casos. Además, estos compuestos presentan con frecuencia un alto grado de funcionalización. Algunos ejemplos que ilustran esta diversidad estructural son caesaldekarina A (**1**)⁶ y 14-desoxi-□-caesalpina (**2**),⁷ con un

⁴ Para reviews recientes, ver: a) Bao, H.; Zhang, Q.; Ye, Y.; Lin, L. *Phytochem. Rev.* **2017**, *16*, 235–270. b) Maurya, R.; Ravi, M.; Singh, S.; Yadav, P. P. *Fitoterapia* **2012**, *83*, 272–280. c) Dickson, R. A.; Fleischer, T. C.; Houghton, P. J. *Pharmacogn. Commun.* **2011**, *1*, 63–77.

⁵ Overtone, K. H. *Terpenoids and steroids*; Chemical Society: Great Britain, **1974**; Vol. 4.

⁶ Kitagawa, I.; Partomuan, S.; Watano, T.; Shibuya, H.; Fujii, S.; Yamagata, Y.; Kobayashi, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, *42*, 1798–1802.

anillo C saturado y D furánico, sucutirinano B (**3**)⁸ y neocaesalpina D (**4**),⁹ con un anillo D de α -butenolida, desmetilcaesaldekarina C (**5**), con un grupo carboxilo en C-4, el hidroxifurano **7**¹⁰ y 2-acetoxicaesaldekarina E (**8**),¹¹ con un anillo C aromático, caesalpina D (**9**),¹² con funciones oxigenadas en los anillos A y B. Otros derivados de interés, que poseen un grupo ester metílico en C-4, son taepeenina A (**10**), taepeenina C (**11**), taepeenina D (**12**),¹³ y su 20-acetoxiderivado (**13**), taepeenina F (**14**),^{8a} benthaminina 1 (**15**)¹⁴ y benthaminina 3 (**16**).¹⁵ Muy recientemente se han descrito nuevos ejemplos de cassano, como 3-hidroxiphanginin H (**17**) y 3-acetoxiphanginin H (**18**), que poseen un quinto anillo de tetrahydrofurano,¹⁶ y caesmimotam A (**19**) y B (**20**), con un cuarto anillo de α -lactama.¹⁷

⁷ Roengsumran, S.; Limsuwankesorn, S.; Ngamrojanavanich, N.; Petsom, A.; Chaichantipyuth, C.; Ishikawa, T. *Phytochemistry* **2000**, *53*, 841–844.

⁸ Matsuno, Y.; Deguchi, J.; Hirasawa, Y.; Ohyama, K.; Toyoda, H.; Hirobe, C.; Ekasari, W.; Widyawaruyanti, A.; Zaini, N. C.; Morita, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 3774–3777.

⁹ Kinoshita, T. *Chem. Pharm. Bull.* **2000**, *48*, 1375–1377.

¹⁰ Lyder, D. L.; Peter, S. R.; Tinto, W. F.; Bissada, S. M.; McLean, S.; Reynolds, W. F. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1462–1465.

¹¹ a) Pascoe, K. O.; Burke, B. A.; Chan, W. R. *J. Nat. Prod.* **1986**, *49*, 913–915. b) Linn, T. Z.; Awale, S.; Tezuka, Y.; Banskota, A. H.; Kalauni, S. K.; Attamimi, F.; Ueda, J.; Asih, P. B. S.; Syafruddin, D.; Tanaka, K.; Kadota, S. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 706–710.

¹² Ma, G.; Yuan, J.; Wu, H.; Cao, L.; Zhang, X.; Xu, L.; Wei, H.; Wu, L.; Zheng, Q.; Li, L.; Zhang, L.; Yang, J.; Xu, X. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 1025–1031.

¹³ Cheenpracha, S.; Srisuwan, R.; Karalai, C.; Ponglimanont, C.; Chantrapromma, S.; Chantrapromma, K.; Fun, H. K.; Anjum, S.; Attaur-Rahman, S. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 8656–8662.

¹⁴ Dickson, R. A.; Houghton, P. J.; Hylands, P. J. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 1436–1441.

¹⁵ Dickson, R. A.; Annan, K.; Fleischer, T. C.; Houghton, P. J. *J. Pharmacognosy Nutr. Sc.* **2012**, *2*, 21–26.

¹⁶ Qiao, Y.; Xu, Q.; Hu, Z.; Li, X.-N.; Xiang, M.; Liu, J.; Huang, J.; Zhu, H.; Wang, J.; Luo, Z.; Xue, Y.; Zhang, Y. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 3134–3142

¹⁷ Bi, D.; Xia, G.; Li, Y.; Liang, X.; Zhang, L.; Wang, L., *Nat. Prod. Res.* **2018**, *32*, 875–879.

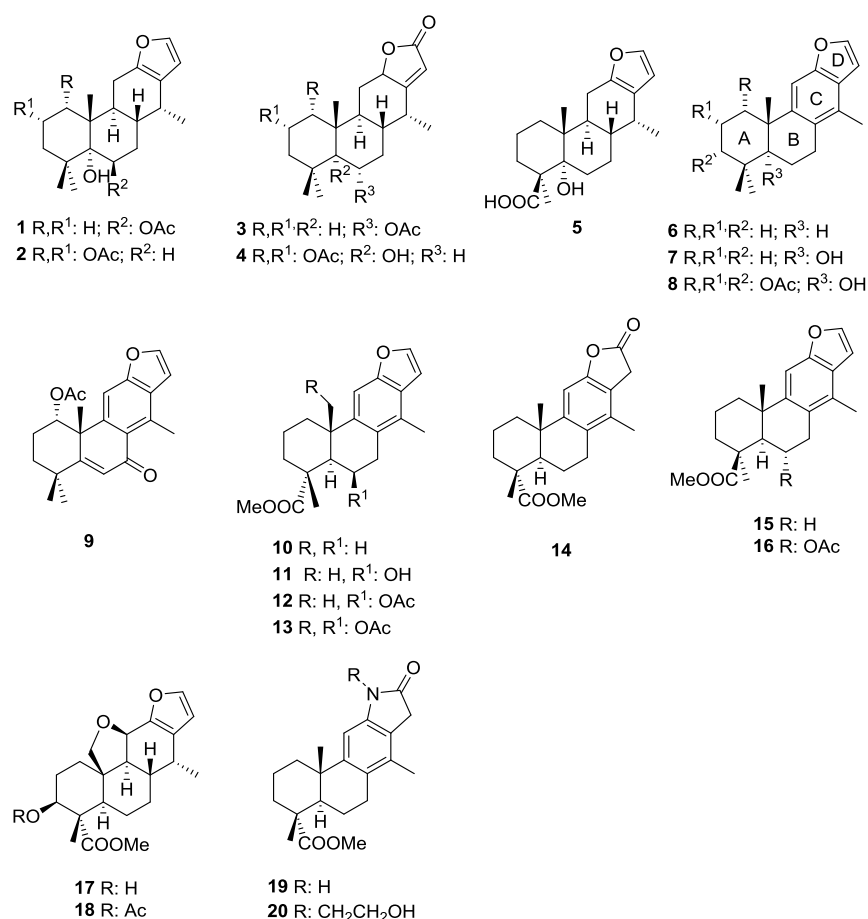


Figura 1. Diterpenos con esqueleto de cassano representativos.

1-2-1 Actividad biológica.

Como ya se ha indicado los cassanos se caracterizan por la amplia y variada actividad biológica que exhiben algunos de sus miembros, en particular aquellos que poseen un anillo C aromático. Entre estas actividades se incluyen la antitumoral,¹⁸ antimalárica,¹⁹ antiinflamatoria,²⁰ antiviral,²¹ antimicrobiana²² y antitripanosoma.²³ Así, caesaldekarina A

¹⁸ a) Yodsaoe, O.; Karalai, C.; Ponglimanont, C.; Tewtrakui, S.; Chantrapromma, S. *Phytochemistry* **2010**, *71*, 1756–1764. b) Yodsaoe, O.; Cheenpracha, S.; Karalai, C.; Ponglimanont, C.; Chantrapromma, S.; Fun, H.-K.; Kanjana-Opas, A. *Phytochemistry* **2008**, *69*, 1242–1249. c) Udenigwe, C. C.; Ata, A.; Samarasekera, R. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55*, 442–445.

¹⁹ a) Kalauni, S. K.; Awale, S.; Tezuka, Y.; Banskota, A. H.; Linn, T. Z.; Asih, P. B. S.; Syafruddin, D.; Kadota, S. *Biol. Pharm. Bull.* **2006**, *29*, 1050–1052. b) Linn, T. Z.; Awale, S.; Tezuka, Y.; Banskota, A. H.; Kalauni, S. K.; Attamimi, F.; Ueda, J. Y.; Asih, P. B.; Syafruddin, D.; Tanaka, K.; Kadota, S. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 706–710.

²⁰ a) Xiang, G.; Fan, M.; Ma, Y.; Wang, M.; Gao, J.; Chen, J.; Li, X.; Xue, W.; Wang, Y.; Gao, H.; Shen, Y.; Xu, Q. *Biochem. Pharmacol.* **2018**, *150*, 150–159. b) Mitsui, T.; Ishihara, R.; Hayashi, K.-I.; Sunadome, M.; Matsuura, N.; Nozaki, H. *Chem. Pharm. Bull.* **2014**, *62*, 267–273.

²¹ a) Jiang, R.-W.; Ma, S.-C.; He, Z.-D.; Huang, X.-S.; But, P. P. H.; Wang, H.; Chan, S.-P.; Ooi, V. E.-C.; Xu, H.-X.; Mak, T. C. W. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 2161–2170. b) Jiang, R.-W.; But, P. P. H.; Ma, S.-C.; Ye, W.-C.; Chan, S.-P.; Mak, T. C. W. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 2415–2418.

²² a) Sudhakar, C.; Reddy, P. R.; Raju, T. V.; Das, B. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 3850–3852. b) Ragasa, C. Y.; Hofilena, J. G.; Rideout, J. A. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1107–1110.

(11) inhibe la producción de interleukina-1,³ el hidroxifurano **7**, un potente inhibidor del óxido nítrico en células RAW264,7 estimuladas por lipopolisacáridos (LPS), y consecuentemente con considerable actividad antiinflamatoria,²⁴ 2-acetoxicaesaldecarina E (**8**) presenta actividad antimalárica,⁸ caesalpina D (**9**) exhibe actividad citotóxica selectiva frente a las líneas celulares humanas de cáncer MCF-7 y AGS.⁹ Otros cassanos bioactivos son taepeenina D (**2**), inhibidor de la transcripción mediada por la señal Hedgehog/GLI, y por tanto potencial agente contra los tumores dependientes de Hh/GLI,²⁵ su 20-acetoxiderivado **13**, con actividad inhibitoria de las líneas celulares humanas de cáncer pancreático SW1990,²⁶ y el antibacteriano benthaminina 1 (**7**).¹¹ También muestran actividad algunos de los cassanos aislados más recientemente. Así, 3-hidroxiphanginin H (**17**) presenta actividad frente a la línea humana de cáncer pancreático SW1990.¹³

1-3-1 Síntesis de cassanos.

A pesar del interés de este tipo de compuestos, se ha investigado poco acerca de su síntesis. En 1963, Spencer et al describen la síntesis racémica de vinhaticoato de metilo (**27**) a partir de la enona **21**, obtenida de la cetona de Weiland-Miescher.²⁷ El anillo C del esqueleto de cassano se elaboró mediante anelación de la cetona **22**, via su α -hidroximetilén derivado, que proporcionó la enona **23**. El grupo metilo en C-14, característico de la molécula objetivo, se introdujo mediante adición conjugada sobre la α,β -enona **24**. El anillo furánico del producto final se generó mediante tratamiento de la α -metoximetilén cetona, derivada del hidroximetilén derivado **25**, con diazoacetato de etilo en presencia de sulfato de cobre a 160°C (Esquema 3).

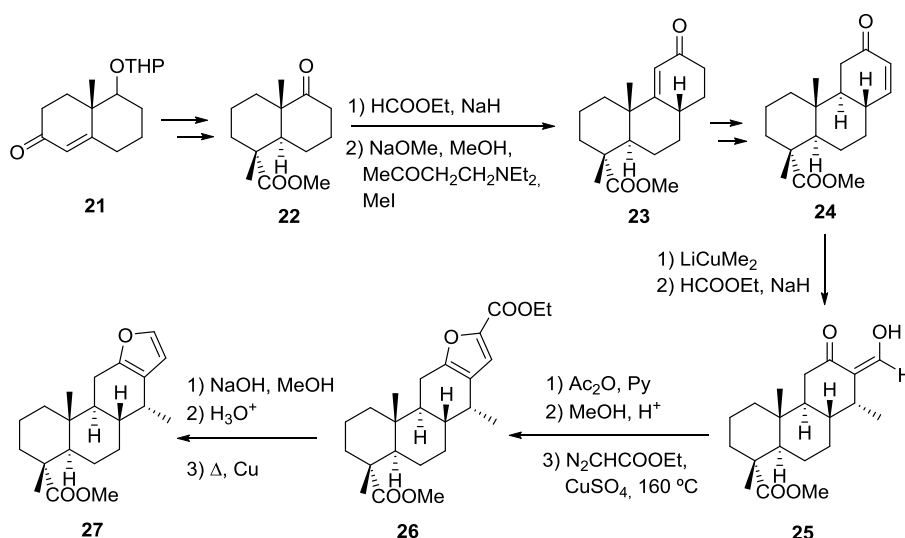
²³ a) Mendoza, D. T.; Gonzalez, L. U. D.; Barria, E. O. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1711. b) Mendoza, D. T.; Gonzalez, L. U. D.; Barria, E. O.; Capson, T. L.; Rios, L. C. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 928–932.

²⁴ a) McPherson, D. D.; Che, C.-T.; Cordell, G. A.; Soejarto, D. D.; Pezzuto, J. M.; Fong, H. H. S. *Phytochemistry* **1986**, *25*, 167–170. b) Yodsaoué, O.; Karalai, C.; Ponglimanont, C.; Tewtrakul, S.; Chantrapromma, S. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 6838–6846.

²⁵ Rifai, Y.; Arai, M. A.; Koyano, T.; Kowithayakorn, T.; Ishibashi, M. J. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 995–997.

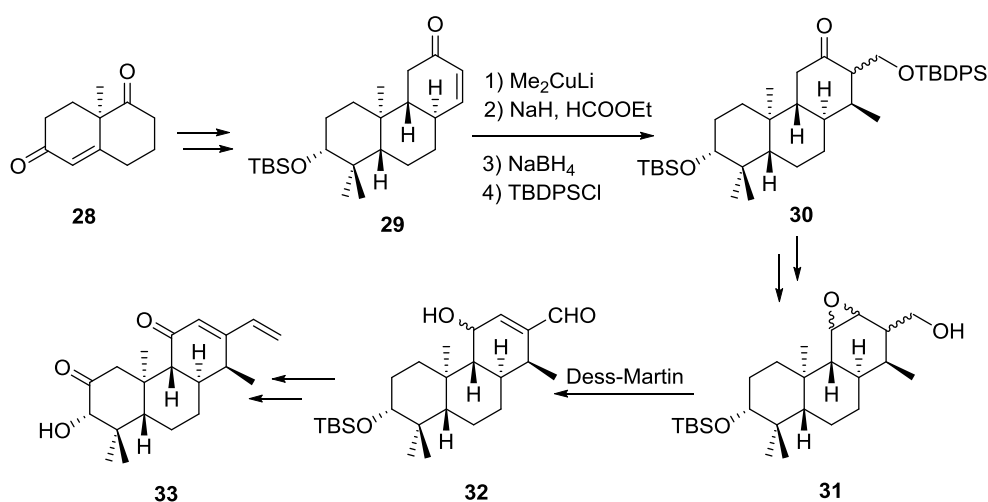
²⁶ Qiao, Y.; Xu, Q.; Hu, Z.; Li, X.-N.; Xiang, M.; Liu, J.; Huang, J.; Zhu, H.; Wang, J.; Luo, Z.; Xue, Y.; Zhang, Y. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 3134.

²⁷ Spencer, T. A.; Villarica, R. M.; Storm, D. L.; Weaver, T. D.; Friary, R. J.; Posler, J.; Shafer, P. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 5497–5499.



Esquema 3. Síntesis racémica de vinhaticoato de metilo (**27**).

Más recientemente, Mori y Yajima han descrito la síntesis de (-)-phytocassano D (**33**) a partir de la (*R*) cetona de Weiland-Miescher (**28**) (Esquema 4).²⁸ El anillo C del esqueleto de cassano se introdujo de un modo similar al utilizado por el grupo de Spencer. Asimismo, el grupo metilo en C-14 se introdujo mediante tratamiento de la enona **29** con dimetilcuprato de litio, mientras que el grupo vinilo en C-13 se elaboró mediante reacción de Wittig del aldehído **32**, obtenido a partir del epoxialcohol **31**. Tras sucesivas oxidaciones se obtuvo el producto final **33**.

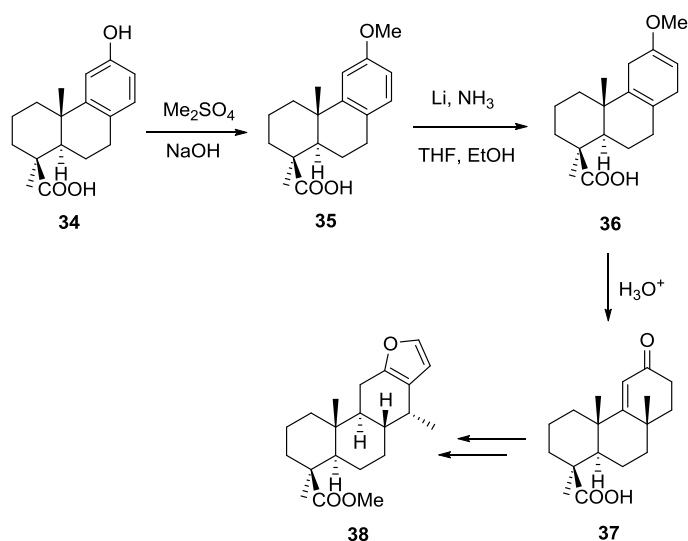


Esquema 4. (-)-phytocassano D (**33**) a partir de la (*R*) cetona de Weiland-Miescher (**28**).

²⁸ Yajima, A.; Mori, K. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 4079-4091.

En lo que respecta a la síntesis de cassanos a partir de terpenoides relacionados, se han propuesto algunas aproximaciones.

En 1971 Spencer et al describen la síntesis enantioespecífica de (+)- vouacapenato de metilo (**38**) a partir de ácido podocárpico (**34**).²⁹ La etapa clave del proceso es la reducción de Birch del metoxiderivado **35**, que proporcionó la α,β -enona **37**, ácido epímero en C-4 del éster **23**. La posterior transformación de **37** en el compuesto final **38**, se llevó a cabo de un modo similar al descrito en el esquema 3 (Esquema 5).



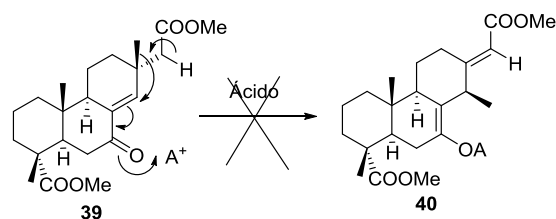
Esquema 5. Síntesis enantioespecífica de (+)- vouacapenato de metilo (**38**) a partir de ácido podocárpico (**34**).

Los precursores más inmediatos de los cassanos, de acuerdo con su biosíntesis, serían terpenoides con esqueleto de pimarano. En 1973, el grupo de Overton ensayó, infructuosamente, la transformación del cetoéster **39**, con esqueleto de pimarano, en el correspondiente derivado de cassano **40**, bajo diferentes condiciones ácidas.³⁰ Ensayos posteriores, investigados por otros grupos, también resultaron infructuosos.³¹

²⁹ Spencer, T. A.; Smith, R. A. J.; Storm, D. L.; Villarica, R. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 4856-4864.

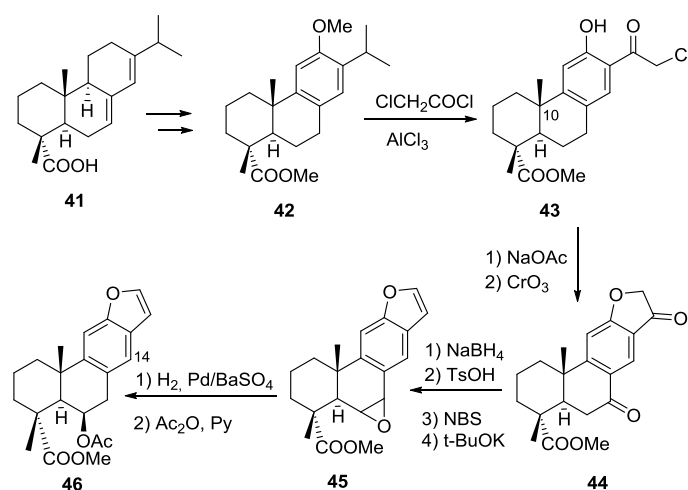
³⁰ Johnston, J. P.; Overton, K. H. *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1: Org. Biorg. Chem.* **1973**, 853-858.

³¹ Ceccherelli, P.; Curini, M.; Tingoli, M.; Pellicciari, R. *Gazzetta Chim Ital.* **1978**, *108*, 129-130.



Esquema 6. Ensayo de reordenamiento del pimarano **39** al derivado de cassano **40**.

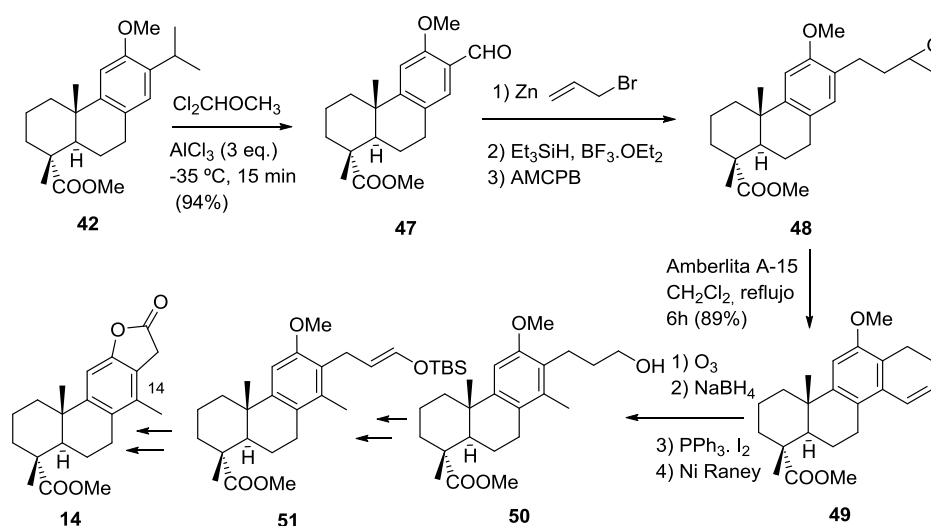
A primera vista, los diterpenos con esqueleto de abietano, y en particular los derivados de dehidroabietano pueden considerarse precursores adecuados de cassanos, particularmente de aquellos que poseen un anillo C aromático, como los derivados **6-14**, con relevante actividad biológica, y **19-20**. Sin embargo la introducción del grupo metilo en C-14 entraña serias dificultades. Así Pitsinos et al, dentro de un programa de investigación encaminado a la síntesis de taepeenina D (**12**) y compuestos relacionados, con objeto de explorar su potencial terapéutico, desarrollaron una ruta sintética a partir de ácido abiético (**41**); sin embargo estos autores obtuvieron el correspondiente 14-desmetilderivado (**46**), probablemente debido a la mencionada dificultad (Esquema 7)³². La etapa clave del proceso es la sustitución ipso del grupo isopropilo en el intermedio **42**, fácilmente obtenido del ácido abiético **41**: Así, el tratamiento del metoxiéster **42** con cloruro de cloroacetilo y AlCl_3 proporcionó la clorocetona **43**, junto con su epímero en C-10. El acetilderivado **46** se obtuvo mediante hidrogenación del epóxido **45**, en presencia de paladio envenenado y subsiguiente acetilación.



Esquema 7. Síntesis de 14-desmetiltaepeenina D (**46**) a partir de ácido abiético (**41**).

³² Chatzopoulou, M.; Antoniou, A.; Pitsinos, E. N.; Bantzi, M.; Koulocheri, S. D.; Haroutounian, S. A.; Giannis, A. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 3344–3347.

Muy recientemente, nuestro grupo ha resuelto el problema de la introducción del grupo metilo en C-14 del anillo aromático. La secuencia sintética, que implica 18 etapas, permitió sintetizar taepeenina F (**14**) a partir del metoxiéster **42**.³³ Tras realizar un estudio del proceso de sustitución ipso del grupo isopropilo del derivado de dehidroabietano, se logró la optimización de éste. Así, mediante tratamiento del éster **42** con diclorometil metil éter, en presencia de AlCl_3 , se obtuvo con un elevado rendimiento el aldehído **47**; en este caso no se obtuvo producto de epimerización en C-10. La etapa clave del proceso, que permitió la introducción de la función carbonada en C-14, característica de los cassanos objetivo, es la ciclación del epóxido **48** hasta el dihidronaftaleno derivado **49**, mediante tratamiento con resina catiónica. La posterior ozonólisis reductora de este derivado tetracíclico, y reducción con Ni Raney del yoduro bencílico correspondiente proporcionó el alcohol **50**, que ya posee el grupo metilo en C-14. El posterior acortamiento de la cadena lateral, mediante degradación oxidativa del silil enol éter **51**, permitió obtener el precursor de la lactona **14**.

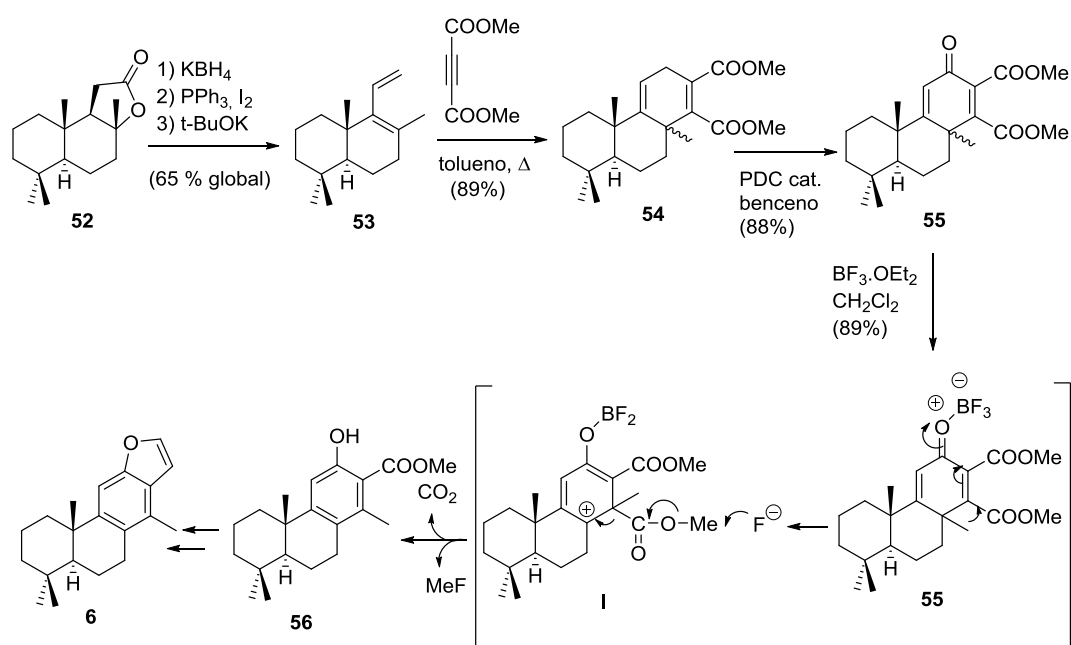


Esquema 8. Síntesis de taepeenina F (**14**) a partir del metoxiéster **42**.

Muy recientemente, se ha desarrollado en nuestro laboratorio un novedoso proceso para la síntesis de este tipo de cassanos a partir de (+)-esclareolida (**52**), lactona natural comercialmente accesible y económica. La secuencia sintética, utilizada para preparar (5□)-

³³ Gutierrez, P.; Altarejos, J.; Linares-Palomino, P. J.; Chahboun, R.; Alvarez-Manzaneda, E. *Org. Chem. Front.* **2018**, *5*, 2537–2541.

vouacapan-8(14),-9(11)-dieno (**6**), no requiere el uso de grupos protectores, comprende 10 etapas, con un rendimiento global del 20%, y economía total de átomos (Esquema 9).³⁴



Esquema 9. Síntesis de taepenina F (**14**) a partir del metoxiéster **42**.

El anillo C del esqueleto de cassano se elaboró mediante cicloadición de Diels-Alder del dieno **53** con acetilendicarboxilato de dimetilo, que condujo al derivado ciclohexadiénico **54**. La etapa clave de la secuencia es la introducción del grupo metilo en C-14, mediante un proceso de reordenamiento dienona-fenol descarboxilativo, sin precedentes. Así, el tratamiento de la dienona **55** con $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ condujo al hidroxíéster **56**. La transformación de este compuesto en el producto final **6** se realizó a través de la correspondiente α -lactona, obtenida tras un proceso de inserción de monóxido de carbono, catalizado por Pd.

Diterpenos tipo totarano.

2-1 Aislamiento y estructura.

³⁴ Zentar, H.; Arias, F.; Haidour, A.; Alvarez-Manzaneda, R.; Chahboun, R.; Alvarez-Manzaneda, E. *Org. Lett.* **2018**, *20*, 7007–7010.

Los diterpenos tipo-totarano constituyen un grupo de compuestos con esqueleto tricíclico, isómero del de abietano, aislados de una amplia variedad de especies vegetales. El primer compuesto de este tipo que se aisló es totarol (**57**), encontrado en las hojas de *Podocarpus totara*.³⁵ Casi cuarenta años después, en 1973, J. D. Martín describe el aislamiento de tres nuevos diterpenos con este esqueleto de la corteza de la raíz de *Maytenus dispermus*.³⁶ La estructura de estos compuestos, maytenoquinona (**58**), dispermol (**59**) y dispermona (**60**), fue revisada años más tarde por Matsumoto et al, mediante síntesis,³⁷ corrigiendo la inicialmente propuesta por Martín para dispermol (12-metoxitotarol).

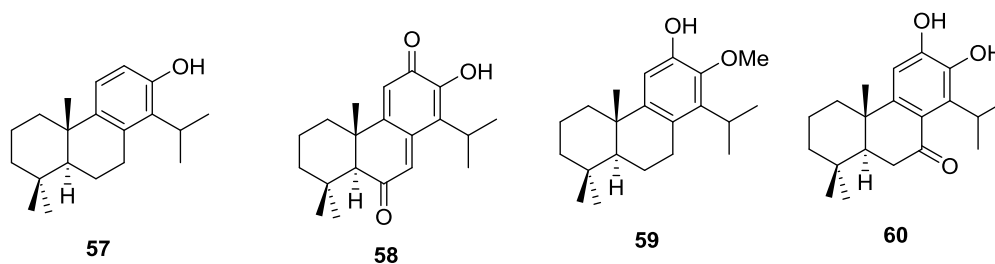


Figura 2. Diterpenos con esqueleto de totarano aislados en los años 70.

En 1991, el grupo de Kubo describe el aislamiento de cuatro nuevos totaranos de la corteza de *Podocarpus nagi*, totaradiol (**61**), 19-hidroxitotarol (**62**), totaral (**63**) y 4-oxo-19-norototarol (**64**).³⁸ En 1994, Kuo et al aislaron 1,3-dioxototarol (**66**), 1-oxo-3-hidroxitotarol (**67**) y isototarolona (**68**) de las raíces de *Juniperus chinensis* LINN, confirmando su estructura mediante transformaciones químicas.³⁹ En 2003, el grupo de Campbell aisló 8,11,13-totaratrien-12,13-diol (**69**) de las hojas de *Harpagophytum procumbens*.⁴⁰ Tres años más tarde, Amaro-Luis et al aislaron de las hojas de *Retrophyllum rospigliosii* un nuevo glucosil diterpeno con esqueleto de totarano, rospigliósido (**69**).⁴¹ En 2008, el grupo de Takeya describe el aislamiento de cinco ácidos con esqueleto de totarano,

³⁵ Short, W. F.; Stromberg, H. J. *Chem. Soc.* **1937**, 516-520.

³⁶ Martín, J. D. *Tetrahedron* **1973**, 29, 2553-2559.

³⁷ Matsumoto, T.; Ohmura, T.; Usui, S. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1979**, 52, 1957-1963.

³⁸ Ying, B. P.; Kubo, I. *Phytochemistry* **1991**, 30, 1951-1955.

³⁹ Kuo, Y. -H.; Chen, W. -C. *Chem. Pharm Bull.* **1994**, 42, 1774-1776.

⁴⁰ Clarkson, C.; Campbell, W. E.; Smith, P. *Planta Med.* **2003**, 69, 720-724.

⁴¹ Amaro-Luis, J. M.; Amesty, A. E.; Montealegre, R.; Bahsas, A. *J. Mex. Chem. Soc.* **2006**, 50, 96-99.

inumakiol C-E (**71-73**), F (**75**) y G (**74**), y un triol, inumakiol H (**65**), de la corteza de *Podocarpus macrophyllus* D. DON.⁴² Más recientemente, se ha aislado un derivado hemiacetalico (**76**), de los rizomas de *Isodon hispida* (BENTH.) HARA,⁴³ y dos bis-diterpenoides, el ácido macrophyllico (**77**), previamente aislado por Takeya et al,³⁹ y su 7-hidroxiderivado (**78**).⁴⁴

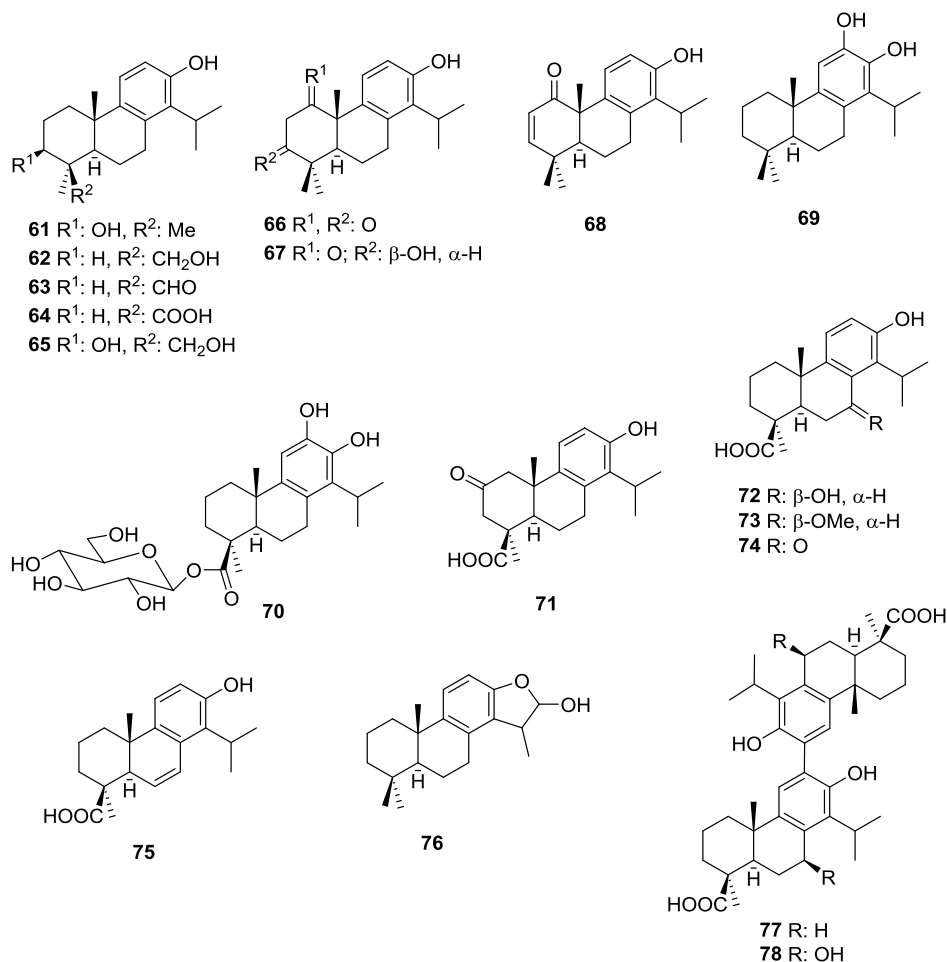


Figura 3. Diterpenos con esqueleto de totarano aislados desde 1990 hasta ahora.

⁴² Sato, K.; Sugawara, K.; Takeuchi, H.; Park, H.-S.; Akiyama, T.; Koyama, T.; Aoyagi, Y.; Takeya, K.; Tsugane, T.; Shimura, S. *Chem. Pharm. Bull.* **2008**, *56*, 1691-1697.

⁴³ Huang, B.; Huang, Z.-Y.; Xiao, C.-J.; Dong, X.; Jian, B. *Helv. Chim. Acta* **2015**, *98*, 527-533.

⁴⁴ Addo, E.M.; Chai, H.-B.; Hymete, A.; Yeshak, M. Y.; Slebodnick, C.; Kingston, D.G.I.; Rakotondraibe, L. H. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 827-835

2-2 Actividad biológica.

La resistencia de *Podocarpus totara*, especie vegetal de la que se aisló totarol (**57**), por vez primera,³² frente a diversos tipos de enfermedades, despertó el interés por este tipo de compuestos desde hace tiempo. Totarol (**57**) protege la actividad enzimática respiratoria mitocondrial frente a lesiones ocasionadas por la peroxidación dependiente de NADPH.⁴⁵ Estudios recientes han revelado que este compuesto exhibe actividad anti-plasmodium, antifúngica y antimicrobiana.^{37, 46} Además, presenta actividad neuroprotectora, como activador de la ruta Akt/HO-1, protegiendo del accidente cerebro-vascular isquémico, disminuyendo el estrés oxidativo.⁴⁷

Otros derivados con esqueleto de totarano también exhiben actividad biológica. Así, el diol **69** muestra potente actividad frente a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, y *propionibacterium acnés*, con baja toxicidad;⁴⁸ asimismo, presenta actividad selectiva frente a *Plasmodium falciparum*, y moderada actividad citotóxica frente a células tumorales HepG2.³⁷ El triol **65** y los ácidos **64**, **65** y **77** fueron ensayados frente a distintos microorganismos patógenos orales, como *Streptococcus mutans*, *S. sobrinus*, *S. pyogenes*, and *Staphylococcus aureus* (condiciones aerobias), *Actinomyces viscosus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, y *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (condiciones anaerobias); el ácido macrophyllico (**77**) resultó ser el más potente.³⁹ Totaradiol (**61**) muestra un espectro antimicrobiano similar al de totarol (**57**), pero considerablemente más débil.^{43c}

2-3 Síntesis de totaranos.

Dos métodos principales han sido utilizados para construir el esqueleto de totarano: la ciclación catiónica de aril poliprenos y la isopropilación de podocarpanos. El grupo de Tada ha descrito la síntesis de totarol (**57**) mediante ciclación electrofílica del aril polieno **80**, obtenido por tratamiento del bencil anión derivado de **79** con cloruro de geranilo, con BF₃-

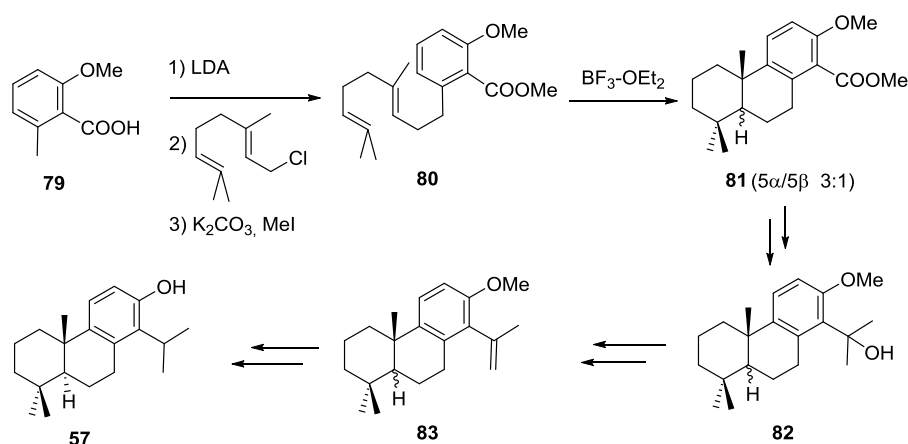
⁴⁵ Haraguchi, H.; Ishikawa, H.; Kubo, I. *Planta Med.* **1997**, *63*, 213-215.

⁴⁶ a) Yamaji, K.; Mori, S.; Akiyama, M.; Kato, A.; Nakashima, T. *J. Chem. Ecol.* **2007**, *33*, 2254-2265. b) Muroi, H.; Kubo, I. *J. Appl. Bacteriol.* **1996**, *80*, 387-394. c) Kubo, I.; Muroi, H.; Himejima, M. *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 1436-1440. d) Nicolson, K.; Evans, G.; O'Toole, P. W. *Microbiol. Lett.* **1999**, *179*, 233-239.

⁴⁷ Gao, Y.; Xu, X.; Chang, S.; Wang, Y.; Xu, Y.; Ran, S.; Huang, Z.; Li, P.; Li, J.; Zhang, L. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2015**, *289*, 142-154.

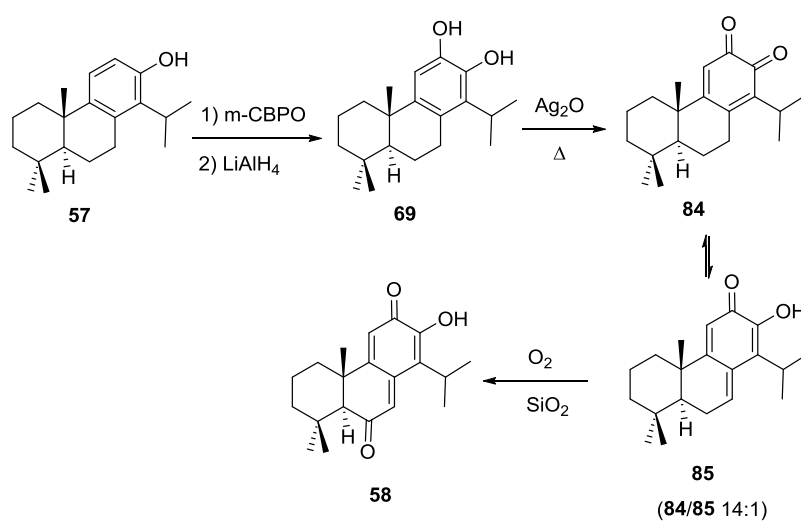
⁴⁸ Tada, M.; Kurabe, J.; Yoshida, T.; Ohkanda, T.; Matsumoto, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **2010**, *58*, 818-824.

OEt₂. El grupo isopropilo en C-14 se introdujo mediante tratamiento sucesivo del metoxiéster **81** con MeLi y MeMgBr (Esquema 10).⁴⁹



Esquema 10. Síntesis de totarol (**10**) mediante ciclación catiónica del aril polieno **80**.

Estos mismos autores, transformaron totarol (**57**) en 8,11,13-totaratrien-12,13-diol (**69**) y maytenoquinona (**58**), mediante sucesivas oxidaciones (Esquema 11).⁴⁶

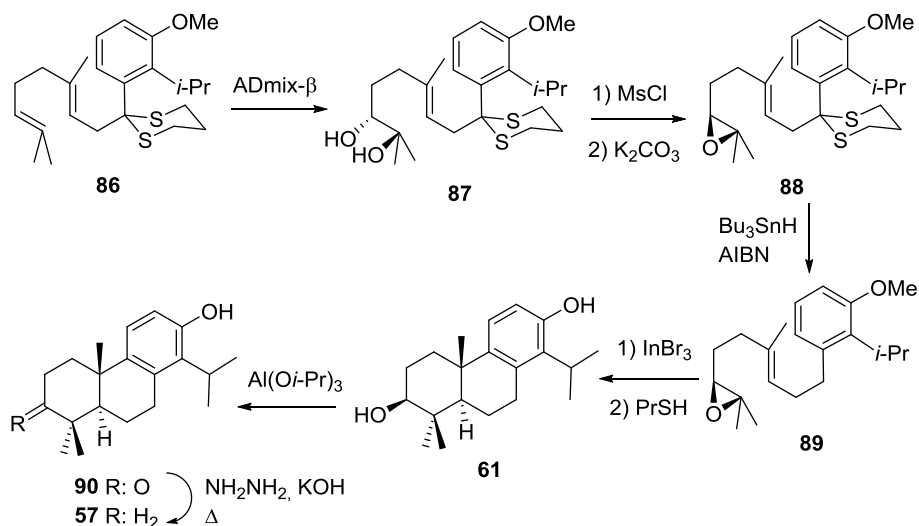


Esquema 11. Transformación de totarol (**10**) en 8,11,13-totaratrien-12,13-diol (**69**) y maytenoquinona (**58**).

El grupo de Shaw ha descrito la síntesis de totarol (**57**), totaradiol (**61**) y totarolona (**90**) mediante una biclización epóxido/alqueno/areno diastereoselectiva (Esquema 12). El

⁴⁹ Tada, M.; Kurabe, J.; Yasue, H.; Ikuta, T. *Chem. Pharm. Bull.* **2008**, *56*, 287-291.

tratamiento del aril polipreno **86** con ADmix- β condujo al diol **87** como un único diastereoisómero. La ciclación catiónica del epóxido, mediante tratamiento con InBr₃ y subsiguiente ruptura del metiléter proporcionó totaradiol (**61**), cuyo tratamiento con isopropóxido de aluminio rindió totarolona (**90**), cuya reducción condujo a totarol (**57**).⁵⁰

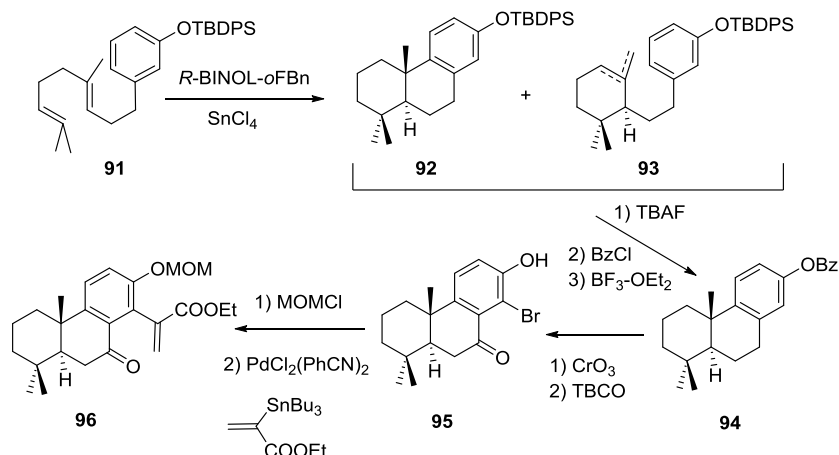


Esquema 12. Síntesis de totarol (**57**), totaradiol (**61**) y totarolona (**90**) mediante ciclación catiónica diastereoselectiva.

Liu et al preparan un intermedio con esqueleto de totarano, durante su síntesis de hispidanina A. Construyen el esqueleto de totarano a partir del podocarpano **94**, sintetizado mediante ciclación catiónica enantioselectiva del aril polipreno **91**, preparado utilizando un procedimiento similar al empleado por Tada. El tratamiento de **91** con SnCl₄, en presencia de *R*-BINOL-*o*FBn, condujo a una mezcla del podocarpano **92** y el ariletíl ciclohexeno **93**, que se transformó en el podocarpano benzoilado **94**, mediante ruptura del silil éter, benzoilación y posterior tratamiento con BF₃-OEt₂. El grupo isopropilo del derivado de totarano lo introducen mediante acoplamiento cruzado de Stille del correspondiente derivado del *orto*-bromofenol **95** (Esquema 13).⁵¹

⁵⁰ Kim, M. B; Shaw, J. T. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 3324-3327.

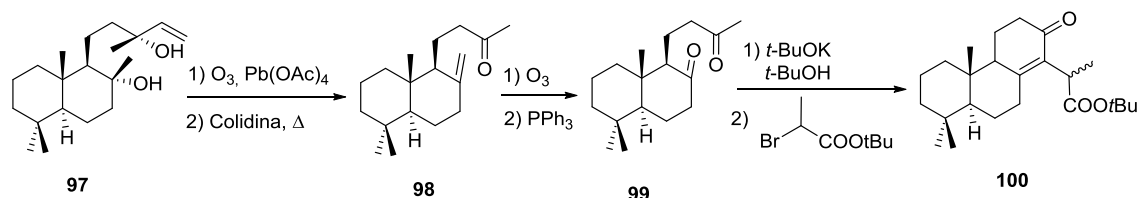
⁵¹ Deng, H.; Cao, W.; Liu, R.; Zhang, Y.; Liu, B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 5849–5852



Esquema 13. Síntesis del derivado **96**, con esqueleto de totarano, a partir del podocarpano **94**.

Estos mismos autores han sintetizado de modo enantioselectivo los derivados de fenoles podocarpánicos a partir del diterpeno labdánico (-)-esclareol (**97**),⁵² siguiendo un procedimiento desarrollado hace algunos años en nuestro laboratorio.⁵³

Yang et al, desarrollan también una síntesis de hispidanina A,⁵⁴ en la que elaboran el esqueleto de totarano del intermedio **100** a partir de (-)-esclareol (**97**), vía la dicetona **99**, preparada en nuestro laboratorio a partir de **97** (Esquema 14).⁵⁰



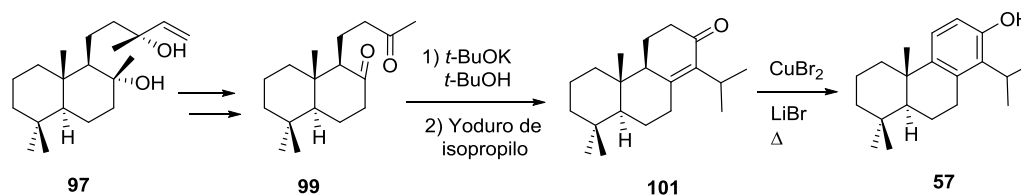
Esquema 14. Síntesis del intermedio **100**, con esqueleto de totarano, a partir de (-)-esclareol (**97**), *via* la dicetona **99**.

Metz et al utilizaron un procedimiento similar en su síntesis de totarol (**57**) a partir de (-)-esclareol (**97**) (Esquema 15).⁵⁵

⁵² Cao, W.; Deng, H.; Sun, Y.; Liu, B.; Qin, S. *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 9120 – 9129.

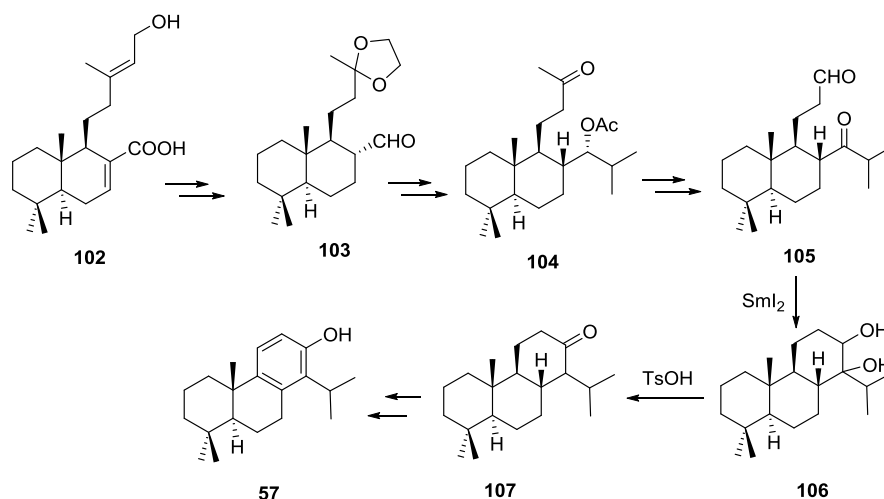
⁵³ a) Alvarez-Manzaneda, E.; Romera Santiago, J. L.; Chahboun, R. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 563-566. b) Alvarez-Manzaneda, E.; Chahboun, R.; Alvarez, E.; Fernández, A.; Alvarez-Manzaneda, R.; Haidour, A.; Ramos, J. M.; Akhaouzan, A. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 606–608.

⁵⁴ Li, F.; Tu, Q.; Chen, S.; Zhu, L.; Lan, Y.; Gong, J.; Yang, Z. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 5844 –5848.



Esquema 15. Síntesis de totarol (**57**) a partir de (-)-esclareol (**97**).

Urones et al han descrito la síntesis enantioespecífica de totarol (**57**) a partir de ácido zamoránico (**102**), utilizando una larga secuencia sintética. Etapas clave de ésta son el acoplamiento pinacólico del cetoaldehido **105**, mediado por SmI₂, y el reordenamiento pinacólico del diol resultante **106**, que conduce a la cetona tricíclica **107**, cuya aromatización rinde el producto final (Esquema 16).⁵⁶



Esquema 16. Síntesis de totarol (**57**) a partir de ácido zamoránico (**102**).

⁵⁵ Rogachev, v.; Löhl, T.; Markert, T.; Metz, P. *Arkivoc* **2012**, 172-180.

⁵⁶ Marcos, I. S.; Cubillo, M. A.; Moro, R. F.; Díez, D.; Basabe, P.; Sanz, F.; Urones, J. G. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 8831-8835.

Diterpenos tipo abietano.

3-1 Aislamiento y estructura.

Los abietanos constituyen una familia de diterpenos naturales que han sido aislados de diversas especies vegetales, y que han despertado gran interés debido a su variada y potente actividad biológica.⁵⁷

Estos compuestos poseen un esqueleto carbonado tricíclico, que se ejemplifica en el ácido abiético (**108**), componente principal de los ácidos presentes en las resinas de diferentes especies de pináceas,⁵⁸ y que se obtiene como residuo de la industria papelera, siendo comercialmente disponible.⁵⁹

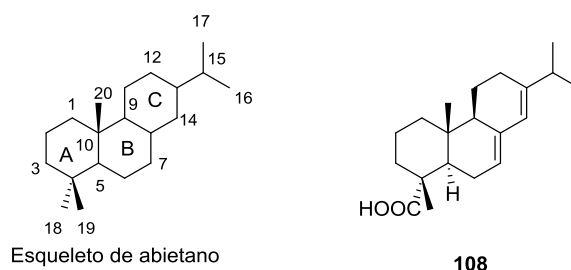


Figura 4. Esqueleto de abietano y ácido abiético (**108**).

Los abietanos aromáticos constituyen el grupo mayoritario de metabolitos de este tipo. Se caracterizan por poseer un anillo C aromático y distinto grado de oxidación en diferentes posiciones. Ejemplos representativos son el ácido deshidroabiético (**109**) y sus hidroxiderivados **110-112**, aislados de las partes aéreas de *Abies georgei* (Pinaceae), endémica de China.⁶⁰ Otros interesantes metabolitos son ferruginol (**113**), aislado por vez primera de las partes aéreas de *Podocarpus ferrugineus*,⁶¹ y sus derivados hinokiol (**114**) y sugiol (**115**),

⁵⁷ a) Hanson, J. R. *Nat. Prod. Rep.* **2015**, 32, 76-87. b) González, M. A. *Nat. Prod. Rep.* **2015**, 32, 684-704.

⁵⁸ Ikan, R. *Natural Products – A laboratory Guide*. Israel University Press; Jerusalem, 1969.

⁵⁹ Leppanen, H.; Kukkonen, J. V. K.; Oikari, A. O. J.; *Water Research*, **2000**, 34(5); 1604-.

⁶⁰ Yang, X.-W.; Feng, L.; Li, S.-M.; Liu, X.-H.; Li, Y.-L.; Wu, L.; Shen, Y.-H.; Tian, J.-M.; Zhang, X.; Liu, X.-R.; Wang, N.; Liu, Y.; Zhang, W.-D. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, 744-754.

⁶¹ Briggs, L. H.; Cawley, R. W.; Loe, J. A.; Taylor, W. I. *J. Chem. Soc.* **1950**, 955-958.

aislados de diferentes especies de coníferas.⁶² Particular interés tienen, por su actividad biológica, los derivados de tipo quinona, como royleanona (**116**), aislada de *Inula royleana*,⁶³ su 12-desoxiderivado **117**,⁶⁴ y cryptoquinona (**118**), aislada de la corteza de *Cryptomeria japonica*.⁶⁵

Se conocen otra serie de abietanos que poseen funcionalización en C-19, y que son menos abundantes que los que la presentan en C-18, como el ácido abiético (**108**) y su deshidroderivado **109**. Entre estos cabe destacar el ácido callitrísico (**119**), hallado en la resina de varias especies *Callitris* (Cupressaceae) (resina sandaraca de Australia),⁶⁶ y en diversas otras especies. Más recientemente, se ha descrito el aislamiento de una serie de ácido relacionados, como el angustanoico F (**120**)⁶⁷ y el majusanico D (**121**).⁶⁸ Relacionados con los anteriores, con un grupo isopropilideno, son los ácidos angustanoico E (**122**), y jiadifenoicos B (**123**) y C (**124**), aislados de *Illicium jiadifengpi*.⁶⁴ Por último, merecen ser destacados, por su relevante actividad biológica 19-hidroxiferruginol (**125**),⁶⁹ su 6,7-deshidroderivado, sujikurojin A (**126**),⁷⁰ y triptobenceno J (**127**), aislado de *Tripterygium hypoglaucom*.⁷¹

⁶² a) Fukushima, I.; Sayama, Y.; Kyogoku, K.; Murayama, H. *Agric. Biol. Chem.* **1968**, *32*, 1103-7. b) Sengupta, P.; Choudhuri, S. N.; Khastgir, H. N. *Tetrahedron* **1960**, *10*, 45-54.

⁶³ Edwards, O. E.; Feniak, G.; Los, M. *Can. J. Chem.* **1962**, *40*, 1540-1546.

⁶⁴ Tan, N.; Kaloga, M.; Radtke, O. A.; Kiderlen, A. F.; Oksuz, S.; Ulubelen, A.; Kolodziej, H. *Phytochemistry* **2002**, *61*, 881-884.

⁶⁵ Kofujita, H.; Ota, M.; Takahashi, K.; Kawai, Y.; Hayashi, Y. *Phytochemistry* **2002**, *61*, 895-898.

⁶⁶ a) Gough, L. J. *Tetrahedron Lett.* **1968**, *3*, 295-298. b) Carman, R. M.; Deeth, H. C. *Aust. J. Chem.* **1967**, *20*, 2789-2793.

⁶⁷ Zhang, G.-J.; Li, Y.-H.; Jiang, J.-D.; Yu, S.-S.; Qu, J.; Ma, S.-G.; Liu, Y.-B.; Yu, D.-Q. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 1017-1023.

⁶⁸ Fang, Z.-F.; Zhang, G.-J.; Chen, H.; Bal, J.; Yu, S.-S.; Liu, Y.; Wang, W.-J.; Ma, S.-G.; Qu, J.; Xu, S. *Planta Med.* **2013**, *79*, 142-149.

⁶⁹ Cambie, R. C.; Cox, R. E.; Sidwell, D. *Phytochemistry* **1984**, *23*, 333-336.

⁷⁰ Arihara, S.; Umeyama, A.; Bando, S.; Imoto, S.; Ono, M.; Tani, M.; Yoshikawa, K. *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, *52*, 354-358.

⁷¹ Duan, H.; Kawazoe, K.; Bando, M.; Kido, M.; Takaishi, Y. *Phytochemistry* **1997**, *46*, 535-543.

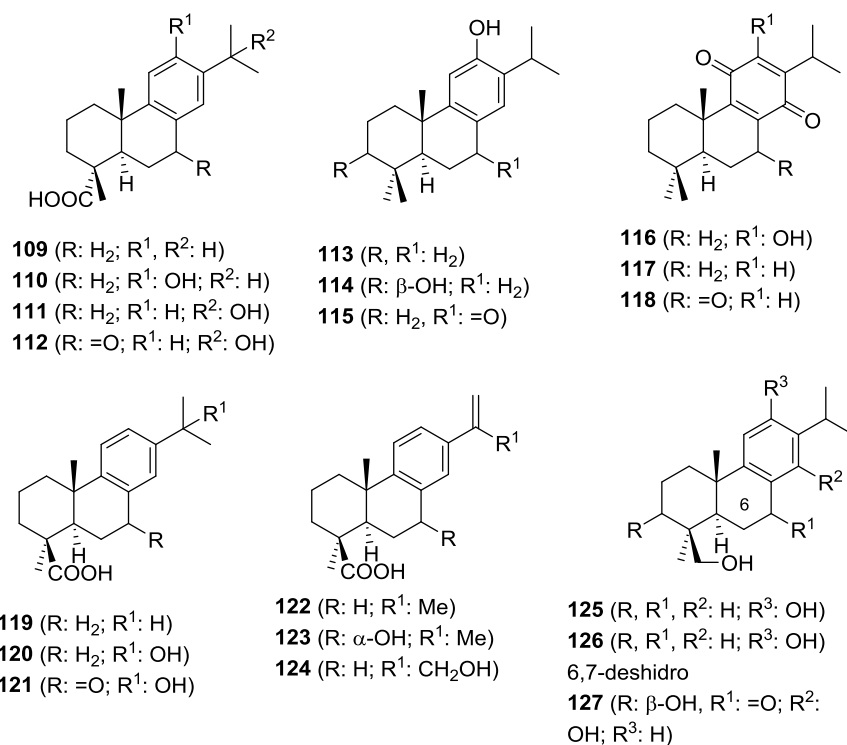


Figura 5. Ejemplos representativos de abietanos aromáticos.

3-2 Actividad biológica.

Como se ha indicado con anterioridad, muchos de los abietanos con anillo C aromático presentan una amplia y variada actividad biológica. El ácido deshidroabiético (**109**) exhibe propiedades antiulcerosas,⁷² antimicrobianas,⁷³ antitumorales⁷⁴ y antiinflamatorias.^{57,75} El ácido relacionado **110** también muestra actividad antitumoral,^{71b} mientras que los ácidos **111-112** muestran efecto antiinflamatorio frente a la producción de NO inducida por LPS en macrófagos.⁵⁷ Ferruginol (**113**) ha atraído considerablemente la atención debido a que exhibe

⁷² San Feliciano, A.; Gordaliza, M.; Salinero, M. A.; Miguel del Corral, J. M. *Planta Med.* **1993**, *59*, 485–490.

⁷³ a) Tapia, A. A.; Vallejo, M. D.; Gouiric, S. C.; Feresin, G. E.; Rossomando, P. C.; Bustos, D. A. *Phytochemistry* **1997**, *46*, 131–133. b) Fallarero, A.; Skogman, M.; Kujala, J.; Rajaratnam, M.; Moreira, V. M.; Yli-Kauhaluoma, J.; Vuorela, P. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 12054–12072.

⁷⁴ a) Tanaka, R.; Tokuda, H.; Ezaki, Y. *Phytomedicine* **2008**, *15*, 985–992. b) Kinouchi, Y.; Ohtsu, H.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Matsunaga, S.; Tanaka, R. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 817–820.

⁷⁵ Pferschy-wenzig, E. M.; Kunert, O.; Presser, A.; Bauer, R. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 11688–11693. b) Kang, M.-S.; Hirai, S.; Goto, T.; Kuroyanagi, K.; Lee, J.-Y.; Uemura, T.; Ezaki, Y.; Takahashi, N.; Kawada, T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *369*, 333–338. c) Jang, H.-J.; Yang, K.-S. *Arch. Pharmacol Res.* **2011**, *34*, 913–917.

importante actividad, como antimicrobiano,⁷⁶ insecticida,⁷⁷ cardioactivo,⁷⁸ antioxidante,⁷⁹ antileishmaniosis y nematocida.⁸⁰ Hinokiol (**114**) también posee actividad antioxidante⁸¹ y exhibe una significativa inhibición de la producción de óxido nítrico, dependiente de la concentración, en macrófagos.⁸² Sugiol (**115**) exhibe actividad antimalárica frente a *Plasmodium falciparum*,⁸³ antiinflamatoria y hepatoprotectora.⁸⁴ Este compuesto también muestra citotoxicidad in vitro frente a tumores humanos de páncreas y frente a melanoma.⁸⁵ Además es un potente inhibidor de la actividad de la xantina oxidasa e inhibe las especies de oxígeno reactivas,⁸⁶ y es activo frente a las bacterias Gram-negativas y frente a *Candida albicans*.⁸⁷ También merecen ser destacados derivados con anillo de quinona, como royleanona (**116**), su 12-desoxiderivado **117**, con actividad antileishmaniosis,⁸⁸ y criptoquinona (**118**), que muestra actividad antifúngica y citotóxica frente a las células P388 del neoplasma linfóide de ratón.⁸⁹

Entre los derivados de abietano con función en C-19 merecen ser destacados el ácido calitrísico (**119**) y sus derivados, ácidos angustanoico F (**120**) y majusánico D (**121**), que

⁷⁶ a) Muhammad, I.; Mossa, J. S.; El-Ferally, F. S. *Phytother. Res.* **1992**, *6*, 261–264. b) Moujir, L.; Gutiérrez-Navarro, A. M.; San Andrés, L.; Luis, L. G. *Phytother. Res.* **1996**, *10*, 172–174. c) Becerra, J.; Flores, C.; Mena, J.; Aqueveque, P.; Alarcón, J.; Bittner, M.; Hernández, V.; Hoeneisen, M.; Ruiz, E.; Silva, M. *J. Chil. Chem. Soc.* **2002**, *47*, 151–157. d) Solís, C.; Becerra, J.; Flores, C.; Robledo, J.; Silva, M. *J. Chil. Chem. Soc.* **2004**, *49*, 157–161. e) Smith, E. C. J.; Williamson, E. M.; Wareham, N.; Kaatz, G. W.; Gibbons, S. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 210–217.

⁷⁷ Chang, S.; Chen, P.; Wang, S.; Wu, H. *J. Med. Entomol.* **2001**, *38*, 455–457.

⁷⁸ Ulubelen, A.; Birman, H.; Oksuz, S.; Topcu, G.; Kolak, U.; Barla, A.; Voelter, W. *Planta Med.* **2002**, *68*, 818–821.

⁷⁹ a) Ono, M.; Yamamoto, M.; Masuoka, C.; Ito, Y.; Yamashita, M.; Nohara, T. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1532–1537. b) Wang, S.-Y.; Wu, J.-H.; Shyur, L.-F.; Kuo, Y.-H.; Chang, S. T. *Holzforchung* **2002**, *56*, 487–492.

⁸⁰ Samoylenko, V.; Dunbar, D. C.; Gafur, M. A.; Khan, S. I.; Ross, S. A.; Mossa, J. S.; El-Ferally, F. S.; Tekwani, B. L.; Bosselaers, J.; Muhammad, I. *Phytother. Res.* **2008**, *22*, 1570–1576.

⁸¹ Gaspar-Marques, C.; Simoes, M. F.; Valdeira, M. L.; Rodríguez, B. *Nat. Prod. Res.* **2008**, *22*, 167–177.

⁸² Chen, Y.-C.; Li, Y.-C.; You, B.-J.; Chang, W.-T.; Chao, L. K. Lo, L.-C.; Wang, S.-Y.; Huang, G.-J.; Kuo, Y.-H. *Molecules* **2013**, *18*, 682–689.

⁸³ Okasaka, M.; Takaishi, Y.; Kashiwada, Y.; Kodzhimatov, O. K.; Ashurmetov, O.; Lin, A. J.; Consentino, L. M.; Lee, K.-H. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 2635–2640.

⁸⁴ Shyur, L.-F.; Huang, C.-C.; Lo, C.-P.; Chiu, C.-Y.; Chen, Y.-P.; Wang, S.-Y.; Chang, S.-T. *Phytochemistry* **2008**, *69*, 1348–1358.

⁸⁵ Fronza, M.; Murillo, R.; Slusarczyk, S.; Adams, M.; Hamburguer, M.; Heinzmann, B.; Laufer, S.; Merfort, I. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 4876–4881.

⁸⁶ Lin, C. N.; Huang, A.-M.; Lin, K.-W.; Hour, T.-C.; Ko, H.-H.; Yang, S.-C.; Pu, Y.-S. *Phytochemistry* **2010**, *71*, 2140–2146.

⁸⁷ Pereda-Miranda, R.; Hernandez, L.; Lopez, R. *Planta Med.* **1992**, *58*, 223–224.

⁸⁸ Tan, N.; Kaloga, M.; Radtke, O. A.; Kiderlen, A. F.; Oksuz, S.; Ulubelen, A.; Kolodziej, H. *Phytochemistry* **2002**, *61*, 881–884.

⁸⁹ Kofujita, H.; Ota, M.; Taakahashi, K.; Kawai, Y.; Hayashi, Y. *Phytochemistry* **2002**, *61*, 895–898.

exhiben actividades antiinflamatoria⁶⁵ y frente al virus Coxsackie B3.⁹⁰ Esta misma actividad la presentan los ácidos angustanoico E (**122**), jiadifenoico B (**123**) y jiadifenoico C (**124**).⁹¹ Por su parte, 19-hidroxiferruginol (**125**) muestra moderada actividad citotóxica, mientras que triptobenceno J (**127**) es un potente inhibidor de la producción de citokina en células humanas mononucleares periféricas estimuladas por lipopolisacáridos.⁹²

3-3 Síntesis de diterpenos con esqueleto de abietano.

Dada la considerable actividad biológica que exhiben muchos de los diterpenos con esqueleto de abietano se han descrito numerosas síntesis, principalmente de derivados aromáticos y relacionados, que incluyen síntesis totales y síntesis a partir de terpenoides.⁹³ La síntesis total de estos diterpenos se realiza habitualmente mediante ciclaciones catiónicas de los adecuados aril derivados. Así, se han descrito síntesis totales de ácido deshidroabiético (**109**),⁹⁴ ferruginol (**113**),⁹⁵ sugiol (**115**),⁹⁶ y ácido calitrísico (**119**),⁹⁷ entre otros. Más recientemente, se han descrito síntesis totales enantioselectivas de algunos de estos compuestos.⁹⁸

Dada la abundancia en la naturaleza del ácido abiético (**108**) y sus derivados, se han descrito innumerables síntesis de diterpenos con esqueleto de abietano a partir de estos precursores naturales.⁹⁰ Los abietanos funcionalizados en C-19 se han sintetizado, bien mediante isomerización de precursores funcionalizados en C-18, o partiendo de terpenoides

⁹⁰ Wang, Y.-D.; Zhang, G.-J.; Qu, J.; Li, Y.-H.; Jiang, J.-D.; Liu, Y.-B.; Ma, S.-G.; Li, Y.; Lv, H.-N.; Yu, S.-S. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 1976–1983.

⁹¹ Zhang, G.-J.; Li, Y.-H.; Jiang, J.-D.; Yu, S.-S.; Qu, J.; Ma, S.-G.; Liu, Y.-B.; Yu, D.-Q. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 1017–1023.

⁹² Duan, H.; Takaishi, Y.; Momota, H.; Ohmoto, Y.; T.; Tori, M.; Takaoka, S.; Jia, Y.; Li, D. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 8413–8424.

⁹³ González, A. M. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 1883–1908.

⁹⁴ a) Stork, G.; Schulenberg, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 250–251. b) Stork, G.; Schulenberg, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 284–292. c) Ireland, R. E.; Kierstead, R. C. *J. Org. Chem.* **1962**, *27*, 703–704. d) Ireland, R. E.; Kierstead, R. C. *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 2543–2559.

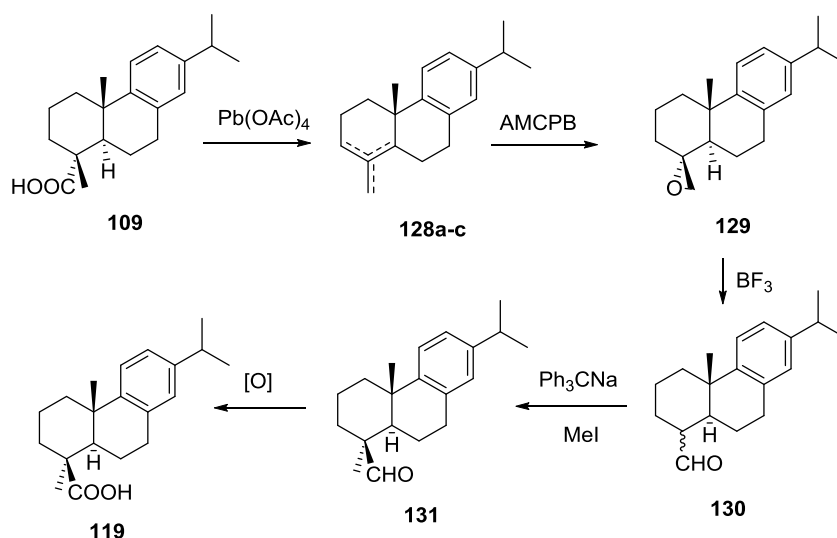
⁹⁵ a) King, F. E.; King, T. J.; Topliss, J. G. *J. Chem. Soc.* **1957**, 573–577. b) Rao, P. N.; Raman, K. *Tetrahedron* **1958**, *4*, 294–301. c) Torii, S.; Uneyama, K.; Hamada, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1977**, *50*, 2503–2504. d) Yang, Z.; Kitano, Y.; Chiba, K.; Shibata, N.; Kurokawa, H.; Doi, Y.; Arakawa, Y.; Tada, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 347–356.

⁹⁶ a) Meyer, W. L.; Clemans, G. B.; Manning, R. A. *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 3686–3694. b) Matsumoto, T.; Usui, S.; Morimoto, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1977**, *50*, 1575–1579.

⁹⁷ a) Sharma, M.; Ghatak, U. R.; Dutta, P. C. *Tetrahedron* **1963**, *19*, 985–994. b) Mori, K.; Matsui, M. *Tetrahedron* **1966**, *22*, 879–884. c) Mori, K.; Matsui, M. *Tetrahedron* **1968**, *24*, 6573–6575. c) Welch, S. C.; Kim, J. H. *Synth. Commun.* **1976**, *6*, 27–31. d) Welch, S. C.; Hagan, C. P.; Kim, J. H.; Chu, P. S. *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 2879–2887.

⁹⁸ a) Tada, M.; Nishiiri, S.; Yang, Z.; Imai, Y.; Tajima, S.; Okazaki, N.; Kitano, Y.; Chiba, K. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2000**, 2657–2664. b) Surendra, K.; Rajendar, G.; Corey, E. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 642–645.

que poseen la funcionalidad en C-19. Ejemplos del primer tipo se recogen en los esquemas 17 y 18. En 1971, Pelletier et al describen la preparación de ácido calitrísico (**119**) a partir de ácido deshidroabiético (**109**) (Esquema 17).⁹⁹ La descarboxilación oxidativa de éste, mediante tratamiento con $\text{Pb}(\text{OAc})_4$, rindió una mezcla de alquenos **128a-c**. La epoxidación del isómero exocíclico proporcionó el correspondiente epóxido **129**, cuyo tratamiento con BF_3 condujo a la mezcla de aldehídos epímeros **130**. La posterior metilación del enolato de éstos dio lugar al aldehído **131**, cuya oxidación rindió finalmente el ácido **119**.



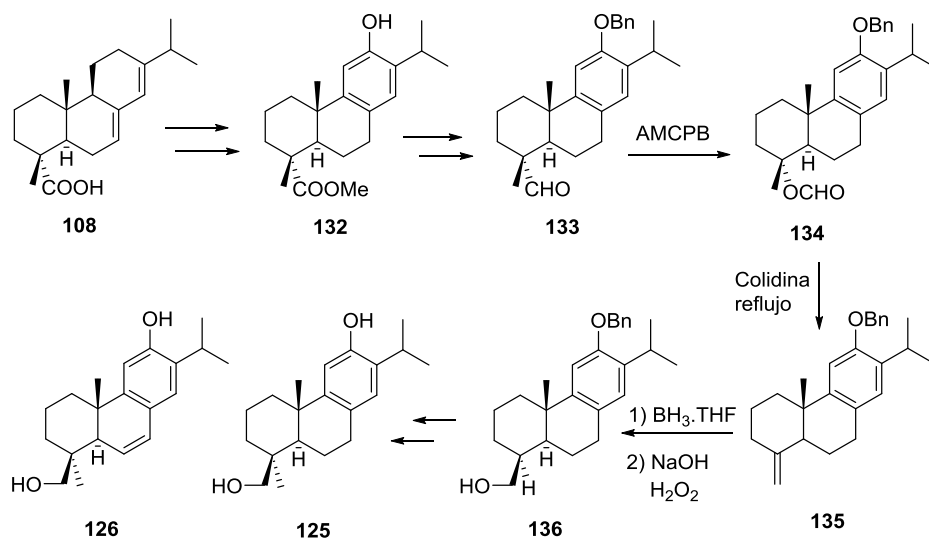
Esquema 17. Síntesis de ácido calitrísico (**119**) a partir de ácido deshidroabiético (**109**).

Nuestro grupo describió en 2010 la síntesis de 19-hidroxiferruginol (**125**) y sujikurojin A (**126**) a partir de ácido abiético (**108**) (Esquema 18).¹⁰⁰ El hidroxiéster **132**, cuya preparación a partir de ácido abiético (**108**) ha sido realizada en nuestro laboratorio,¹⁰¹ se transformó en el aldehído **133**, que mediante oxidación de Baeyer-Villiger condujo al formiato **134**, cuyo calentamiento con colidina proporciona el alqueno exocíclico **135**, con completa regioselectividad. La hidrobioración oxidativa de éste condujo al alcohol **136**, que presenta ya la función en C-19 característica de los productos finales **125** y **126**.

⁹⁹ Pelletier, S. W.; Herald, D. L. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1971**, 10-11.

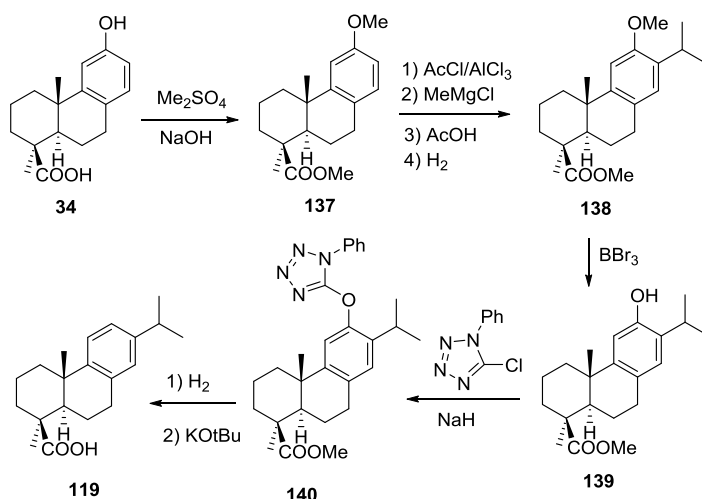
¹⁰⁰ Alvarez-Manzaneda, E.; Chahboun, R.; Alvarez, E.; Ramos, J. M.; Guardia, J. J.; Messouri, I.; Chayboun, I.; Mansour, A. I.; Dahdouh, A. *Synthesis* **2010**, 3493-3503.

¹⁰¹ Alvarez-Manzaneda, E.; Chahboun, R.; Cabrera, E.; Alvarez, E.; Alvarez-Manzaneda, R.; Lachkar, M.; Messouri, I.; *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 989-992.



Esquema 18. Síntesis de 19-hidroxiferruginol (**125**) y sujikurojin A (**126**) a partir de ácido abiético (**108**).

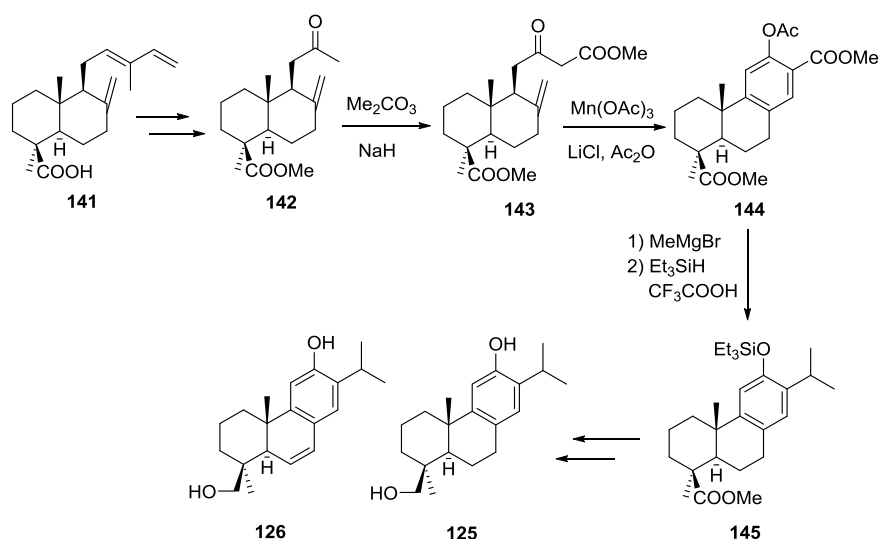
Alternativamente se han sintetizado abietanos funcionalizados en C-19 a partir de terpenoides que poseen esta funcionalización. Un ejemplo representativo es la síntesis de ácido calitrísico (**119**) a partir de ácido podocárpico (**34**), descrita por Huffman (Esquema 19).¹⁰² El grupo isopropilo del esqueleto de abietano se introdujo mediante acilación de Friedel-Crafts, subsiguiente tratamiento con MeMgCl de la metilcetona resultante, deshidratación e hidrogenación. De este modo se obtuvo el metoxiéter **138**. El grupo hidroxilo en C-12 se eliminó mediante hidrogenólisis del feniltetrazolil éter **140**.



¹⁰² Huffman, J. W. *J. Org. Chem.* **1970**, *35*, 3154-3156.

Esquema 19. Síntesis de ácido calitrísico (**119**) a partir de ácido podocárpico (**34**).

Nuestro grupo ha descrito la síntesis de 19-hidroxiferruginol (**125**) y sujikurojin A (**126**) a partir de ácido *trans*-comúnico (**141**), diterpeno muy abundante en el ciprés (Esquema 20).¹⁰³ La etapa clave del proceso es la formación del anillo C aromático mediante una ciclación radicalaria oxidativa, mediada por Mn(III), del α -cetoéster **143**. El grupo isopropilo se introdujo mediante tratamiento de ñ ester con MeMgBr y posterior reducción catiónica del alcohol bencílico resultante.



Esquema 20. Síntesis de 19-hidroxiferruginol (**125**) y sujikurojin A (**126**) a partir de ácido *trans*-comúnico (**141**).

Terpenos tipo podocarpano.**4-1 Aislamiento y estructura.**

Los podocarpanos forman parte de un grupo de metabolitos con esqueleto tricíclico de *tri-nor*-abietano, en el que habitualmente el anillo C es aromático,¹⁰⁴ distribuido en la naturaleza en diversas especies, particularmente de la familia Podocarpaceae,¹⁰⁵ Meliaceae¹⁰⁶ y Cupressaceae.¹⁰⁷

¹⁰³ Alvarez-Manzaneda, E.; Chahboun, R.; Cabrera, E.; Alvarez, E.; Alvarez-Manzaneda, R.; Lachkar, M.; Messouri, I. *Synlett* **2007**, 2425-2429.

¹⁰⁴ Hanson, J. R. *Nat. Prod. Rep.* **2004**, *21*, 312-320.

¹⁰⁵ Briggs, L. H.; Cambie, R. C.; Seelye, R. N.; Warth, A.D. *Tetrahedron* **1959**, *7*, 270-276.

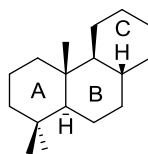


Figura 6. Esqueleto de podocarpano.

El más importante miembro de esta familia es el ácido podocárpico (**34**), que fue aislado por vez primera de *Podocarpus cupressinus* y también de *P. dacrydioides* y de *Dacrydium cupressinum*.¹⁰⁸ Bastantes años después, el grupo de Guo aisló de las raíces de *Gaultheria yunnanensis* dos nuevos metabolitos, a los que denominaron ácido gaultérico (**146**) y gaulteronoterpeno (**148**).¹⁰⁹ Recientemente, Zhang et al. aislaron de las raíces de esta misma especie 12,19-dihidroxi-13-acetil-8,11,13-podocarpatrieno (**147**).¹¹⁰

También se conocen podocarpanos con estructura de 1,4-benzoquinona. Así, en 2001, Kuo y Chien aislaron 3-hidroxi-13-metoxi-8,12-podocarpadien-11,14-diona (**149**), 18-hidroxi-13-metoxi-8,12-podocarpadien-11,14-diona (**150**) y 13-metoxi-8,12-podocarpadien-2,11,14-triona (**151**), de la corteza de *Taiwania cryptomerioides*.¹¹¹

Se han aislado asimismo, derivados con fragmento de catecol. Dentro de este grupo mercen destacarse nimbidiol (**152**), aislado de las raíces de *Azadirachta indica*,¹¹² y su 7-desoxiderivado **153**, aislado más recientemente de *Calastrus hypoleucus*.¹¹³ Otro importante grupo de podocarpanos y 18-*nor*-podocarpanos, con estructura de catecol son los compuestos **154-161**, aislados en 2008 por el grupo de Kuo de *Taiwania cryptomerioides*.¹¹⁴

¹⁰⁶ a) Siddiqui, S.; Ara, I.; Faizi, S.; Mahmood, T.; Siddiqui, B. S. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 3903-3907. b) Ara, I.; Siddiqui, B. S.; Faizi, S.; Siddiqui, S. *J. Chem. Soc., Perkin Transactions 1*: **1989**, 343-5.

¹⁰⁷ a) Kuo, Y.; Chien, S. *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, *49*, 1033-1035. b) Chien, S.-C.; Chen, C.-C.; Chiu, H.-L.; Chang, C.-I.; Tseng, M.-H.; Kuo, Y.-H. *Phytochemistry* **2008**, *69*, 2336-2340

¹⁰⁸ Sherwood, I. R.; Short, W. F. *J. Chem. Soc.* **1938**, 1006-1013.

¹⁰⁹ Zhang, Z.; Guo, D.; Li, C.; Zheng, J.; Koike, K.; Jia, Z.; Nikaido, T. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 297-298.

¹¹⁰ Gao, Y.-P.; Shen, Y.-H.; Xu, X.-K.; Tian, J.-M.; Zeng, H.-W.; Lin, S.; Liu, C.-M.; Zhang, W.-D. *Phytochemistry Letters* **2014**, *8*, 6-9.

¹¹¹ Kuo, Y.-H.; Chien, S.-C. *Chem- Pharm. Bull.* **2001**, *49*, 1033-1035.

¹¹² Majumder, P. L.; Maiti, D. C.; Kraus, W.; Bokel, M. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 3021-3023.

¹¹³ Xiong, Y.; Wang, K.; Pan, Y.; Sun, H.; Tu, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 786-789.

¹¹⁴ Chien, S.-C.; Chen, C.-C.; Chiu, H.-L.; Chang, C.-I.; Tseng, M.-H.; Kuo, Y.-H. *Phytochemistry* **2008**, *69*, 2336-2340.

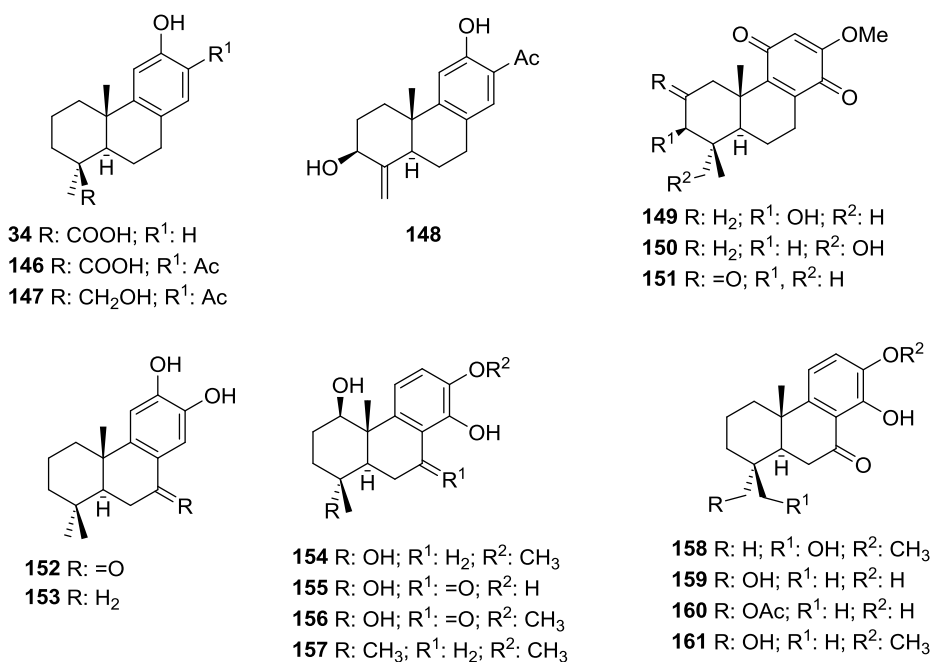


Figura 7. Ejemplos representativos de podocarpanos naturales.

4-2 Actividad biológica.

El primer miembro de la familia, el ácido podocárpico (**34**) presenta una variedad de actividades biológicas significativas. Es un potente agonista del receptor X del hígado e inhibidor de la liberación de citoquina, siendo potencialmente útil para el tratamiento de la arteriosclerosis y enfermedades inflamatorias.¹¹⁵ Recientemente se ha descrito que el ácido podocárpico (**34**) es un potente agente terapéutico frente a patologías relacionadas con la diabetes y enfermedades neurodegenerativas.¹¹⁶ Nimbidiol (**152**) inhíbe las carbohidrasas

¹¹⁵ a) Liu, W.; Chen, S.; Dropinski, J.; Colwell, L.; Robins, M.; Szymonifka, M.; Hayes, N.; Sharma, N.; MacNaul, K.; Hernandez, M.; Burton, C.; Sparrow, C. P.; Menke, J. G.; Singh, S. B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4574-4578. b) Singh, S. B.; Ondeyka, J. G.; Liu, W.; Chen, S.; Chen, T. S.; Li, X.; Bouffard, A.; Dropinski, J.; Jones, A. B.; McCormick, S.; Hayes, N.; Wang, J.; Sharma, N.; MacNaul, K.; Hernandez, M.; Chao, Y.-S.; Baffic, J.; Lam, M.-H.; Burton, C.; Sparrow, C. P.; Menke, J. G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2824-2828. c) He, W.; Gavai, A.; Huang, F. C.; Regan, J.; Hanney, B.; Poli, G.; Bruno, J.; Chan, W. K.; Djuric, S. W.; Yu, K. T.; Zilberstein, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 469-474. d) Cui, Y. M.; Yasutomi, E.; Otani, Y.; Yoshinaga, T.; Ido, K.; Sawada, K.; Ohwada, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5197-5200.

¹¹⁶ Chaudhuri, J.; Bose, N.; Gong, J.; Hall, D.; Rifkind, A.; Bhaumik, D.; Peiris, T. H.; Chamoli, M.; Le Catherine, H.; Liu, J.; Lithgow, G. J.; Ramanathan A.; Xu, X. Z. S.; Kapahi, P. *Curr. Biol.* **2016**, *26*, 3014-3025.

intestinales, exhibiendo propiedades antidiabéticas,¹¹⁷ así como efecto anti-angiogénesis.¹¹⁸ 7-Desoxi-nimbidiol (**153**) presenta actividad antitumoral,¹¹⁹ analgésica y antiinflamatoria.¹²⁰

3 β ,12-dihidroxi-13-metil-6,8,11,13-podocarpetraeno (**162**) y 3 β ,12-dihidroxi-13-metil-5,8,11,13-podocarpetraen-7-ona (**163**), aislados del extracto metanólico de *Securinega suffruticosa*, exhiben actividad citotóxica selectiva frente a cinco células tumorales humanas (A549, BEL 7402, BGC-823, HCT-8 y A2780).¹²¹ En el año 2013, el grupo de Zhang aisló de las hojas de *Celastrus orbiculatus* un dímero podocarpánico, al que llamaron (M)-bicelaphanol A (**165**); este compuesto presenta un significativo efecto neuroprotector frente a la disminución de la viabilidad de las células PC12 inducidas por H₂O₂, lo que le convierte en un potencial candidato para el tratamiento del estrés oxidativo asociado a enfermedades neurodegenerativas.¹²²

Muy recientemente, en 2018, Liu et al, han descrito el aislamiento de anemhupehin A (**166**), de las partes aéreas de *Anemone hupehensis*, que muestra actividad frente a células tumorales humanas (HL-60, SMMC-7721, A-549, MCF-7 y SW480).¹²³ Ese mismo año, el grupo de Zhang ha descrito el aislamiento de cinco nuevos podocarpanos del tallo de *celastrus angulatus*; entre ellos, el compuesto **164** mostró potente citotoxicidad frente a las células tumorales humanas HCT116 y BEL7404; el dímero **167**, también aislado de esta especie, mostró potente actividad frente a las líneas celulares de cáncer humano A549 y MDA-MB-231.¹²⁴

¹¹⁷ Mukherjee, A.; Sengupta, S. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2013**, *28*, 900-910.

¹¹⁸ Bai, S. T.; Deng, Q. D.; Xie, Y.; Tang, W. -H.; Gao, W.-J.; Tong, L. *tianran Chanwu Yanjiu Ku Kaifa* **2015**, *27*, 900-904.

¹¹⁹ Xiong, Y.; Wang, K.; Pan, Y.; Sun, H.; Tu, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 786-789.

¹²⁰ Zapata-Estrella, H. E.; Sanchez-Pardenilla, A. D. M.; Garcia-Sosa, K.; Escalante-Erosa, F.; de Campos-Buzzi, F.; Meira-Quintao, N. L.; Cechinel-Filho, V.; Peña-Rodríguez, L. M. *Nat. Prod. Comm.* **2014**, *9*, 1319-1321.

¹²¹ Yuan, W.; Lu, Z.; Liu, Y.; Meng, C.; Cheng, K.-D.; Zhu, P. *Chem. Pharm. Bull.* **2005**, *53*, 1610-1612.

¹²² a) Wang, L.-Y.; Wu, J.; Y., Z.; Wang, X.-J.; Fu, Y.; Liu, S.-Z.; Wang, H.-M.; Zhu, W.-L.; Zhang, H.-Y.; Zhao, W.-M. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 745-749. b) Wang, X. J.; Wang, L. Y.; Fu, Y.; Wu, J.; Tang, X. C.; Zhao, W. M.; Zhang, H. Y. *Phytomedicine* **2013**, *20*, 1064-1070.

¹²³ Yu, X.; Duan, K.T.; Wang, Z.-X.; Chen, H.-P.; Gan, X.-Q.; Huang, R.; Li, Z.-H.; Feng, T.; Liu, J.-K. *Nat. Prod. Bioprospecting* **2018**, *8*, 31-35.

¹²⁴ Wang, J.; Jin, H.; Li, H.-L.; Zhang, W.-D. *Fitoterapia* **2018**, *130*, 156-162.

Algunos derivados del ácido podocárpico, como su metil éster **168** y los acilderivados sintéticos **169-171**, muestran actividad frente a virus de influenza tipo A.¹²⁵ Otro derivado sintético, como el aminofenol **172**, es un potente inhibidor de la 5-lipooxigenasa.¹²⁶

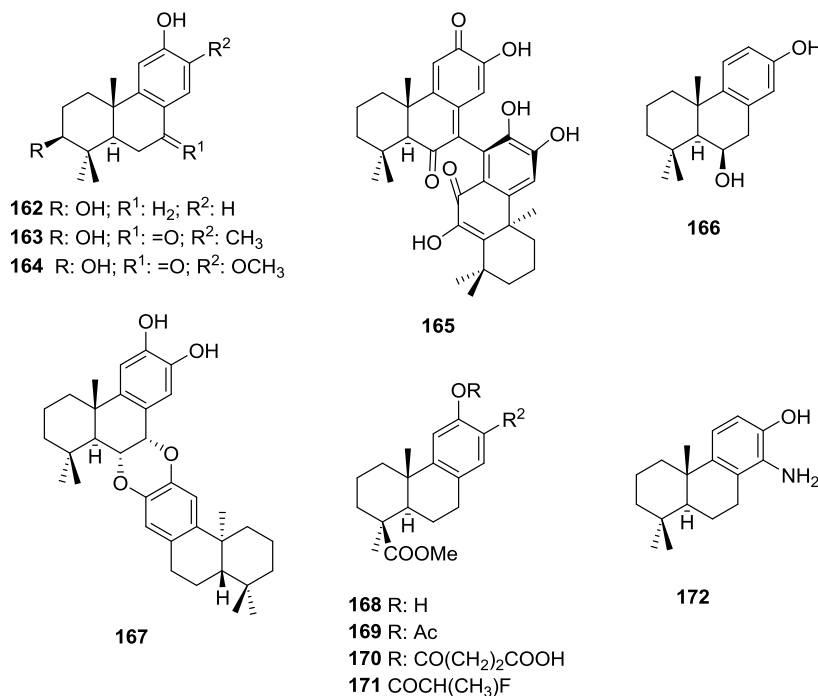


Figura 8. Podocarpanos naturales y sintéticos con actividad biológica.

4-3 Síntesis de podocarpanos.

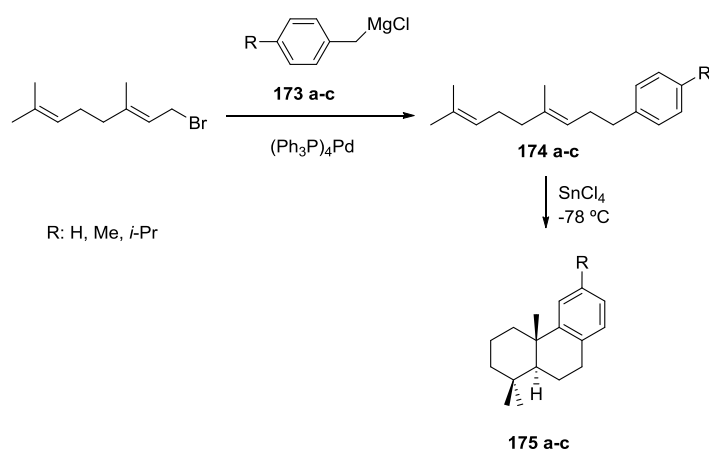
Se han descrito diversos procedimientos para la síntesis de podocarpanos, que incluyen síntesis totales y síntesis a partir de otros terpenoides.

La síntesis total de este tipo de terpenos normalmente implica la ciclación catiónica de arilpoliprenos. Demuth et al describen la elaboración del esqueleto de podocarpano mediante ciclación con SnCl₄ del adecuado aril polipreno, preparado mediante alquilación regioselectiva de un alil haluro con un reactivo de Grignard bencílico, catalizado por Pd. El tratamiento de bromuro de geranilo con el bencilmagnesiano **173a-c**, en presencia de (Ph₃P)₄Pd 5%, proporcionó con completa regioselectividad el aril polipreno **174a-c**, que

¹²⁵ Dang, Z.; Jung, K.; Zhu, L.; Xie, H.; Lee, K.-H.; Chen, C.-H.; Huang, L. *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 355-358.

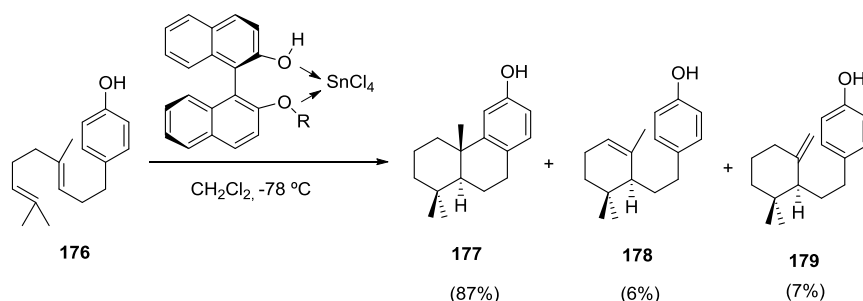
¹²⁶ Oishi, T.; Otsuka, Y.; Limori, T.; Sawada, Y.; Ochi, S. Patent JP 04275247 A 19920930 (1992).

mediante tratamiento con SnCl_4 a baja temperatura rindió el derivado podocarpánico **175a-c** (Esquema 21).¹²⁷



Esquema 21. Síntesis de podocarpanos mediante ciclación de arilpoliprenos.

Yamamoto et al. ha descrito una versión enantioselectiva de esta ciclación de arilpoliprenos, inducida por (*R*)-BINOL-*o*-FBn. SnCl_4 . La ciclación del poliprenilfenol **116** con el LBA quiral (Lewis acid assisted chiral Brønsted acid) proporcionó el podocarpano **177** con un rendimiento del 87%, y un exceso enantiomérico del 38% (Esquema 22).¹²⁸



Esquema 22. Ciclación enantioselectiva de arilpoliprenos.

También se han descrito síntesis enantioespecíficas de podocarpanos, utilizando como precursor ácido podocárpico (**34**),¹²⁹ o ácido abiético (**108**). Nuestro grupo ha desarrollado un procedimiento para elaborar podocarpanos a partir de este último ácido (Esquema 23).¹³⁰ La

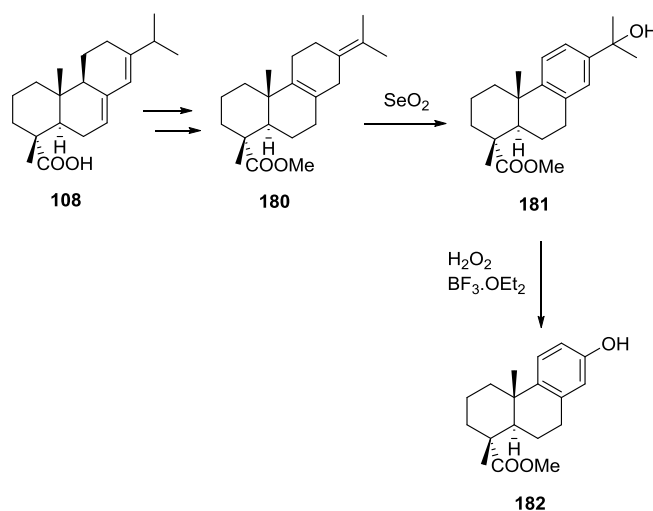
¹²⁷ Rosales, V.; Zambrano, J. L.; Demuth, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 1167-1170.

¹²⁸ Ishihara, K.; Ishibashi, H.; Yamamoto, H. *J. Am. Chem.* **2002**, *124*, 3647-3655.

¹²⁹ Bendall, J. G.; Cambie, R. C.; Rutledge, P. S.; Woodgate, P. I. *Aust. J. Chem.* **1993**, *46*, 1825-1843.

¹³⁰ Alvarez-Manzaneda, E. J.; Chahboun, R.; Guardia, J. J.; Lachkar, M.; Dahdouh, A.; Lara, A.; Messouri, I. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 2577-2580.

etapa clave del proceso es el reordenamiento del hidroperóxido derivado del 15-hidroxiderivado **181**, preparado mediante tratamiento con SeO_2 del dieno **180**, cuya preparación a partir de ácido abiético (**108**) ha sido previamente descrita.¹³¹ El tratamiento del hidroxiéster **181** con H_2O_2 y $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ condujo al podocarpano **182**.

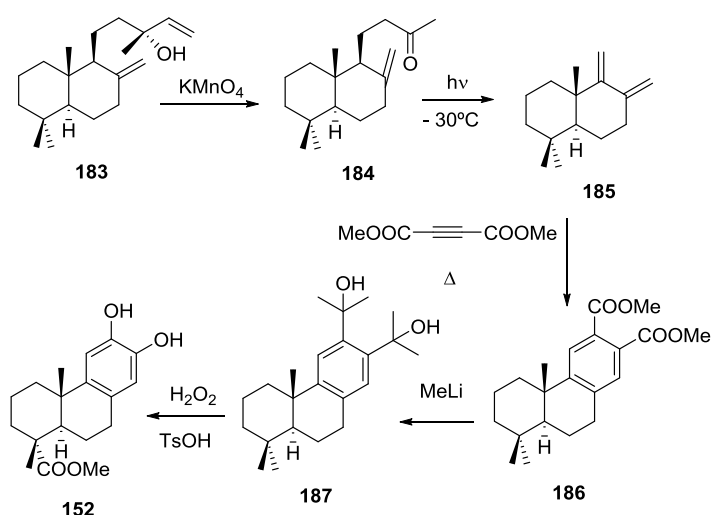


Esquema 23. Síntesis del podocarpano **182** a partir de ácido abiético (**108**).

Asimismo, se han sintetizado podocarpanos a partir de diterpenos labdánicos. Zambrano et al. han descrito una síntesis de nimbidiol (**152**) a partir de manool (**183**) (Esquema 24).¹³² El anillo C de podocarpano se elaboró mediante cicloadición de Diels-Alder del dieno **185** con acetilén dicarboxilato de dimetilo. El compuesto **185** se obtuvo mediante ruptura fotoquímica de la metil cetona **184**, obtenida mediante degradación oxidativa de la cadena lateral del labdano **183**.

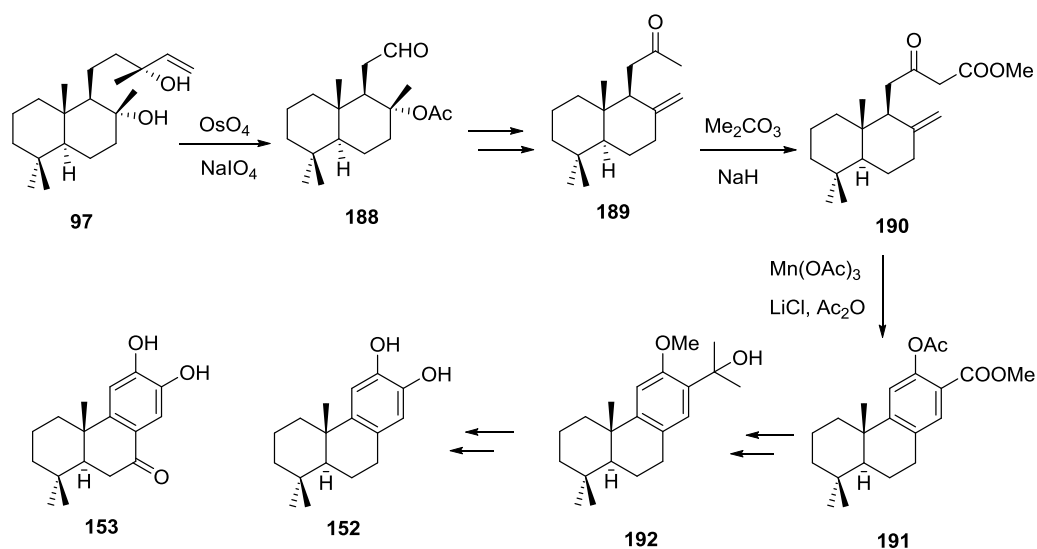
¹³¹ Abad, A.; Arno, M.; Domingo, L.R.; Zaragoza, R. J. *Tetrahedron* **1985**, *41*, 4937-40.

¹³² Zambrano, J. L.; Rosales, V.; Nakano, T. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 1859-1862.



Esquema 24. Síntesis del nimbidiol (**152**) a partir de manool (**183**).

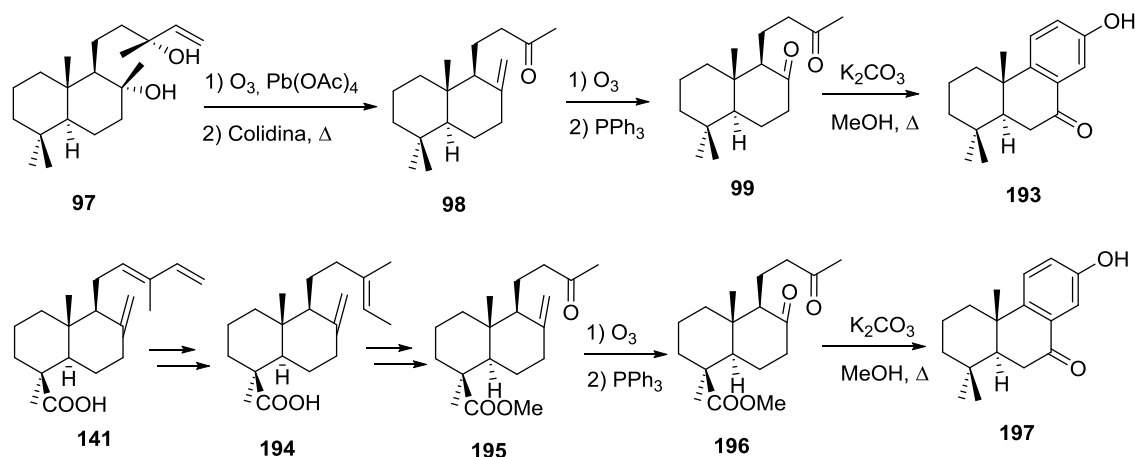
Nuestro grupo de investigación ha desarrollado una síntesis de nimbidiol (**152**) y 7-desoxinimbidiol (**153**), utilizando también el reordenamiento de 15-hidroperóxido de deshidroabietano **192**, a partir de (-)-esclareol (**97**) (Esquema 25).¹³³ El anillo tricíclico de los productos objetivo se elabora mediante ciclación radicalaria del cetoéster **190**, mediante Mn(III) , empleando una estrategia similar a la utilizada en la síntesis de 19-hidroxiferruginol (**125**) y sujikurojin A (**126**) a partir de ácido *trans*-comúnico (**141**) (ver Esquema 20).



Esquema 25. Síntesis del nimbidiol (**152**) y 7-desoxinimbidiol (**153**) a partir de (-)-esclareol (**97**).

¹³³ Alvarez-Manzaneda, E.; Chahboun, R.; Cabrera, E.; Alvarez, E.; Alvarez-Manzaneda, R.; Hmamouchi, M.; Es-Samti, H. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 8930–8934

Otra eficiente estrategia desarrollada en nuestro laboratorio para la creación del esqueleto de podocarpano implica una condensación aldólica intramolecular de la adecuada dicetona, preparada a partir de (-)-esclareol (**97**) o ácido *trans*-comúnico (**141**) (Esquema 26).⁵⁰ La cetona **195** se preparó mediante degradación oxidativa de la cadena lateral del dieno **194**, resultante de la reducción 1,4 del sistema conjugado del ácido **141**.¹³⁴



Esquema 26. Elaboración del esqueleto de podocarpano, *via* dicetonas **99** y **196**, a partir de (-)-esclareol (**97**) y ácido *trans*-comúnico (**141**).

Como se ha indicado con anterioridad, esta estrategia ha sido utilizada posteriormente por otros autores en la síntesis de podocarpanos.^{51,52}

Procesos de obtención de terpenoides funcionalizados en el metilo axial del sistema *gem*-dimetilo

Como se ha puesto de manifiesto en los apartados precedentes, entre los terpenoides naturales de interés merecen ser destacados aquellos que poseen funcionalización en C-4, debido a su actividad biológica. Entre ellos, merecen una atención especial los que presentan funcionalización en el metilo axial, debido a la dificultad de su preparación.

Cabe citar dos procedimientos generales para acceder a este último tipo de sustancias:

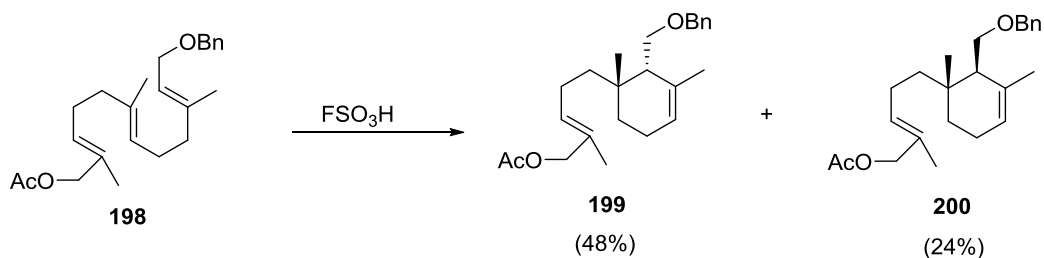
¹³⁴ Barrero, A. F.; Alvarez-Manzaneda, E. J.; Alvarez-Manzaneda, R.; Chahboun, R.; Meneses, R.; Cuerva, J. M.; Aparicio, M.; Romera, J. L. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 647-650.

- a) Procedimientos basados en procesos de ciclación;
- b) Procedimientos a partir de terpenoides funcionalizados en C-4.

5-1 Procedimientos basados en procesos de ciclación:

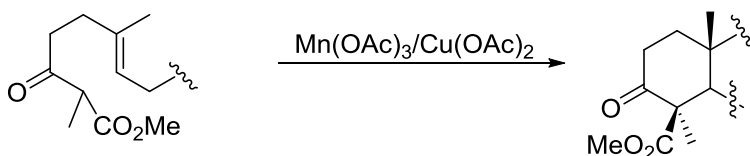
Este tipo de procedimientos resultan poco eficientes, debido al elevado número de etapas, involucradas normalmente en la preparación del producto que se somete a ciclación.

Un ejemplo lo constituye el intento de ciclación biomimética de un derivado del farnesilo **198** mediante ácido fluorosulfónico, que conduce a derivados monocíclicos y no a compuestos con esqueleto de biciclofarnesano (Esquema 27). Este hecho se puede explicar teniendo en cuenta que el grupo acetato que presenta el precursor **198** desactiva el doble enlace adyacente, favoreciendo la protonación en el de la segunda unidad de isopreno, dando lugar a los productos formados.¹³⁵



Esquema 27. Ciclación biomimética del derivado de farnesilo **198**.

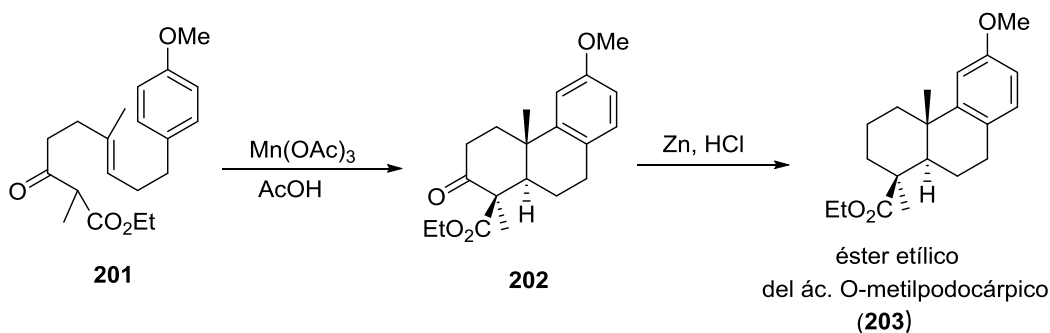
Otros procesos que sí permiten la creación del anillo A, del sistema policíclico deseado, implican la ciclación radicalaria de un adecuado α -cetoéster derivado, mediante el sistema $\text{Mn}(\text{OAc})_3/\text{Cu}(\text{OAc})_2$.



¹³⁵ V., Kulcicki; N., Ungar; P. F., Vlad; M., Cavagnin; F., Castellucci; G., Cimino, *Synthesis*, **1999**, 407 - 409

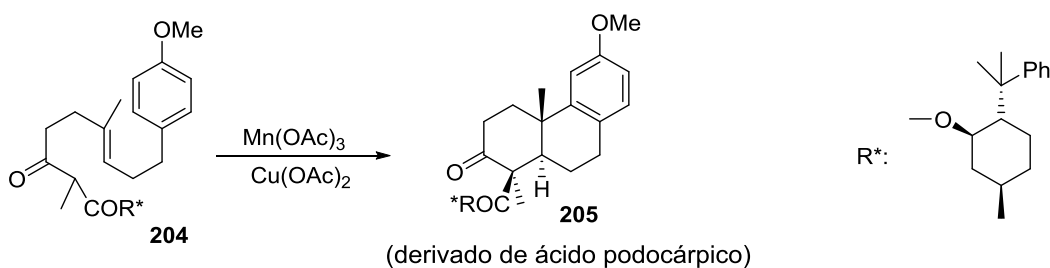
Este proceso implica no menos de 10 etapas para la preparación de cualquier derivado, en forma racémica, ya sea monocíclico, bicíclico u otros.

En 1985, Snider et al, utilizaron esta estrategia para llevar a cabo la síntesis racémica del éster etílico del ácido *O*-metilpodocárpico (**202**) (Esquema 28).¹³⁶



Esquema 28. Síntesis racémica del derivado de ácido podocárpico **203**.

Algunos años después, el mismo grupo de investigación publica la síntesis enantioespecífica del ácido (+)-*O*-metilpodocárpico (**205**, R: OH), usando el (-)-8-fenilmentol como auxiliar quiral (Esquema 29).¹³⁷



Esquema 29. Síntesis enantioespecífica del ácido *O*-metilpodocárpico **203**.

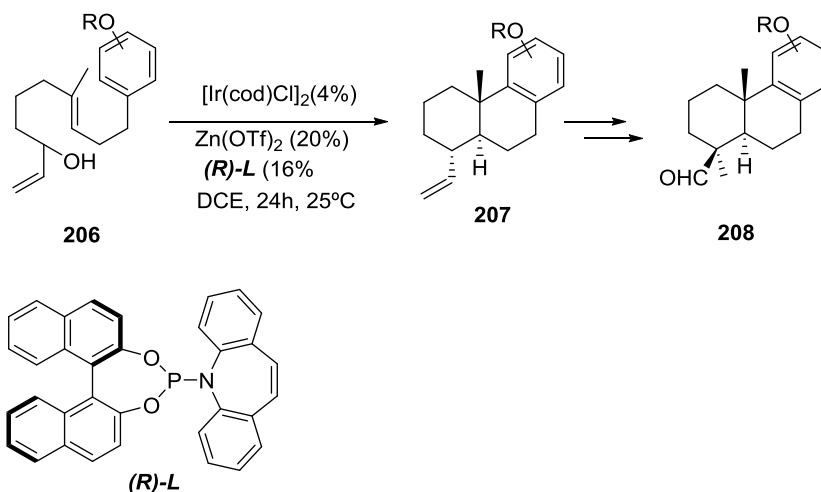
Este proceso también ha sido aplicado para la preparación de intermedios en la síntesis de (+)-triptolida.¹³⁸

¹³⁶ Snider B.B.; Mohan, R.M.; Kates, S.A.; *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 3659-3661.

¹³⁷ Zhang, Q.; Mohan, R.M.; Cook, L.; Kazanis, S.; Preisach, D.; Foxman, B.M.; Snider, B.B. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 7640-7651

¹³⁸ Yang, D.; Xu, M.; *Organic Letters*, **2001**, *3*, 1785-1788

Más recientemente, Carreira y colaboradores han descrito un proceso de policiclización altamente enantioselectivo de un derivado de alcohol alílico **206** mediante tratamiento con un ácido de Lewis en presencia de un catalizador de iridio (Esquema 30).¹³⁹



Esquema 30. Policiclación enantioselectiva del alcohol alílico **206**.

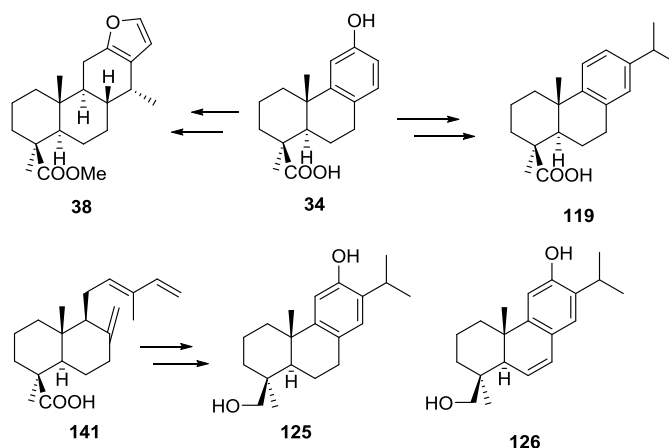
El compuesto **207** es un intermedio adecuado para acceder a los compuestos con el grupo metilo axial funcionalizado, como **208**.

5-2 Procedimientos a partir de terpenoides funcionalizados en C-4.

Como ya se ha indicado con anterioridad, la preparación de terpenoides funcionalizados en el metilo axial del sistema *gem*-dimetilo se puede llevar a cabo, bien utilizando precursores que ya posean esta funcionalización en disposición axial, o a partir de terpenoides que presenten funcionalizado el metilo ecuatorial, tras la correspondiente isomerización.

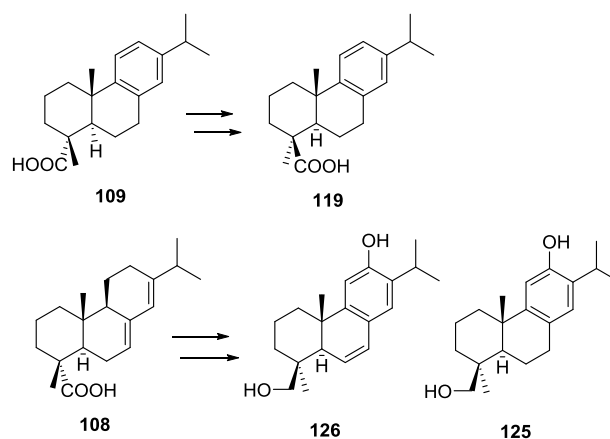
En lo que respecta al primer tipo de transformaciones, se conocen algunos terpenoides naturales funcionalizados en el metilo axial, como el ácido podocárpico (**34**), el ácido calisítrico (**119**) o el ácido *trans*-comúnico (**141**). Ya se han comentado algunos ejemplos de síntesis a partir de estos precursores, como la transformación del ácido podocárpico (**34**) en el cassano **38** (Esquema 5),²⁶ y en el ácido calitrísico (**119**) (Esquema 19),⁹⁹ o del ácido *trans*-comúnico (**141**) en 19-hidroxiferruginol (**125**) y sujikurojin A (**126**) (Esquema 20), desarrollada en nuestro laboratorio (Esquema 31).¹⁰⁰

¹³⁹ Schafroth, M. A.; Sarlah, D.; Krautwald, S.; Carreira, E. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 20276



Esquema 31. Síntesis de cassanones y abietanos a partir de ácido podocárpico (**34**) y ácido *trans*-comúnico (**141**).

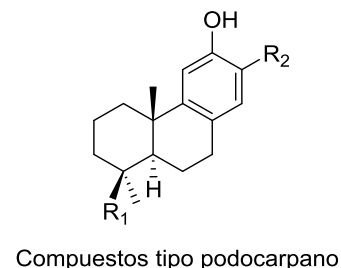
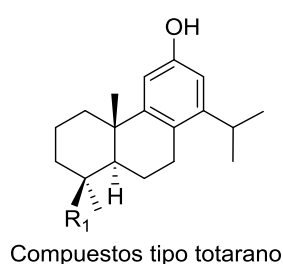
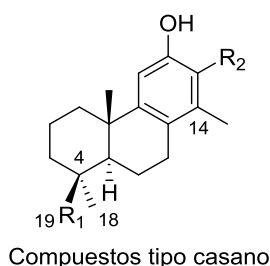
El segundo tipo de transformaciones que permite acceder a terpenoides funcionalizados en el metilo axial, también comentado con anterioridad, implica la isomerización en el C-4 del precursor natural. Ejemplos ilustrativos son la síntesis del ácido calitrísico (**119**) a partir de ácido deshidroabiético (**109**) (Esquema 17),⁹⁶ o la preparación de 19-hidroxiferruginol (**125**) y sujikurojin A (**126**) a partir de ácido abiético (**108**) (Esquema 18), desarrollada previamente por nuestro grupo (Esquema 32).⁹⁷



Esquema 32. Síntesis de abietanos basadas en la isomerización del C-4.

OBJETIVOS

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, se plantea como objetivo principal de la presente tesis doctoral, una nueva ruta sintética común hacia compuestos diterpénicos con esqueleto cassano, totarano y podocarpano funcionalizados en C-19. Este tipo de compuestos son escasos en la naturaleza, en comparación con los funcionalizados en el C-18 o con los que poseen el sistema *gem*-dimetilo. Por lo general, al igual que el resto de terpenoides funcionalizados en ese carbono, estos metabolitos han sido muy poco estudiados, tanto desde el punto de vista sintético como biológico, probablemente debido a la dificultad que entraña dicha funcionalización. Por otra parte, la introducción de cualquier grupo en C-14, esencial para acceder a derivados con esqueleto de cassano y totarano, no resulta sencilla.



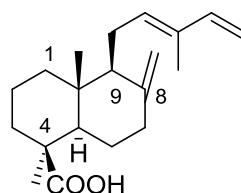
Como ya se puso de manifiesto con anterioridad, existen escasos procedimientos de obtención de este tipo de metabolitos, debido fundamentalmente a la dificultad que supone la funcionalización del metilo axial sobre C-4. Algunos inconvenientes son el elevado número de etapas, algunas de ellas con cierta complejidad, y el consiguiente bajo rendimiento global.

El uso de materiales de partida extraídos de especies vegetales cultivables se ha convertido en una valiosa opción para la obtención de productos con valor añadido. Obviamente, el éxito de esta vía radica en que estos materiales de partida abundan en sus fuentes naturales. Actualmente existe una controversia importante entre los especialistas de este campo de investigación sobre el uso de productos naturales como materias primas. Una revisión de la bibliografía de los últimos años relativa a la síntesis de productos naturales pone de manifiesto las dificultades que atraviesan los investigadores del campo, ya que sus trabajos por lo general son menos valorados, respecto a los que utilizan materias primas procedentes de recursos fósiles. La proliferación de trabajos de investigación que implican metodologías de síntesis es un claro indicio. Sin embargo, el valor

científico de dichas metodologías no se alcanza hasta que se lleva a cabo su aplicación. Por otra parte, resulta llamativo que, aunque todas las directrices sobre síntesis orgánica apuntan hacia criterios de química “verde”, no se valore lo suficiente el uso de materias primas renovables, cuando se trata de realizar síntesis orgánica.

Independientemente del uso de un tipo de materia prima u otra, parece lógico que los procesos que suponen pocas etapas de síntesis, y no requieren uso alguno de grupos protectores, sean un objetivo primordial a perseguir. En este contexto, se plantea alcanzar los objetivos propuestos, utilizando una ruta lo más corta posible, con el uso mínimo de grupos protectores, y utilizando materias primas renovables.

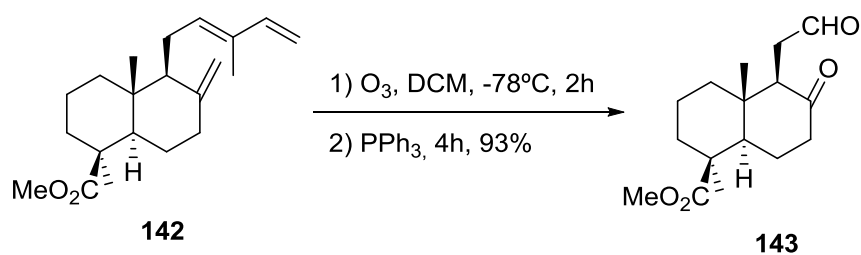
Para lograr este objetivo, se ha elegido como material de partida el ácido *trans*-comúnico (**141**) muy abundante en sus fuentes naturales, de las que se aísla con facilidad. A pesar de todo ello, aún no es comercialmente disponible, probablemente debido a que aún se desconoce su potencial. La estructura del ácido *trans*-comúnico (**141**) se compone por un sistema *trans*-decalínico funcionalizado en el metilo axial situado en C-4, un doble enlace exocíclico en C-8 y una cadena lateral, que contiene un sistema diénico situada, C-9.



Ácido *trans*-comúnico (**141**)

La presencia de estos dobles enlaces en su esqueleto carbonado resulta clave para su transformación en precursores versátiles. Sin embargo, es bien conocida la dificultad de transformar este material de partida. La elevada reactividad de las olefinas hace difícil llevar a cabo reacciones selectivas, que permitan el desarrollo de síntesis eficientes de moléculas con potenciales aplicaciones. En este sentido, nuestro grupo de investigación viene realizando durante los últimos años grandes esfuerzos, siendo la síntesis del meroxet un ejemplo representativo de la importancia de este material de partida. Recientemente nuestro grupo de investigación desarrolló la primera ruta selectiva hacia la obtención de precursores drimánicos funcionalizados en el metilo axial del sistema gem-dimetilo; sin embargo, el potencial de estos precursores está aún por explotar. Entre los múltiples estudios sintéticos realizados sobre el éster metílico del ácido *trans*-

comúnico (**142**), destaca la reacción de ozonólisis que proporciona, con un rendimiento muy elevado, el cetoaldehído **143** como único producto de reacción.



Sin embargo, este compuesto tan interesante no ha sido explotado aún. En la presente Tesis Doctoral se plantea el uso de este intermedio para alcanzar el objetivo principal de la misma. Otro objetivo importante comprende la evaluación de la actividad antitumoral “in vitro” de los principales compuestos obtenidos.

RESULTADOS Y DISCUSION

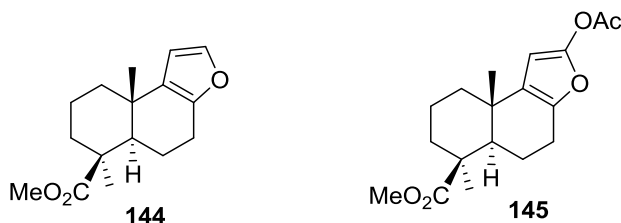
Extracción del ácido *trans*-comúnico (141)

El ácido *trans*-comúnico (**141**) es un diterpeno bicíclico natural, con esqueleto labdánico, muy abundante en la familia de las cupresáceas (*Cupresaceae*), y que se encuentra especialmente en los géneros *Juniperus* (enebros) y *Cupressus* (cipreses).

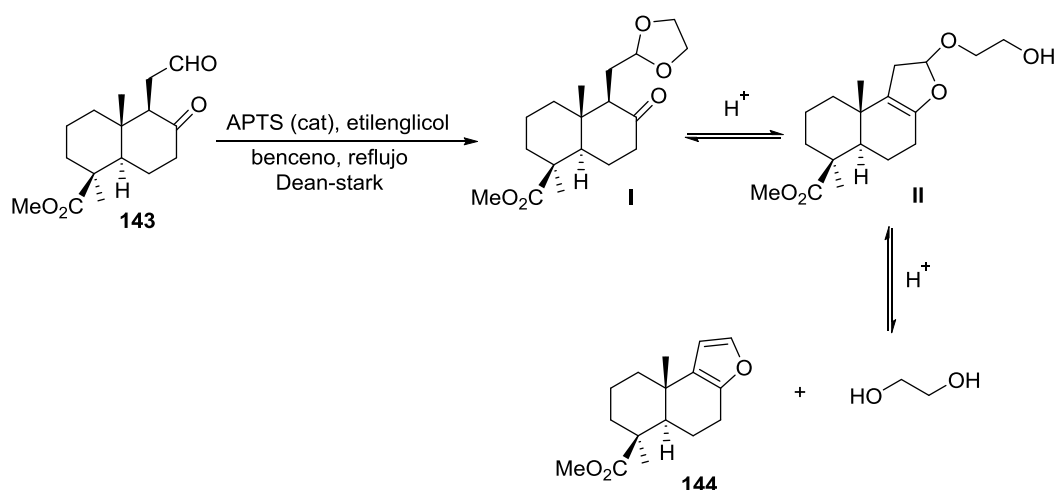
Nuestro grupo de investigación realizó un estudio detallado sobre la extracción del ácido *trans*-comúnico (**141**), encontrando que dicho ácido se encuentra en altas proporciones (2.3% del peso en planta) en los frutos del ciprés mediterráneo (*Cupressus sempervirens*).

Preparación de los dienos **144** y **145** a partir del cetoaldehído **143**

Como se recoge arriba, la reacción de ozonólisis a -78°C del éster metílico del ácido *trans*-comúnico (**142**), conduce al cetoaldehído **143** con un rendimiento elevado. Con objeto de aplicar este compuesto a la síntesis de diterpenos bioactivos, se plantea su transformación en los derivados furánicos **144** y **145**.



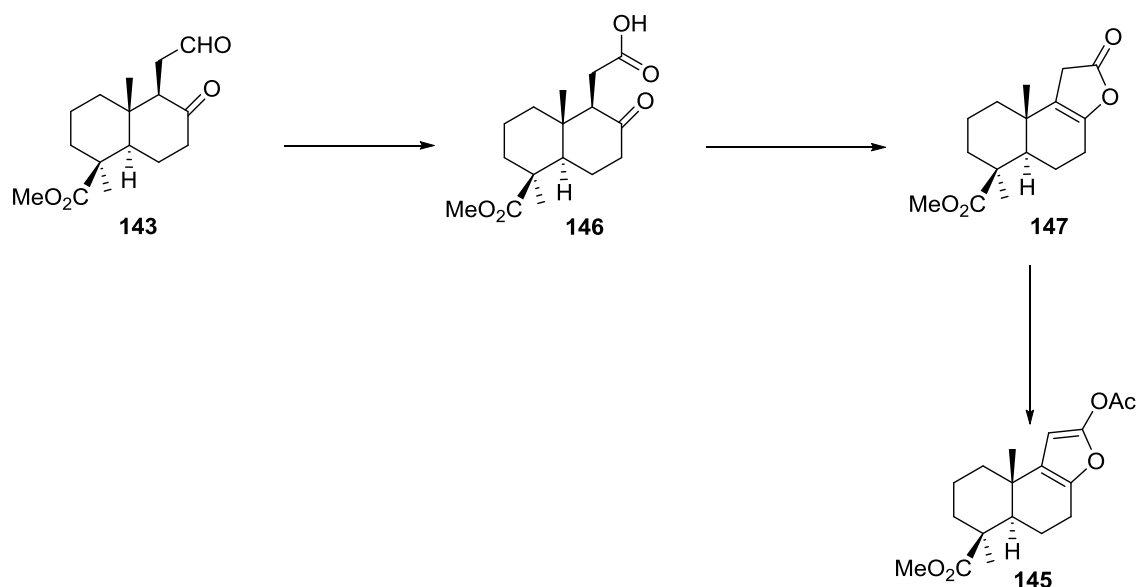
La elaboración del anillo furánico de **144** se ha llevado a cabo sometiendo el cetoaldehído **143** a diferentes condiciones de deshidratación, utilizando ácidos, como Amberlyst A-15 y ácido p-toluensulfónico (APTS), en DCM, MeOH o benceno. El mejor resultado se consiguió mediante el uso de APTS en benceno en presencia de etilenglicol. Cabe señalar que, en ausencia de etilenglicol, la formación del furano **144** no tiene lugar, por lo que se postula que la reacción transcurre vía el intermedio **I** (Esquema 33)



Esquema 33. Síntesis del furano **144** a partir del cetoaldehído **143**.

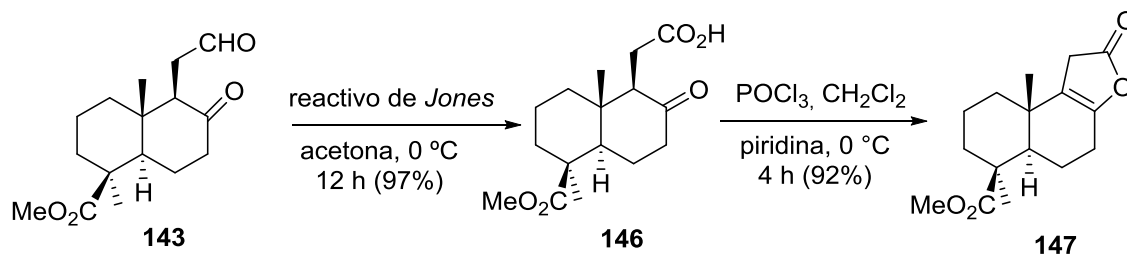
El furano **144** se identificó en base a sus datos espectroscópicos. En su espectro de RMN de protones destacan las señales olefínicas a 6.18 y 7.20 ppm, que corresponden a los dos protones del anillo furánico mientras que en su espectro de RMN de ^{13}C se identifican las cuatro señales 107.3 (CH), 128.7 (C), 140.7 y 148.7 (C) correspondientes a dicho anillo.

Por su parte, el acetoxifurano **145**, se preparó siguiendo el esquema sintético siguiente.



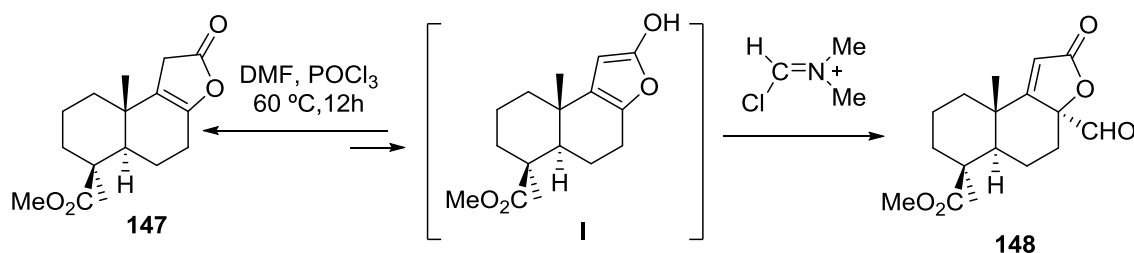
Esquema 34. Síntesis del furano **145** a partir del cetoaldehído **143**.

Así el cetoaldehído **143**, mediante tratamiento con el reactivo de Jones, se transformó en el cetoácido **146**. Éste mediante reacción con oxiclорuro de fósforo conduce, con elevado rendimiento, al enol lactona **147**.

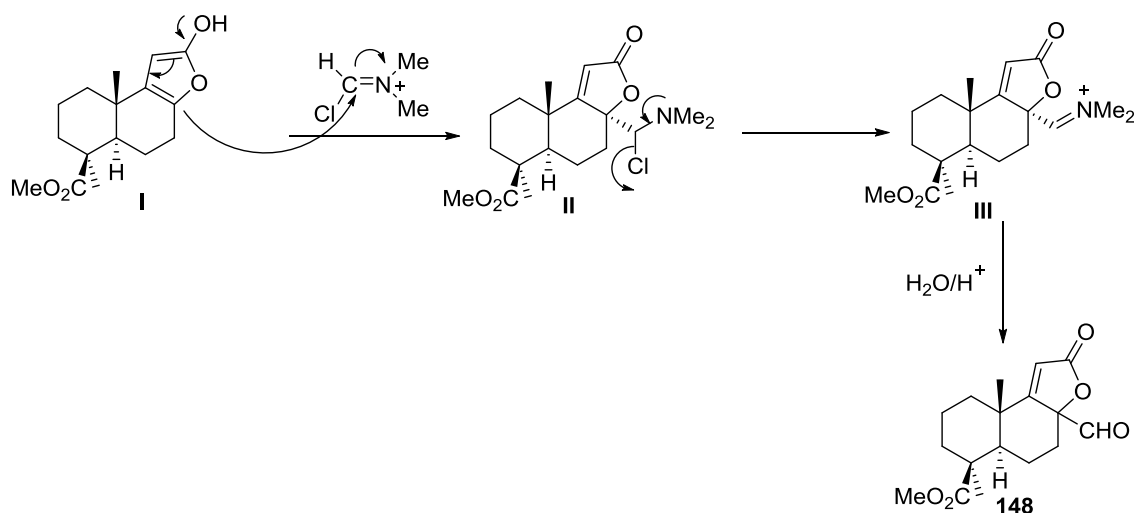


La lactona **147** se identificó mediante su datos de IR, ^1H y ^{13}C NMR y HRMS. En el espectro de IR se observa la desaparición de la banda correspondiente al OH del grupo carboxílico, mientras que en el espectro de ^{13}C NMR se aprecian dos señales a 120.6 y 148.5 ppm, del doble enlace carbono-carbono.

Por otra parte, cuando la reacción se lleva a cabo con el sistema POCl_3/DMF , se obtiene sorprendentemente como único producto de reacción el aldehído **148**, después de calentar durante 12 horas a $60\text{ }^\circ\text{C}$ una solución de **147** en DMF y POCl_3 .

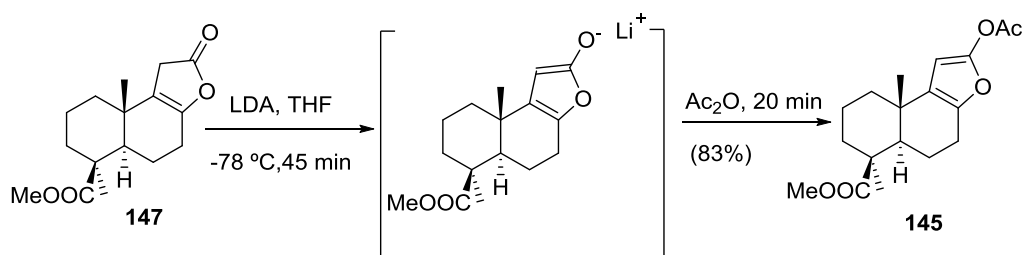


La formación de este aldehído **148** puede explicarse mediante un mecanismo similar al de la reacción de Vilsmeier-Haack. Probablemente el medio ácido de la reacción favorece la formación del intermedio hidroxifuránico **I**, que experimenta una reacción de formilación, tal como se muestra en el Esquema 35.



Esquema 35. Posible mecanismo de formación del aldehído **148**.

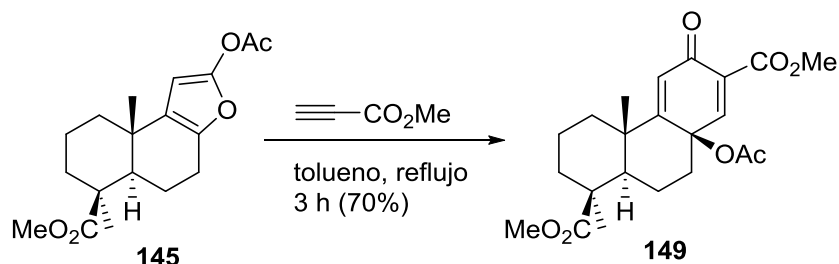
A continuación, la lactona **147** se convirtió en el acetoxifurano **145**, mediante tratamiento con LDA en THF a -78°C y posterior adición de Ac₂O.



Preparación de compuestos con esqueleto de podocarpano, totarano y cassano, a partir de los furanos **144 y **145**.**

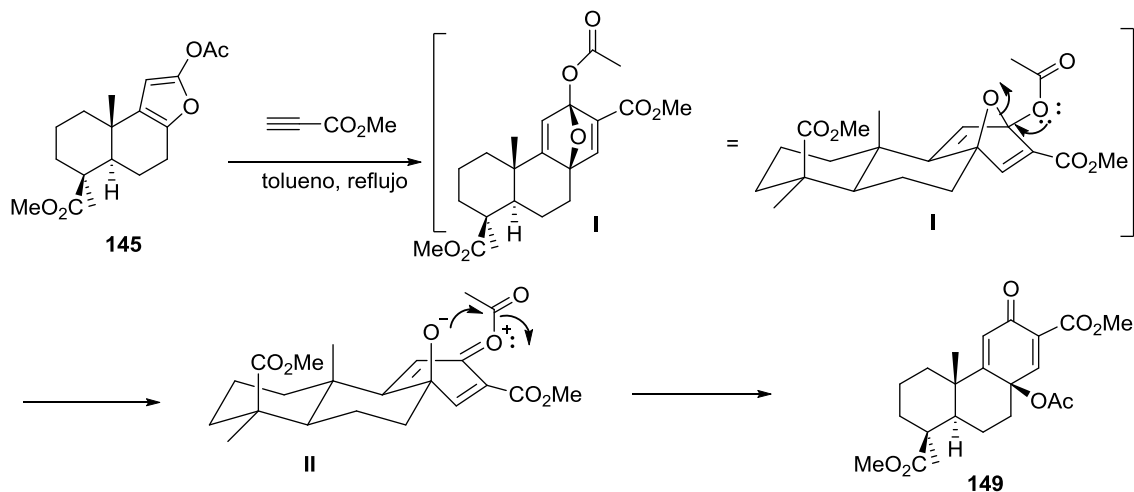
Una vez obtenidos los furanos **144** y **145**, se ha llevado a cabo el estudio de la reacción de cicloadición de Diels-Alder de estos dienos con diferentes dienófilos, con objeto de formar el anillo aromático característico de las moléculas objetivo. Los resultados más importantes se recogen a continuación.

Cuando se calienta a reflujo una disolución concentrada del furano **145** en tolueno en presencia de 2 eq. de propiolato de metilo durante 3h., se obtiene directamente la acetoxidienona **149** con un rendimiento del 70%.



La dienona **149** se identificó fundamentalmente en base a sus espectros de Masas y de RMN de ^{13}C . El espectro de masas de alta resolución de **149** presenta un pico molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ a m/z 405.1913, que concuerda con la fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{O}_7$. Las señales a 110.4 (C), 127.7 (CH), 150.8 (C) y 153.8 (CH), que corresponden a los dos dobles enlaces carbono-carbono, junto con las señales a 163.1 (C), 168.7 (C), 171.3 (C), 177.4 (C), debidas a los cuatro grupos carbonilos de la molécula, confirman la estructura propuesta.

La formación directa de la acetoxicetona **149** cabe atribuirle a la alta inestabilidad del aducto **I** de la reacción de cicloadición, que evoluciona a través del intermedio **II** hacia el compuesto **149**. La formación de este único producto pone de manifiesto que la reacción de cicloadición de Diels-Alder transcurre con total regio- y estereoselectividad. La disposición del grupo acetoxi se puede explicar mediante la propuesta mecanística que se muestra a continuación.

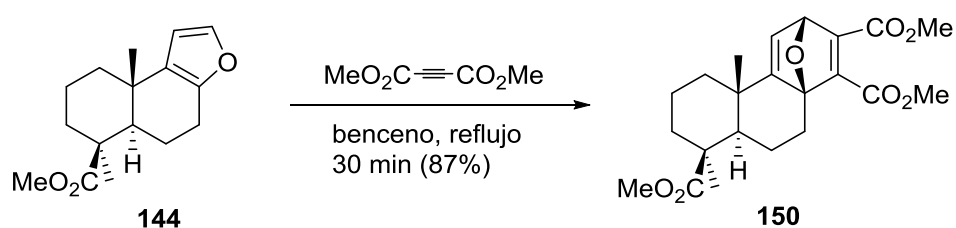


Esquema 36. Mecanismo de formación de la acetoxidienona **149**.

La acetoxidienona **149** presenta gran similitud estructural con dienonas naturales con esqueleto abietano, lo que le convierte en un precursor sintético apropiado para la síntesis de esos derivados.

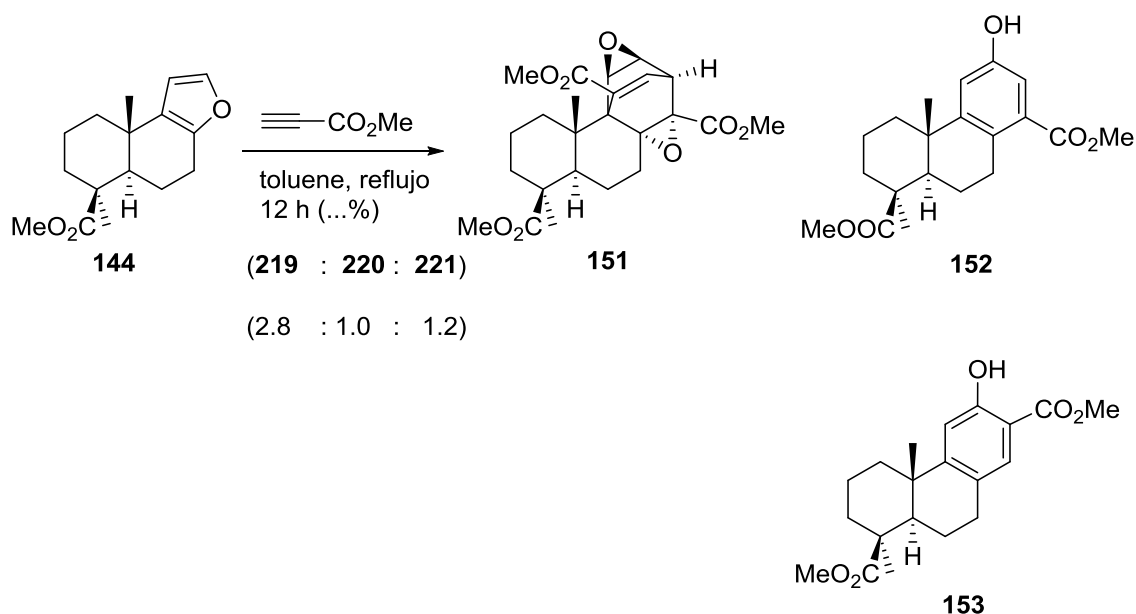
Por otra parte, el dieno furánico **144** se sometió bajo las mismas condiciones anteriores a la reacción con dos dienófilos diferentes: el acetilendicarboxilato de dimetilo (DMAD) y el propiolato de metilo, con resultados bien distintos.

La reacción con el DMAD proporcionó el aducto **150**, esperado de una reacción de cicloadición de Diels-Alder (Esquema 37).



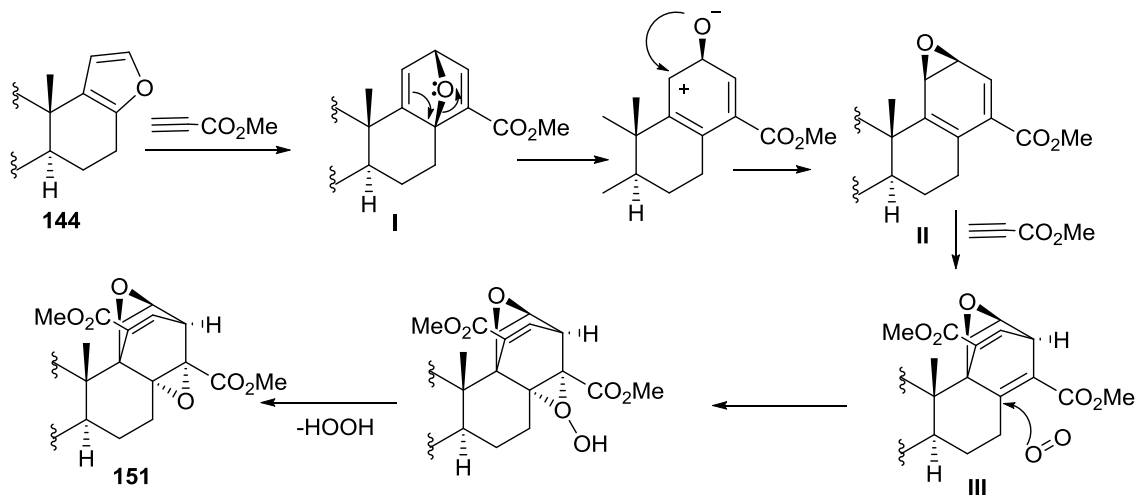
Esquema 37. Cicloadición de Diels-Alder del furano **144** con acetilendicarboxilato de dimetilo.

En cambio, la reacción con propiolato de metilo, bajo la mismas condiciones, dio lugar a una mezcla de tres productos **151**, **152** y **153** en proporción de 2.8: 1: 1.2.



El compuesto **151** se ha identificado en base a sus espectros de RMN de ^1H y de ^{13}C , así como a otros espectros de RMN 1D y 2D (TOCSY, HSQC, HMBC y NOESY).

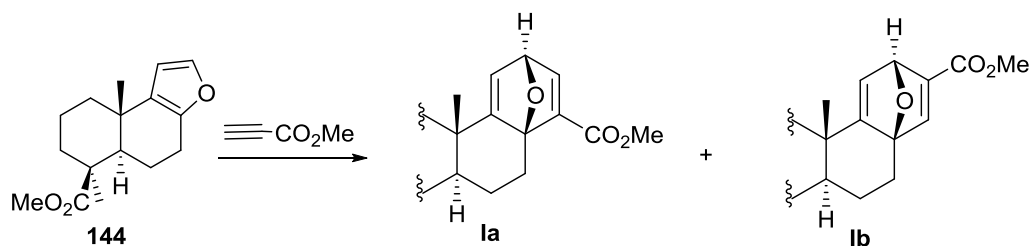
El esquema 38 recoge una propuesta mecanística para la formación de **151**.



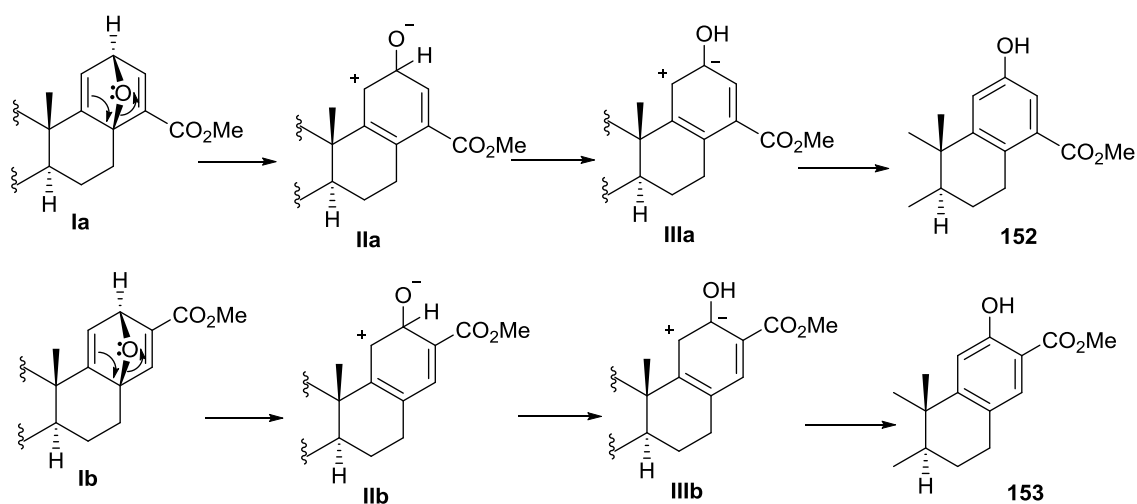
Esquema 38. Mecanismo propuesto para la formación del diepóxido **151**.

La apertura del anillo 8,12-epoxi del intermedio **I** provoca la formación del epoxidieno **II**, que sufre una nueva reacción de Diels-Alder, que conduce al aducto intermedio **III**, que sufre oxidación por oxígeno atmosférico, proporcionando el compuesto **151**.

Por su parte, los fenoles **152** y **153** se forman vía los intermedios **Ia** y **Ib**, respectivamente.



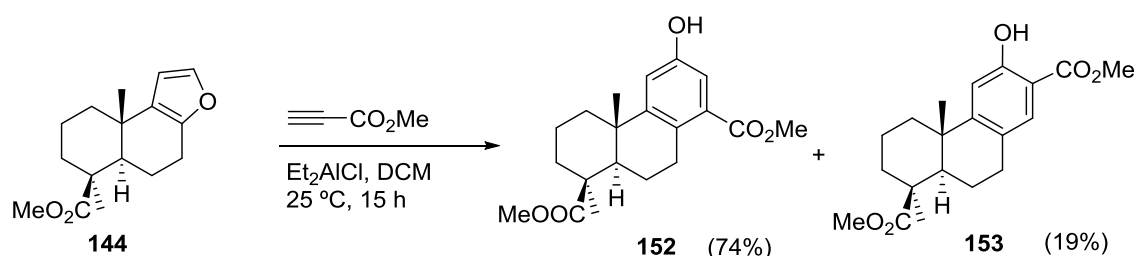
Estos dos intermedios sufren un reordenamiento que conduce a la formación de los dos fenoles (Esquema 39).



Esquema 39. Formación de los fenoles **152** y **153** a partir de los cicloadductos **Ia** y **Ib**, respectivamente.

La estructura de los compuestos **152** y **153** se establece en base a experimentos de RMN 1D y 2D (TOCSY, HSQC, HMBC y NOESY) realizados a 600 y 500 MHz respectivamente. La difracción de RX de cristales de **152** confirma inequívocamente su estructura.

Con objeto de optimizar el rendimiento en los derivados fenólicos **152** y **153**, precursores adecuados de los terpenoides objetivo, se investigaron otras condiciones de reacción para la cicloadición de Diels-Alder, como el uso de ácidos de Lewis. Cuando la reacción se llevó a cabo en presencia de 1.5 equivalentes de Et_2AlCl , utilizando diclorometano como disolvente, y tras 15h de reacción a temperatura ambiente, se obtuvieron como únicos productos de reacción, los dos fenoles **152** (74%) y **153** (19%).

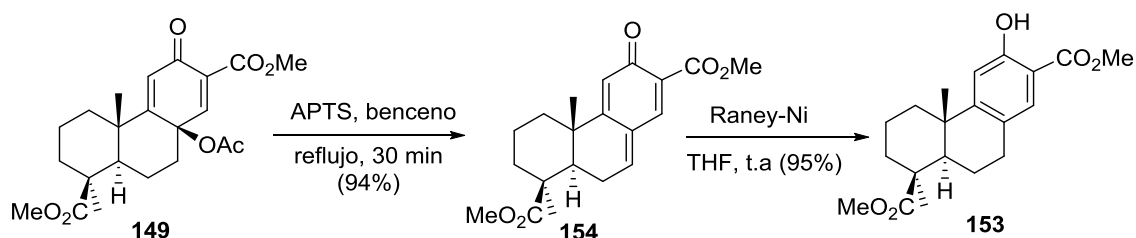


Aplicación de los fenoles **152** y **153** a la síntesis de diterpenos naturales

4-1 Síntesis de nuevos compuestos con esqueleto podocarpano a partir del fenol **153**.

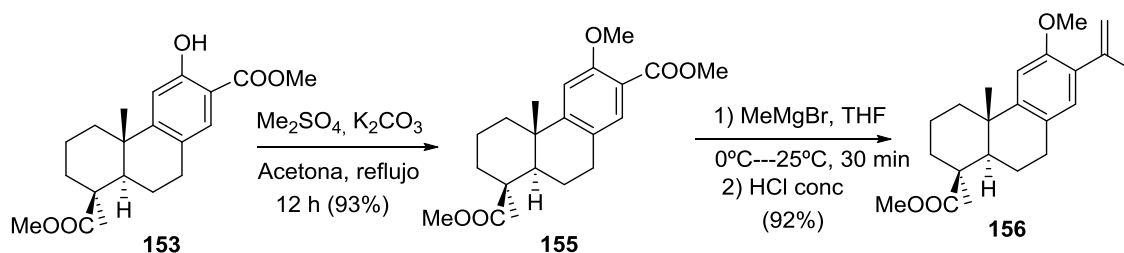
La obtención del fenol **153**, con una estructura cercana a la de podocarpanos naturales y otros diterpenos, nos llevó a aplicarlo a la síntesis de nuevos podocarpanos con interés biológico, como es el caso de la metilcetona **159**.

Dado que la obtención de este fenol a partir del furano **144** transcurre con bajo rendimiento, y acompañado del fenol **152** mayoritario, se planteó su preparación a partir de la acetoxidienona **149**. Así, la eliminación de ácido acético mediante tratamiento con APTS y subsiguiente reducción con Raney-Niquel de la trienona **154** resultante, proporcionó el fenol **153** con un rendimiento global del 89%.

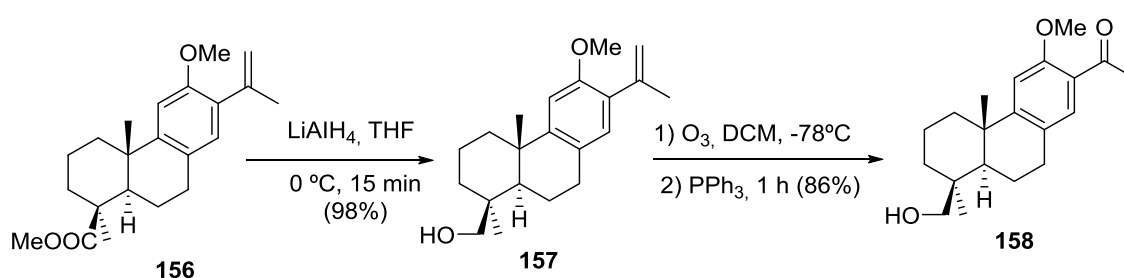


Una vez, optimizado el rendimiento del fenol **153**, se procedió a su transformación en el podocarpano natural **159**, utilizando una secuencia de cinco etapas.

En primer lugar se protegió el hidroxilo fenólico en forma de metiléter, mediante tratamiento con K₂CO₃/Me₂SO₄, proporcionando el compuesto **155** con un rendimiento del 93%. La siguiente etapa de la secuencia implica una reacción de adición nucleofílica de bromuro de metilmagnesio sobre el grupo éster aromático. Esta reacción se llevó a cabo a 0 °C, dejando evolucionar hasta temperatura ambiente, durante 30min. La adición de HCl concentrado para detener esta reacción, provoca la deshidratación del alcohol terciario, generando así el compuesto **156**, con un rendimiento global del 85% a partir del fenol **153**.



La reducción del grupo éster metílico mediante LiAlH_4 genera el alcohol **157**, que se transformó en la metil cetona **158**, tras una reacción de degradación oxidativa de su doble enlace mediante ozonólisis reductora.



Por último, la reacción de desprotección del hidroxilo fenólico mediante tribromuro de aluminio, en diclorometano a temperatura ambiente, proporcionó el podocarpano natural **159** con un rendimiento del 88%.

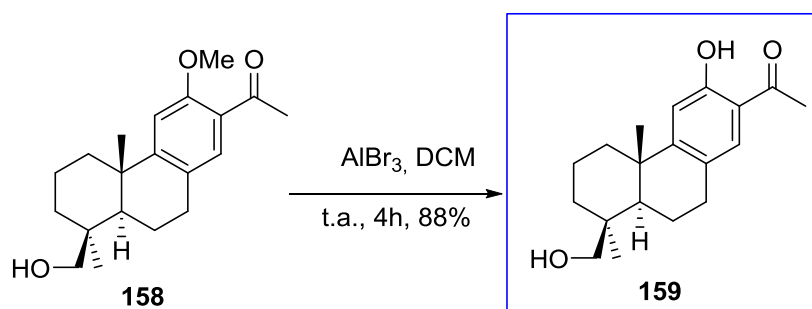


Tabla-1: Comparación de los datos de RMN- ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **159** natural y sintético

	159 natural	159 sintético
1	2.26 (m) y 1.41 (m)	2.27 (d, $J=12.5$) y 1.41 (m)
2	1.71 (m) y 1.63 (m)	1.71 (m) y 1.63 (m)

3	1.91 (m) y 1.02 (m)	
5	1.45 (dd, J= 12.9, 1.8)	
6	2.04 (m) y 1.99 (m)	
7	2.89 (m) y 2.81 (m)	2.91 (dd, J= 17.7, 6.4) y 2.78 (m)
11	6.86 (s)	6.87 (s)
14	7.39 (s)	7.38 (s)
18	1.06 (s)	1.06 (s)
19	3.84 d(J= 10.8), 3.54 d(J= 10.8)	3.84 d(J= 10.9), 3.56 d(J= 10.9)
20	1.17 (s)	1.17 (s)
C OMe	2.58 (s)	2.58 (s)

Tabla-2: comparación de los datos de RMN-¹³C (125 MHz, CDCl₃) de **159** natural y sintético

	159 natural	159 sintético
1	38.7	38.5
2	19.1	18.8
3	35.3	35.1
4	39.0	38.8
5	50.8	50.6
6	19.4	19.1
7	30.2	29.5
8	126.0	125.8
9	159.8	159.6
10	38.8	38.6
11	113.9	113.7
12	160.4	160.1
13	118.1	117.9
14	131.2	130.9
18	27.0	27.0

19	65.5	65.3
20	25.4	25.2
C	204.0 y 26.6	203.8 y 26.8
OMe		

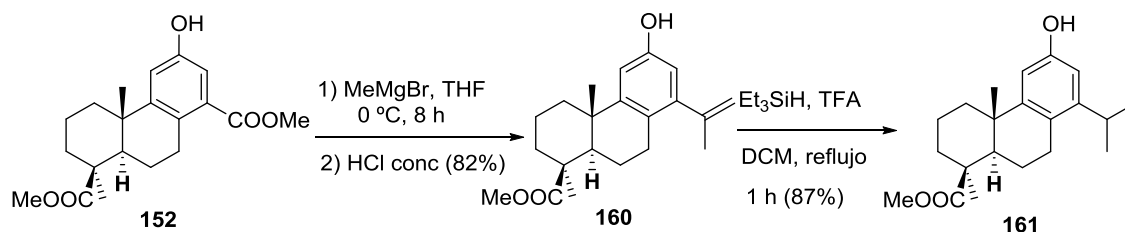
Como puede apreciarse en las Tablas 1 y 2, hay una buena concordancia entre los datos de RMN del producto natural y del sintetizado en nuestro laboratorio.

En resumen, se ha llevado la primera síntesis de 12,19-dihidroxi-13-acetil-8,11,13-podocarpatrieno (**159**), un podocarpano aislado recientemente de la especie botánica *Gaultheria yunnanensis*.¹⁴⁰

4-2 Obtención de terpenos con esqueleto totarano a partir del fenol **152**.

Como se ha visto con anterioridad, la reacción de cicloadición de Diels- Alder del furano **144** con propiolato de metilo, en presencia de cloruro de dietilaluminio, procede con elevada regioselectividad, proporcionando con buen rendimiento el fenol **152**, que poseen un potencial enorme como precursor, tanto de totaranos como de cassanos.

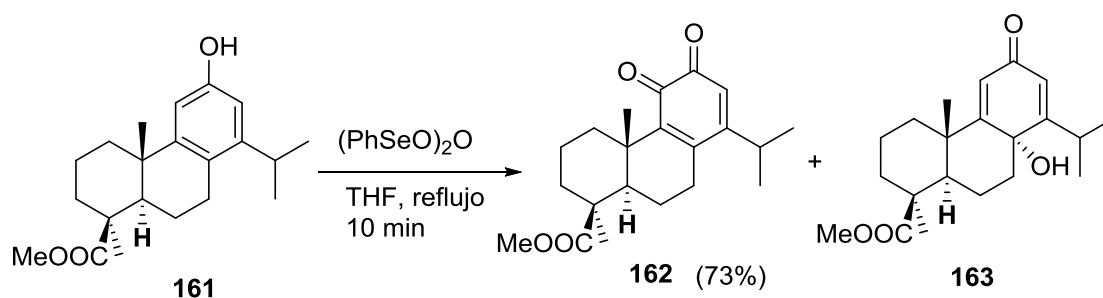
Inicialmente se abordó la preparación de derivados con esqueleto totarano. Para ello, en primer lugar se transformó el grupo éster aromático del fenol **152** en grupo isopropilén, mediante tratamiento con un exceso de bromuro de metilmagnesio y posterior deshidratación del alcohol terciario resultante, tras adición de HCl concentrado. El fenol **160** resultante se redujo mediante tratamiento con el sistema TFA/Et₃SiH, para dar lugar al derivado totarano **161**, con un rendimiento global del 71%.



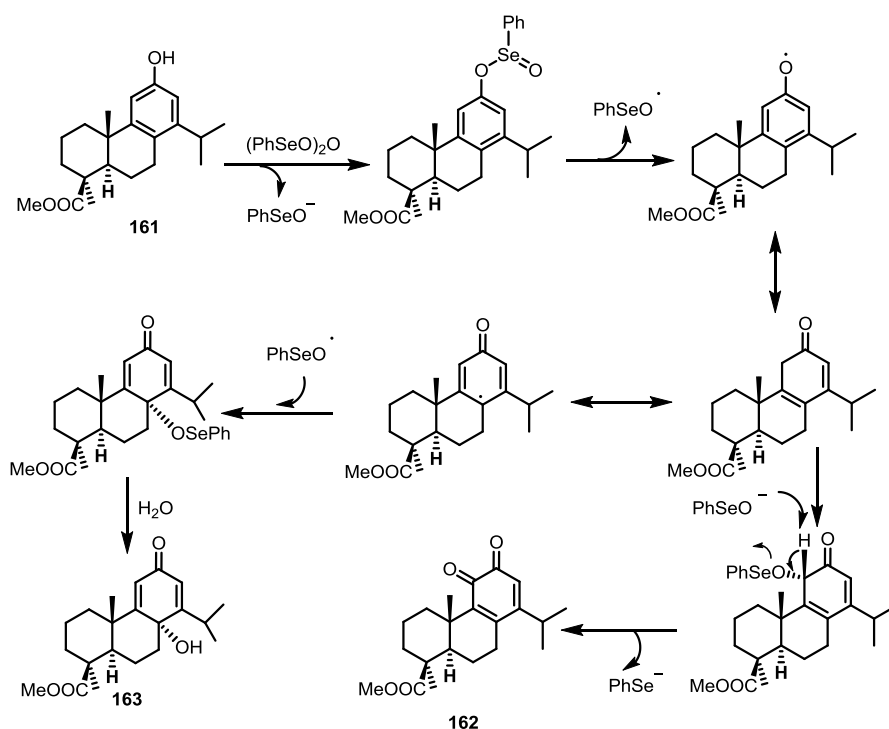
Dada la comprobada actividad antitumoral que suelen exhibir las quinonas, se abordó la preparación de derivados de totarano resultantes de la oxidación del fenol **161**. Para ello, se

¹⁴⁰Gao, Y.-P., She, Y.-H Xu, X.-KTian, . J.-M., Zeng, H.-W S. Lin, C.-M. Liu, Zhang, W.- D. *Phytochem. Lett.* **2014**, 8, 6-9.

sometió a éste a tratamiento con $(\text{PhSeO})_2\text{O}$, obteniéndose la orto-quinona **162** (73%) y la hidroxidienona **163**, como producto minoritario (20%).

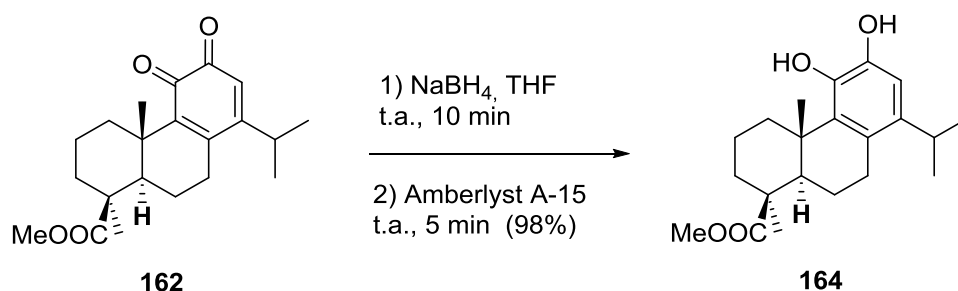


El mecanismo probable de la reacción se muestra a continuación. Se postula que en la reacción se forma el radical fenoxi que provoca la adición del radical fenilselenoxi, tanto en el carbono *orto*, menos impedido, como en la en el carbono *para*. Estos dos intermedios evolucionan hacia las dos quinonas formadas (Esquema 40).



Esquema 40. Mecanismo propuesto para la formación de los compuestos **162** y **163**.

Por último, la reducción de **162** con borohidruro sódico en THF y subsiguiente acidificación mediante resina catiónica Amberlyst A-15 proporciona el catecol **164** con un rendimiento del 98%

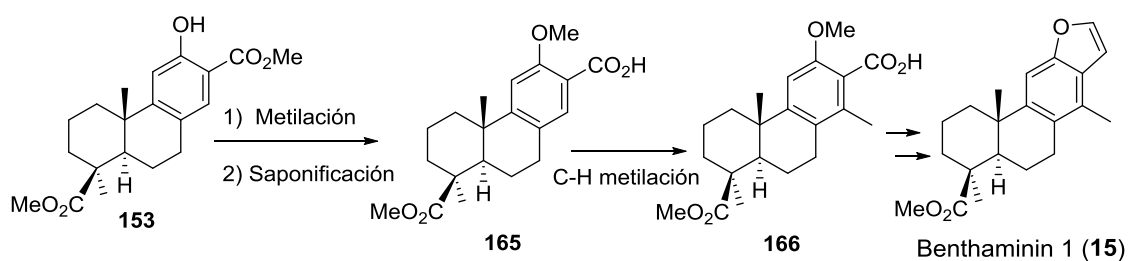


4-3 Aproximación a la síntesis de cassanos a partir del fenol 153.

En una primera aproximación se postula como intermedio clave el ácido **166**, para acceder a compuestos diterpénicos con esqueleto cassano. La estrategia elegida se basó en trabajos previos de nuestro grupo de investigación sobre la síntesis de hongoquercina A, en que se utilizó el método de Baran y colaboradores¹⁴¹ para funcionalizar el enlace C-H situado en posición orto respecto al grupo ácido carboxílico aromático.

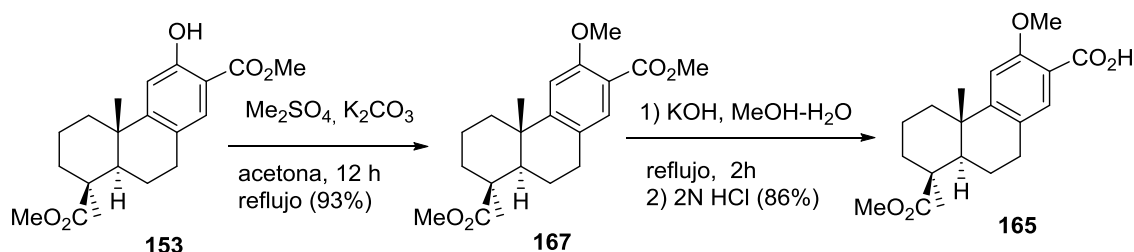
Para llevar a cabo esta vía de síntesis, se utilizó una secuencia sintética que consta de tres etapas :

- En la primera, se protege el grupo fenólico en forma de metiléter.
- La segunda etapa implicaría una reacción de saponificación del grupo ester metílico aromático.
- Y por último, se introduciría el grupo metilo en C-14, siguiendo el proceso de Baran, para aproximarse a la síntesis de compuestos con esqueleto cassano.

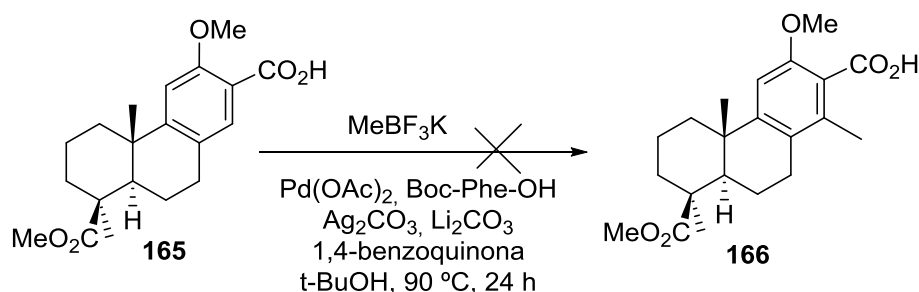


¹⁴¹ Rosen, B.; Simke, L. R.; Thuy-Boun, P. S.; Dixon, D. D.; Yu, J. D.; Baran, P. S. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2013**, *52*, 7317-7320

Así, el fenol **153** se metiló mediante reacción con K_2CO_3/Me_2SO_4 , dando lugar al compuesto **167**, que se somete a calentamiento a reflujo con $KOH/MeOH$, en presencia de agua, experimentando la aponificación selectiva del grupo ester metílico aromático, rindiendo el ácido **165**, tras acidificación con una solución 2N de HCl .



Una vez preparado el ácido **165**, se ensayó la reacción de C-H metilación, clave en el diseño de la ruta elegida. Sin embargo, todos los intentos efectuados, variando el porcentaje del acetato de paladio - temperatura de reacción - equivalentes de $MeBF_3K$ o Ag_2CO_3 junto a Li_2CO_3 y benzoquinona, resultaron infructuosos, recuperándose, en todo los casos, el ácido **165** de partida inalterado, después de acidular la mezcla de reacción con una solución de HCl (1N). Parece obvio que los efectos estéricos ejercidos sobre el C-14 sean la verdadera causa de la gran estabilidad de **165** frente a estas condiciones.



En este sentido, conviene señalar que, recientemente, Pitsinos et al., en su empeño de preparar taepenina D (**12**), y compuestos relacionados, para explorar su potencial medicinal, desarrollaron una ruta sintética a partir del ácido abiético. Sin embargo, estos autores obtuvieron el compuesto 14-desmetil derivado de la taepenina D (**12**), probablemente debido a las dificultades que se ponen de manifiesto en los intentos de la reacción de metilación directa del ácido carboxílico **165**.

Ante el fracaso de los intentos de obtención del esqueleto cassano, a partir del ácido **165** por la vía directa, se planteó el uso del fenol **152** como intermedio clave para la segunda

estrategia hacia la síntesis de *benthaminin 1* (**15**) (Esquema 41). El esquema sintético propuesto implicaría 5 etapas de síntesis:

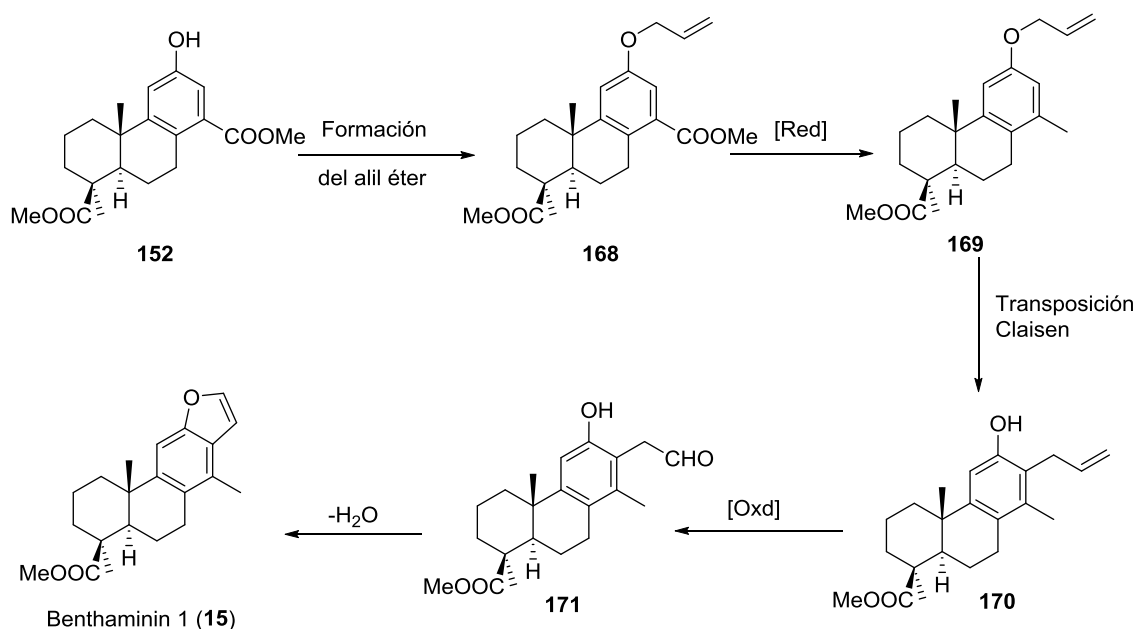
1ª. Formación del aliléter.

2ª. Reducción selectiva del grupo metiléster aromático, via el correspondiente alcohol bencílico intermedio.

3ª. Transposición de Claisen del grupo alílo.

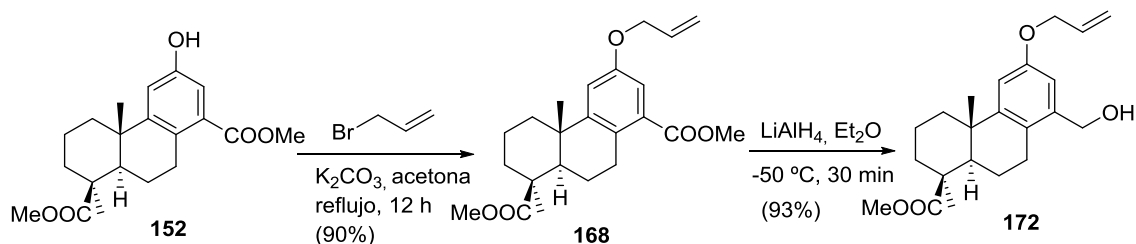
4ª. Oxidación del doble enlace, y

5ª Reacción de deshidratación del correspondiente lactol.

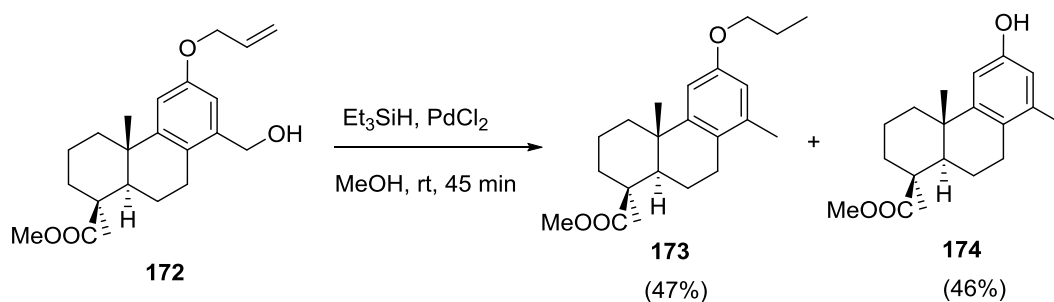


Esquema 41. Planteamiento sintético de *benthaminin 1* (**15**) a partir del fenol **152**.

De acuerdo con el planteamiento propuesto, se trató el fenol **152** con bromuro de alilo, en presencia de K_2CO_3 , en acetona a reflujo, rindiendo el alil éter **168** con un 90% de rendimiento. La reducción selectiva del grupo metil éster aromático hasta grupo metilo se planteó en dos etapas. En primer lugar, se preparó el alcohol **170** mediante reducción selectiva del grupo éster aromático con $LiAlH_4$ en dietil éter a $-50^\circ C$. Esta reacción transcurre en apenas 30min y con un rendimiento del 93%.

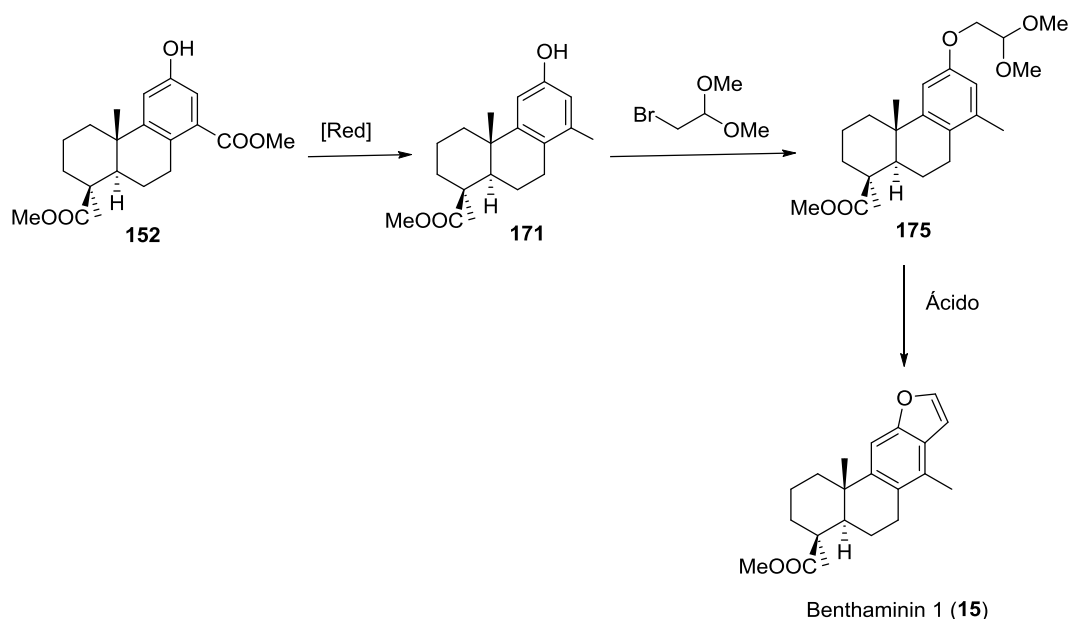


A continuación, se intentó reducir el grupo hidroxilo bencílico resultante, vía el catión bencílico derivado, utilizando el sistema trietilsilano (Et_3SiH)/ cloruro de paladio (PdCl_2) catalítico. Desafortunadamente, esta reacción provocó, además de la reducción hasta metilo pretendida, la hidrogenación del doble enlace del grupo alílo, para dar lugar al compuesto **173**, y la ruptura del éter alílico, generando el fenol **174**. La proporción de la mezcla de los dos productos es de 1:1 aproximadamente.



Este resultado adverso sirvió para planificar la ruta definitiva hacia *benthaminin 1* (**15**) a partir del ácido *trans-comúnico* (**174**) (Esquema 42). La nueva ruta sintética que parte del fenol **152**, consta de 4 pasos:

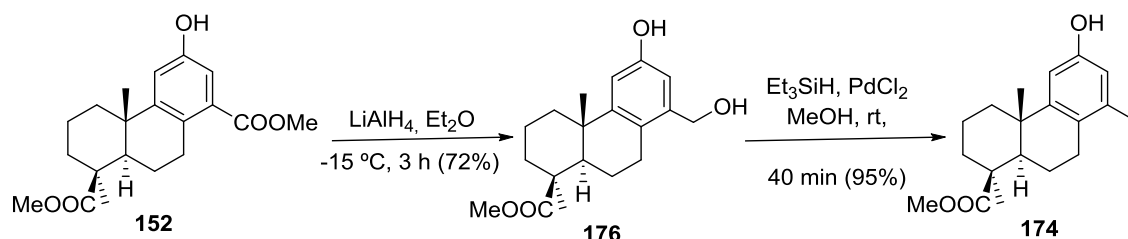
- 1ª. Reducción selectiva del grupo éster aromático (2 pasos)
- 2ª. Preparación del fenoxiacetal.
- 3ª. Formación del anillo furánico mediante reacción de ciclación electrofílica.



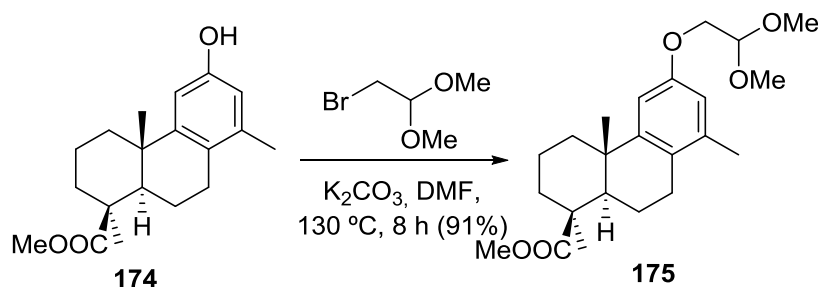
Esquema 42. Planteamiento alternativo para la síntesis de benthaminin 1 (15) a partir del fenol 152.

La reducción selectiva del fenol 152 se llevó a cabo, en condiciones similares a las utilizadas en el compuesto 168, con LiAlH_4 en dietiléter, en este caso a -15°C . En este caso, el rendimiento de obtención de 176 baja considerablemente respecto a la de obtención de 172, probablemente por la baja reactividad del grupo éster aromático del fenol 152 en las condiciones empleadas para la reducción. Ello, se pone de manifiesto en la temperatura de reacción de -15°C , que supone un incremento de 35°C , con respecto a las condiciones utilizadas en la reducción de 168. Se comprueba experimentalmente que cuando se incrementa más la temperatura, se produce la reducción de los dos grupos ésteres de 152.

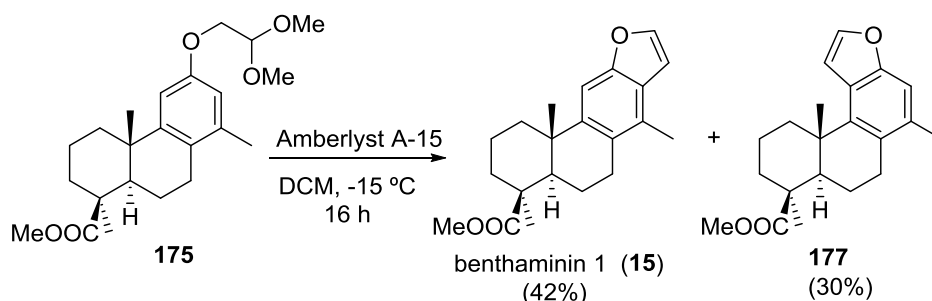
A continuación, el resultante alcohol bencílico 176, se redujo bajo las mismas condiciones utilizadas para reducir 172. En este caso, se obtuvo el fenol 174 como único producto de la reacción.



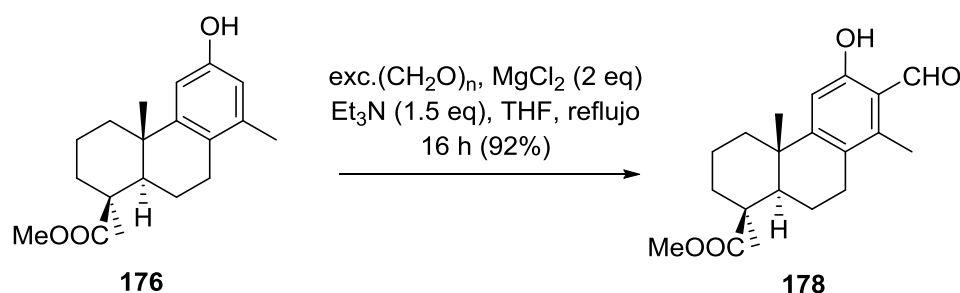
El siguiente paso de la secuencia es la eterificación del hidroxilo fenólico de **174** mediante tratamiento con 2-bromoacetaldehído dimetil acetal, en presencia de K_2CO_3 , en DMF a $130^\circ C$. Después de 8 horas de reacción, se obtuvo el derivado **175** con un rendimiento del 91%. La estructura de **175** se estableció mediante técnicas espectroscópicas de RMN y de infrarrojo.



Por último, se somete **177** a condiciones ácidas para formar el anillo furánico de la benthaminina 1 (**15**). El empleo de resina catiónica Amberlyst A-15 fue suficiente para producir la formación del anillo furánico. Desafortunadamente, la reacción no fue regioselectiva, ya que se formó una mezcla irresoluble del benthaminina 1 (**15**) esperado, y de su regioisómero **177** en proporción aproximada de 4:3.

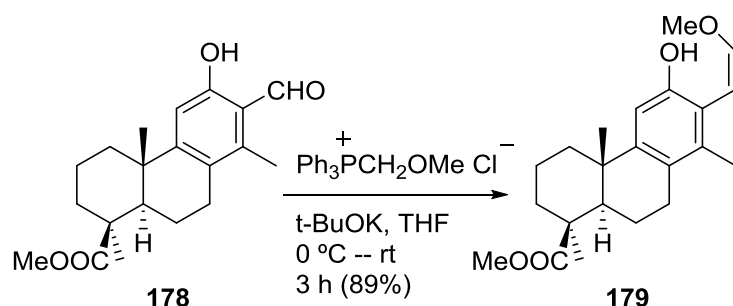


Con objeto de evitar la formación de regioisómeros, se modificó la ruta sintética. Para ello, se introdujo el grupo formilo de forma regioselectiva utilizando el paraformaldehído en presencia de $MgCl_2$ y Et_3N . La reacción que tiene un rendimiento del 92%, se llevó a cabo a reflujo en THF durante 16 horas.



La estructura de **178** se estableció mediante los espectros de RMN de ^1H y de ^{13}C . La posición del grupo formilo en C-13 se confirma tras observar efecto noe de éste con el grupo metilo aromático.

Una vez preparado el aldehído **178**, se condensó con el cloruro de (metoximetil)trifenilfosfonio, en presencia de t-BuOK, en THF, para dar lugar al enol éter **179**. La reacción de Wittig llevada a cabo proporcionó únicamente el isómero cis, probablemente por factores de naturaleza estérica.



Finalmente, se efectuó la ciclación del enol éter **179** con la resina catiónica Amberlyst A-15, proporcionando el producto deseado *benthaminin 1* (**15**), como único producto de reacción, con un rendimiento del 76%.

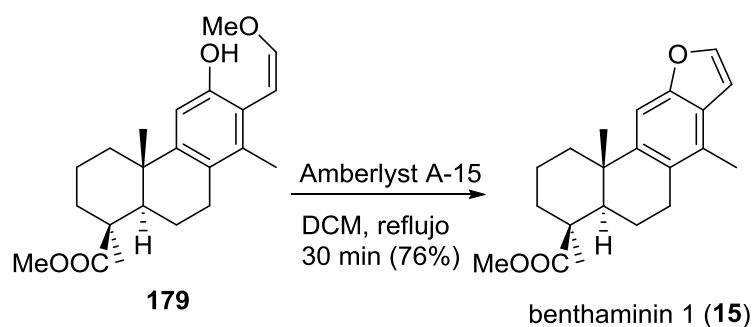


Tabla-3. Comparación de los datos de RMN- ^1H (500 MHz, CDCl_3) de *benthaminin 1* (**15**) natural y sintético

	15 Natural	15 Sintético
1	1.53(m) y 1.77 (m)	
2	1.55 (m) y 1.67 (m)	
3	1.35 (m) y 1.74 (m)	
5	1.80 (m)	
6	1.58 (m) y 1.88 (m)	
7	2.77 (m) y 2.88 (dd, $J= 16.9$ y 6.7)	2.65 (ddd, $J= 17.0, 12.8, 6.5$) y 2.96 (dd, $J= 16.6, 5.2$)
11	6.72 (s)	7.33 (s)
15	6.71 (dd, $J= 2.0$ y 0.7)	6.71 (br s)
16	7.26 (d, $J= 1.6$)	7.51 (d, $J= 2.0$ Hz)
17		2.36 (s)
18	1.30 (s)	1.30 (s)
20	1.26 (s)	1.10 (s)
O	3.68 (s)	3.68 (s)
Me		

Tabla-4. Comparación de los datos de RMN- ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de benthaminin 1(**15**) natural y sintético

	15 Natural	15 Sintético
1	36.6	37.5
2	18.7	20.2
3	38.9	40.4
4	47.7	44.0
5	44.3	51.2
6	27.5	29.4
7	21.7	21.0
8	125.4	125.4
9	147.2	145.7
10	37.8	39.1
11	104.3	104.9
12	153.5	153.5

13	127.5	127.92
14	128.3	127.97
15	105.0	105.6
16	144.2	144.2
17	25.6	28.5
18	16.6	22.5
19	179.2	177.8
20	15.9	15.9
OMe	52.0	52.4

Como puede apreciarse en las tablas comparativas, se aprecian algunas discrepancias en los espectros de ^1H NMR y en los desplazamientos químicos de ^{13}C , lo que hace sospechar que la estructura propuesta para el producto natural no sea correcta.

En resumen, se ha llevado a cabo la síntesis enantioselectiva de la supuesta estructura de *benthaminin 1* (**15**) con esqueleto cassano a partir del ácido *trans*-comúnico (**142**), en 8 pasos, con un rendimiento global del 30 %.

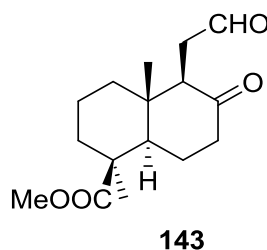
EXPERIMENTAL SECTION

General Procedures

Unless stated otherwise, reactions were performed in oven-dried glassware under an argon atmosphere using dry solvents. Solvents were dried as follows: THF and Et₂O over Na–benzophenone, toluene over Na, dichloromethane (DCM) and MeOH over CaH₂. Dimethylformamide (DMF) was dried over 4Å molecular sieves. Thin-layer chromatography (TLC) was performed using F254 precoated plates (0.25 mm) and visualized by UV fluorescence quenching and phosphomolybdic acid solution staining. Flash chromatography was performed on silica gel (230-400 mesh). Chromatography separations were carried out by conventional column on silica gel 60 (230-400 Mesh), using hexanes-AcOEt (AcOEt-hexane) mixtures of increasing polarity. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded at 600, 500 and 400 MHz, and at 150, 125 and 100 MHz, respectively. CDCl₃ was treated with K₂CO₃. Chemical shifts (δ, ppm) are quoted in parts per million (ppm) referenced to the appropriate residual solvent peak and tetramethylsilane. Data for ¹H NMR spectra are reported as follows: chemical shift (δ ppm) (multiplicity, coupling constant (Hz), integration), with the abbreviations s, br s, d, br d, t, q, sext and m denoting singlet, broad singlet, doublet, broad doublet, triplet, quartet, sextet and multiplet, respectively. *J* = coupling constant in Hertz (Hz). Data for ¹³C NMR spectra are reported in terms of chemical shift relative to Me₄Si (δ 0.0) and the signals were assigned utilizing DEPT experiments and on the basis of heteronuclear correlations. Infrared spectra (IR) were recorded as thin films or as solids on a FTIR spectrophotometer with samples between sodium chloride plates or as potassium bromide pellets and are reported in frequency of absorption (cm⁻¹). Only selected absorbances (ν_{max}) are reported. ([α]_D) measurements were carried out in a polarimeter; utilizing a 1dm length cell and CHCl₃ as a solvent. Concentration is expressed in mg/mL. HRMS were recorded on a spectrometer, utilizing a Q-TOF analyzer, and ESI⁺ ionization.

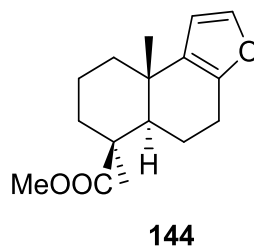
Experimental Procedures

(1*S*,4*aS*,5*R*,8*aR*)-Methyl 1,4*a*-dimethyl-6-oxo-5-(2-oxoethyl)decahydronaphthalene-1-carboxylate (**211**).



An ozone stream was bubbled into a solution of **210** (5 g, 15.82 mmol) in CH₂Cl₂ (100 mL) cooled at -78 °C for 3 h, at which time TLC showed no starting material. Then an argon stream was bubbled for eliminating the ozone excess, and PPh₃ was added to the cooled solution, and then stirred for 2 h at room temperature. Solvent was evaporated to afford a crude product that was purified by flash chromatography on silica gel (40% AcOEt/hexane) to yield keto aldehyde **211** (4.13 g, 90%). $[\alpha]_D^{25} = -13.2$ (c 0.9, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 0.54 (s, 3H), 1.10 (ddd, *J* = 13.5, 13.5, 3.9, 1H), 1.22 (m, 1H), 1.26 (s, 3H), 1.46 – 1.67 (m, 2H), 1.70 – 1.86 (m, 2H), 1.97 – 2.50 (m, 6H), 2.82 (dd, *J* = 9.8, 2.7 Hz, 1H), 2.93 (dd, *J* = 17.5, 9.8 Hz, 1H), 3.61 (s, 3H), 9.79 (s, 1H). ¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 13.6 (CH₃), 19.5 (CH₂), 24.9 (CH₂), 28.7 (CH₃), 37.1 (CH₂), 37.8 (CH₂), 39.6 (CH₂), 41.9 (CH₂), 42.0 (C), 44.2 (C), 51.4 (CH₃), 54.5 (CH), 57.0 (CH), 176.9 (C), 201.0 (CH), 209.7 (C). IR (film): IR (film): 2932, 1713, 1451, 1388, 1215, 1156, 750, 666 cm⁻¹. HRMS (ESI) *m/z*: calcd for C₁₆H₂₅O₄ (M+H⁺) 281.1753, found: 281.1750.

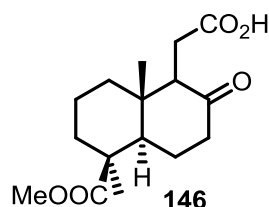
(5*aR*,6*S*,9*aS*)-Methyl 6,9*a*-dimethyl-4,5,5*a*,6,7,8,9,9*a*-octahydronaphtho[2,1-*b*]furan-6-carboxylate (**144**)



To a stirred solution of keto aldehyde **143** (2g, 7.14 mmol) in dry toluene (15 mL) was added successively ethylene glycol (8 mL), 4 Å molecular sieves (10 g) and *p*-

toluenesulfonic acid (APTS) (1.47 g, 8.54 mmol), and the mixture was stirred under reflux for 1 h. Then, a sat. solution of NaHCO₃ (10 mL) was added to quench the reaction and the mixture was diluted with Et₂O (40 mL). The phases were shaken and separated and the organic phase was washed with water (3 x 10 mL) and brine (2 x 15 mL), and dried over anhydrous Na₂SO₄. Removal of the solvent under vacuum afforded furane **144** (1.8 g, 96%) which was used in the next step without purification. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +19.6$ (c 1.2, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 0.94 (s, 3H), 1.08 (ddd, *J* = 13.4, 13.4, 4.4 Hz, 1H), 1.25 (s, 3H), 1.34 (ddd, *J* = 14.1, 14.1, 4.4 Hz, 1H), 1.46 (dd, *J* = 12.2, 1.9 Hz, 1H), 1.57 (m, 1H), 1.83 - 2.12 (m, 3H), 2.16 - 2.33 (m, 2H), 2.54 (ddd, *J* = 16.3, 11.7, 5.9 Hz, 1H), 2.70 (ddd, *J* = 16.3, 6.0, 1.5 Hz, 1H), 3.66 (s, 3H), 6.18 (s, 1H), 7.20 (s, 1H). ¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 19.4 (CH₂), 20.9 (CH₃), 21.0 (CH₃), 24.8 (CH₂), 28.5 (CH₃), 34.6 (C), 38.0 (CH₂), 38.8 (CH₂), 43.6 (C), 51.1 (CH₃), 53.1 (CH), 107.3 (CH), 128.7 (C), 140.7, 148.7 (C), 177.6 (C). IR (film): 2950, 2910, 2848, 1716, 1627, 1502, 1456, 1427, 1376, 1324, 1228, 1183, 1157, 1065, 1065, 1054, 771, 727, 695, 602, 536 cm⁻¹. HRMS (ESI) *m/z*: calcd for C₁₆H₂₃O₃ (M+H⁺) 263.1647, found: 263.1651.

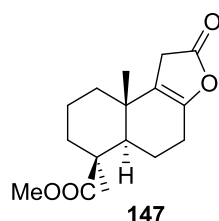
2-((1R,4aR,5S,8aS)-5-(Methoxycarbonyl)-5,8a-dimethyl-2-oxodecahydronaphthalen-1-yl)acetic acid (146).



To a solution of keto aldehyde **143** (2g, 7.14 mmol) in acetone (30 mL) previously cooled at 0 °C, was added dropwise Jones reagent (3 mL) and the mixture was stirred at room temperature for 12 h, at which time TLC showed no starting material. Then the solvent was removed under vacuum and the crude product was diluted with ethyl acetate – water (40:15 mL). The phases were shaken and separated. The organic layer was washed with water (3 x 15 mL), brine, dried over Na₂SO₄ and filtered. Removal of the solvent afforded a crude product which was filtered on silica gel to give pure keto acid **146** (1.99 g, 94%) as a white solid. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -28.2$ (c 0.9, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 0.53 (s, 3H), 1.10 (ddd, *J* = 13.5, 13.5, 3.8 Hz, 1H), 1.26 (s, 3H), 1.28 (ddd, *J* = 13.6, 13.6, 4.1 Hz, 1H), 1.53 (dt, *J* = 14.2, 3.6 Hz, 1H), 1.63 (br d, *J* = 9.9 Hz, 1H), 1.73 (dd, *J* = 12.7, 2.8 Hz, 1H), 1.79 (m,

1H), 2.52 – 1.97 (m, 5H), 2.66 – 2.78 (m, 3H), 3.61 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 13.4 (CH₃), 19.5 (CH₂), 25.0 (CH₂), 27.6 (CH₂), 28.7 (CH₃), 37.9 (CH₂), 39.3 (CH₂), 41.9 (CH₂), 42.2 (C), 44.2 (C), 51.4 (CH₃), 54.5 (CH), 56.6 (CH), 176.9 (C), 178.6 (C), 209.9 (C). IR (film): 2949, 1701, 1432, 1390, 1332, 1221, 1153, 1133, 1117, 1091, 1027, 966, 845, 753 cm⁻¹. HRMS (ESI) *m/z*: calcd for C₁₆H₂₅O₅ (M+H⁺) 297.1702, found: 297.1699.

(5a*R*,6*S*,9a*S*)-Methyl 6,9a-dimethyl-2-oxo-1,2,4,5,5a,6,7,8,9,9a-decahydronaphtho[2,1-*b*]furan-6-carboxylate (147).



To a solution of **146** (687 mg, 2.32 mmol) in CH₂Cl₂ (10 mL) cooled at 0 °C, was added successively pyridine (5 mL) and POCl₃ (1 mL, 10.75 mmol) and the mixture was kept stirring under argon atmosphere for 4 h. Then, the reaction was carefully quenched at 0° C with water (2 mL), and ether was added (25 mL). The organic solution was washed with 2N HCl (3 x 10 mL) and brine (3 x 10 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, and evaporated to afford a crude product that was purified by flash chromatography on silica gel (15% AcOEt /hexane) to yield lactone **147** (587 mg, 91%). [α]_D²⁵ = +16.4 (c 1.1, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 0.84 (s, 3H), 1.08 (ddd, *J* = 13.6, 13.6, 4.3 Hz, 1H), 1.22 (s, 3H), 1.23 (ddd, *J* = 13.4, 13.4, 4.4 Hz, 1H), 1.50 (dd, *J* = 12.3, 1.8 Hz, 1H), 1.44 – 1.65 (m, 2H), 1.75 – 2.03 (m, 2H), 2.05 – 2.44 (m, 4H), 2.93 – 3.09 (m, 2H), 3.63 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 18.9 (CH₃), 19.1 (CH₂), 20.2 (CH₂), 24.2 (CH₂), 28.2 (CH₃), 34.9 (C), 37.7 (CH₂), 37.8 (CH₂), 43.5 (C), 51.3 (CH₃), 52.6 (CH), 120.6 (C), 148.5 (CH), 176.5 (C), 177.2 (C). IR (film): 2948, 2848, 1800, 1721, 1466, 1378, 1232, 1169, 1138, 1095, 1041, 1006, 935, 905, 849, 773 cm⁻¹. HRMS (ESI) *m/z*: calcd for C₁₆H₂₃O₄ (M+H⁺) 279.1596, found: 279.1594.

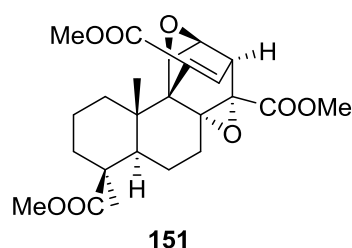
(5a*R*,6*S*,9a*S*)-Methyl 12-acetoxy-6,9a-dimethyl-4,5,5a,6,7,8,9,9a-octahydronaphtho[2,1-*b*]furan-6-carboxylate (145).

Methyl propiolate (580 mg, 6.90 mmol) was added to a solution of furan **145** (0.5 g, 1.51 mmol) in toluene (10 mL), and the mixture was heated at reflux for 3 h. At this time, TLC showed no remaining starting material. The reaction was allowed to cool to room temperature and then concentrated under vacuum to give a crude product. The Chromatography of this crude product on silica gel (30% AcOEt /hexane) gave 430 mg of compound **149** (70%) as a colourless syrup. $[\alpha]_D^{25} = +15.1$ (c 0.9, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.4 (s, 3H), 1.00 – 2.25 (m, 9H), 1.22 (s, 3H), 2.18 (s, 3H), 2.49 (m, 1H), 2.75 (m, 1H), 3.65 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 6.26 (s, 1H), 7.73 (s, 1H). ¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 18.2 (CH₃), 18.9 (CH₂), 20.4 (CH₂), 21.1 (CH₃), 28.6 (CH₃), 29.7 (CH₂), 37.3 (CH₂), 37.9 (C), 38.0 (CH₂), 43.8 (C), 51.3 (CH₃), 51.6 (CH₃), 51.6 (CH), 87.0 (C), 110.4 (C), 127.7 (CH), 150.8 (C), 153.8 (CH), 163.1 (C), 168.7 (C), 171.3 (C), 177.4 (C). IR (film): 2949, 1757, 1720, 1435, 1370, 1312, 1259, 1200, 1149, 1068, 1037, 987, 967, 771, 709 cm⁻¹. HRMS (ESI) *m/z*: calcd for C₂₂H₂₉O₇ (M+H⁺) 405.1913, found: 405.1912.

Diels-Alder cycloaddition of furan **144** and methyl propiolate by refluxing in toluene

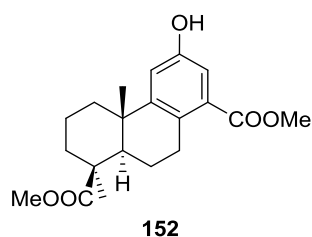
Methyl propiolate (580 mg, 6.90 mmol) was added to a solution of furan **144** (1 g, 3.81 mmol) in toluene (10 mL), and the mixture was heated at reflux for 3 h. At this time, TLC showed no remaining starting material. The reaction was allowed to cool to room temperature and then concentrated under vacuum to give a crude product, which ¹H NMR spectrum showed a 2.8:1:1.2 mixture of compounds **151**:**152**:**153**, respectively. After column chromatography on silica gel, 760 mg of **151** (45%) (20% AcOEt/hexane), 230 mg of **152** (17%) (30% AcOEt/hexane) and 270 mg g of **153** (20%) (10% AcOEt/hexane), were obtained.

2.8 (4*S*,4*aR*,6*aR*,7*aS*,8*S*,8*aS*,9*aR*,9*bS*,9*cS*)-Trimethyl 4,9*c*-dimethyl-1,2,3,4,4*a*,5,6,7*a*,8,8*a*,9*a*,9*c*-dodecahydro-8,9*b*-ethenophenanthro[1,10*a*-*b*:3,4*b'*]bis(oxirene)-4,7*a*,10-tricarboxylate (**151**)



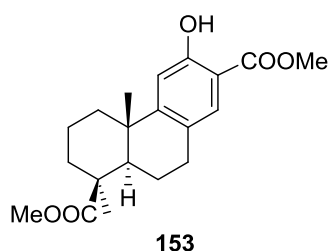
Yellow syrup. $[\alpha]_D^{25} = +5.2$ (c 1.1, CHCl_3). ^1H NMR (600 MHz, Chloroform-*d*) δ 0.54 (s, 3H), 1.07 (td, $J = 13.5, 4.3$ Hz, 1H), 1.20 (s, 3H), 1.29 (dd, $J = 11.6, 1.8$ Hz, 1H), 1.55 (dq, $J = 14.2, 3.8$ Hz, 1H), 1.68 (dd, $J = 12.2, 3.4$ Hz, 1H), 1.73 – 1.64 (m, 1H), 1.82 (qt, $J = 13.4, 4.0$ Hz, 1H), 2.02 – 1.99 (m, 1H), 2.13 – 2.05 (m, 1H), 2.16 – 2.08 (m, 1H), 2.22 – 2.14 (m, 1H), 2.76 – 2.69 (m, 1H), 3.03 (ddd, $J = 3.8, 2.7, 1.2$ Hz, 1H), 3.41 (dt, $J = 2.6, 1.2$ Hz, 1H), 3.58 (s, 3H), 3.67 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 3.99 (t, $J = 2.7$ Hz, 1H), 7.17 (dd, $J = 3.6, 1.1$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (151 MHz, Chloroform-*d*) δ 17.9 (CH_3 -17), 19.5 (CH_2 -6), 20.0 (CH_2 -2), 25.4 (CH_2 -7), 28.8 (CH_3 -18), 35.5 (C-10), 38.0 (CH_2 -3), 40.1 (CH_2 -1), 44.3 (C-4), 46.1 (C-14), 51.3 (CH_3 -24), 51.7 (CH_3 -22), 52.1 (CH_3 -23), 53.1 (CH-16), 54.2 (CH-5), 55.1 (CH-13), 59.5 (CH-9), 77.5 (C-8), 90.3 (CH-15), 137.4 (C-11), 145.2 (CH-12), 164.4 (C-21), 171.5 (C-20), 177.6 (C-19). IR (film): 2949, 1714, 1592, 1435, 1349, 1225, 1147, 1131, 1093, 1051, 983, 908, 750, 666 cm^{-1} . HRMS (ESI) m/z : calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{O}_8$ ($\text{M}+\text{H}^+$) 447.2019, found: 447.2021.

(1*S*,4*aS*,10*aR*)-Dimethyl 6-hydroxy-1,4*a*-dimethyl-1,2,3,4,4*a*,9,10,10*a*-octahydrophenanthrene-1,8-dicarboxylate (152).



White solid. $[\alpha]_D^{25} = +21.0$ (c 0.9, CHCl_3). ^1H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 1.01 (s, H-15), 1.07 (ddd, $J = 13.6, 13.6, 4.3$ Hz, H-3), 1.27 (s, H-16), 1.33 (ddd, $J = 13.4, 13.4, 4.1$ Hz, H-1), 1.50 (dd, $J = 12.4, 1.7$ Hz, H-5), 1.61 (m, H-2), 1.84 (m, H-6), 1.97 (m, H-2), 2.13 (ddd, $J = 13.2, 13.2, 3.6$ Hz, H-1), 2.20 (m, H-6), 2.26 (ddd, $J = 13.4, 13.4, 3.1$ Hz, H-3), 2.89 (ddd, $J = 17.7, 12.9, 6.4$ Hz, H-7), 3.10 (ddd, $J = 17.6, 5.1, 1.7$ Hz, H-7), 3.66 (s, H-18), 3.85 (s, H-20), 5.73 (s, H-21), 6.95 (d, $J = 2.7$ Hz, H-11), 7.15 (d, $J = 2.7$ Hz, H-13). ^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ 20.14 (C-2), 20.97 (C-6), 23.00 (C-15), 28.53 (C-16), 30.15 (C-7), 37.49 (C-3), 39.25 (C-10), 39.96 (C-1), 44.03 (C-4), 51.52 (C-18), 52.12 (C-5), 52.21 (C-20), 115.20 (C-13), 116.85 (C-11), 129.05 (C-8), 131.23 (C-14), 151.26 (C-9), 153.44 (C-12), 168.83 (C-19), 178.26 (C-17), IR (KBr): 3419, 2951, 1722, 1699, 1610, 1587, 1451, 1434, 1305, 1219, 1162, 1142, 1087, 1007, 982, 869, 780 cm^{-1} . HRMS (ESI) m/z : calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{O}_5$ ($\text{M}+\text{H}^+$) 347.1858, found: 347.1855.

(1*S*,4*aS*,10*aR*)- Dimethyl 6-hydroxy-1,4*a*-dimethyl-1,2,3,4,4*a*,9,10,10*a*-octahydrophenanthrene-1,7-dicarboxylate (153**).**

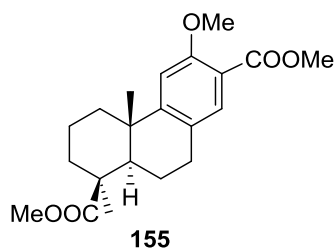


Colouless syrup. $[\alpha]_D^{25} = +16.3$ (c 1.2, CHCl_3). ^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 1.00 (s, 3H), 1.06 (ddd, $J = 13.4, 13.4, 4.0$ Hz, 1H), 1.25 (s, 3H), 1.37 (ddd, $J = 13.4, 13.4, 4.3$ Hz, 1H), 1.48 (dd, $J = 12.2, 1.8$ Hz, 1H), 1.61 (m, 1H), 1.85 – 2.05 (m, 2H), 2.10 – 2.32 (m, 3H), 2.45 (ddd, $J = 16.5, 11.9, 6.1$ Hz, 1H), 2.73 (ddd, $J = 16.5, 5.6, 1.8$ Hz, 1H), 3.64 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 6.86 (s, 1H), 7.49 (s, 1H), 10.31 (s, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 19.9 (CH_2), 21.0 (CH_2), 22.7 (CH_3), 28.5 (CH_3), 31.0 (CH_2), 37.5 (CH_2), 39.08 (C), 39.1 (CH_2), 44.0 (C), 51.3 (CH_3), 52.0 (CH_3), 52.4 (CH), 110.2 (C), 114.0 (CH), 126.5 (C), 130.0 (CH), 156.9 (C), 159.2 (C), 170.2 (C), 177.6 (C). IR (film): 3215, 2952, 1722, 1675, 1621, 1573, 1489, 1438, 1379, 1326, 1309, 1274, 1226, 1188, 1173, 1140, 1104, 1055, 1033, 972, 792, 771, 752, 704, 476 cm^{-1} . HRMS (ESI) m/z : calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{O}_5$ ($\text{M}+\text{H}^+$) 347.1858, found: 347.1860.

Diels-Alder cycloaddition of furan **144 and methyl propiolate with Et_2AlCl .**

To a dry solution of furan **144** (1.7 g, 6.49 mmol) in CH_2Cl_2 (20 mL) cooled at 0 °C was added a solution of Et_2AlCl (1.35 mL, 25% in toluene, 10 mmol). The reaction was stirred overnight at room temperature, then sat. aq. NaHCO_3 (10 mL) was added slowly at 0 °C. The solvent was removed under vacuum and the residue was extracted with Et_2O (2×20 mL), and the combined organic extracts were dried with Na_2SO_4 , filtered and concentrated, to give a crude product, which was purified by flash chromatography (10% AcOEt /Hexane) to give **152** (1.67 g, 74%) and **153** (414 mg, 19%).

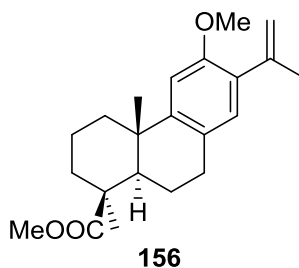
(1*S*,4*aS*,10*aR*)-Dimethyl 6-methoxy-1,4*a*-dimethyl-1,2,3,4,4*a*,9,10,10*a*-octahydrophenanthrene-1,7-dicarboxylate (155**).**



K_2CO_3 (250 mg, 1.81 mmol) was added to a solution of **153** (380 mg, 1.1 mmol) in acetone (10 mL) and the reaction mixture was kept stirring at room temperature for 15 min. Then, dimethyl sulfate (300 mg, 2.38 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at reflux for 12 h. The solvent was evaporated and the crude product was poured into Et_2O -water (30:10 mL). The phases were shaken and separated. The organic phase was washed with brine (3 x 10 mL), dried over Na_2SO_4 and the solvent evaporated to give impure **155**. Flash chromatography on silica gel (10% AcOEt/ hexane) gave **155** (371 mg, 93%) as a colourless solid. $[\alpha]_D^{25} = +10.4$ (c 1.2, $CHCl_3$). 1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 1.04 (s, 3H), 1.09 (ddd, $J = 13.6, 13.6, 4.0$ Hz, 1H), 1.29 (s, 3H), 1.41 (ddd, $J = 13.3, 13.3, 4.2$ Hz, 1H), 1.52 (dd, $J = 12.3, 1.8$ Hz, 1H), 1.65 (m, 1H), 1.85 – 2.10 (m, 2H), 2.10 – 2.32 (m, 3H), 2.45 (ddd, $J = 16.5, 11.9, 5.5$ Hz, 1H), 2.73 (ddd, $J = 16.5, 3.9, 1.5$ Hz, 1H), 3.66 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.96 (s, 3H), 6.84 (s, 1H), 7.49 (s, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 19.9 (CH_2), 20.9 (CH_2), 22.7 (CH_3), 28.5 (CH_3), 30.9 (CH_2), 37.5 (CH_2), 39.1 (C), 39.3 (CH_2), 44.0 (C), 51.3 (CH_3), 51.8 (CH_3), 52.4 (CH_2), 56.1 (CH_3), 109.3 (CH), 117.5 (C), 127.4 (C), 132.3 (CH), 153.9 (C), 157.3 (C), 166.6 (C), 177.7 (C). IR (film): 2949, 2848, 1680, 1613, 1565, 1499, 1462, 1434, 1402, 1330, 1270, 1247, 1217, 1191, 1170, 1141, 1096, 1057, 1036, 974, 851, 785, 772, 739 cm^{-1} . HRMS (ESI) m/z : calcd for $C_{21}H_{29}O_5$ ($M+H^+$) 361.2015, found: 361.2019.

(1S,4aS,10aR)-dimethyl 6-methoxy-1,4a-dimethyl-1,2,3,4,9,10,10a

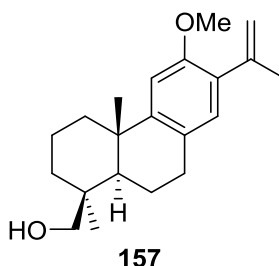
octahydrophenanthrene-1,7-dicarboxylate (156)



To a solution of **155** (161 mg, 0.446 mmol) in dry THF (5 mL) was slowly added 1M methylmagnesium bromide solution in THF (1.2 mL, 1.2 mmol) at 0°C and under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 30 min, at which time TLC showed no starting material. The reaction was quenched with conc. HCl (2 mL), and the reaction mixture was stirred at room temperature for an additional 10 min. Then, the solvent was removed under vacuum and the mixture was diluted with AcOEt - Water (20 : 5 mL). The phases were shaken and separated. The organic extract was washed with water (5 mL) and brine (5 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and the solvent was evaporated to give a crude product which was purified by flash chromatography on silica gel (5% AcOEt/hexane), affording **156** (140 mg, 92%) as a colorless syrup.

$[\alpha]_D^{25} = + 108.2$ (c = 1.3, CHCl₃). IR (film) ν_{\max} : 2929, 2849, 1725, 1609, 1498, 1463, 1403, 1378, 1328, 1305, 1243, 1213, 1190, 1171, 1141, 1111, 1097, 1057, 1033, 973, 892, 848, 773 cm⁻¹. ¹H RMN (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm): 1.07 (s, 3 H), 1.13 (ddd, J = 13.5, 13.5, 4.3 Hz, 1 H), 1.29 (s, 3 H), 1.44 (ddd, J = 13.3, 13.3, 7.1 Hz, 1H), 1.55 (d, J = 10.49 Hz, 1 H), 1.63 – 1.67 (m, 1 H), 1.93 – 2.04 (m, 1 H), 2.11 (s, 3H), 2.16 – 2.32 (m, 3 H), 2.73 (ddd, J = 14.8, 14.8, 6.3 Hz, 1 H), 2.84 (dd, J = 15.2, 3.6 Hz, 1 H), 3.68 (s, 3 H), 3.80 (s, 3 H), 5.07 (s, 1 H), 5.12 (s, 1 H), 6.76 (s, 1 H), 6.88 (s, 1 H). ¹³C RMN (CDCl₃, 125 MHz) δ (ppm): 19.9 (CH₂), 21.1 (CH₂), 22.8 (CH₃), 23.3 (CH₃), 28.5 (CH₃), 31.1 (CH₂), 37.7 (CH₂), 38.6 (C), 39.5 (CH₂), 44.0 (C), 51.2 (CH), 52.9 (CH₃), 55.6 (CH₃), 108.1 (CH), 114.7 (CH₂), 127.3 (C), 129.7 (CH), 130.3 (C), 143.9 (C), 147.9 (C), 154.9 (C), 177.9 (C). HRMS (ESI) m/z: calcd for C₂₂H₃₁O₃ (M+H⁺) 343.2273, found: 343.2276.

14. (1S,4aS,10aR)-dimethyl 6-methoxy-1,4a-dimethyl-1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahydrophenanthrene-1,7-dicarboxylate (157)

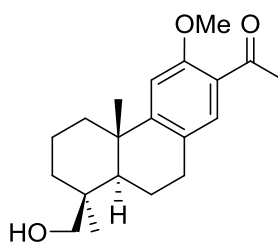


LiAlH₄ (60 mg, 1.57 mmol) was added to a stirred solution of (103 mg, 0.3 mmol) in dry Et₂O (5 mL) cooled to 0°C and the reaction mixture was kept stirred at room temperature under an argon atmosphere for 15 min, at which time TLC showed no remaining starting

material. Then, 2 N HCl (0.5 mL) was slowly added at 0°C, and the mixture was diluted with Et₂O – H₂O (20 : 5 mL). The phases were shaken and separated, and the organic phase was washed with brine (2 x 5 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄ and filtered. Removal of the solvent under vacuum afforded pure **158** (92 mg, 98%) as a colourless syrup.

$[\alpha]_D^{25} = + 55.1$ (c = 0.9, CHCl₃). IR (film) ν_{\max} : 3375, 2924, 2851, 1609, 1563, 1497, 1463, 1402, 1375, 1327, 1260, 1241, 1207, 1104, 1066, 1027, 987, 970, 891, 848, 802, 756, 666, 477 cm⁻¹. ¹H RMN (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm): 1.04 (ddd, J = 13.6, 13.6, 4.2 Hz, 1 H), 1.07 (s, 3 H), 1.22 (s, 3 H), 1.46 – 1.53 (m, 2 H), 1.58 (d, J = 4.9 Hz, 1 H), 1.63–1.76 (m, 3 H), 1.91 (d, J = 13.7 Hz, 1 H), 1.97 – 2.01 (m, 1 H), 2.11 (s, 3H), 2.31 (d, J = 14.7 Hz, 1 H), 2.77 (ddd, J = 10.7, 10.7, 7.1 Hz, 1 H), 2.87 (dd, J = 15.1, 6.7 Hz, 1 H), 3.57 (d, J = 10.9, 1 H), 3.80 (s, 3 H), 3.88 (d, J = 10.9, 1 H), 5.06 (s, 1 H), 5.11 (s, 1 H), 6.77 (s, 1 H), 6.86 (s, 1 H). ¹³C RMN (CDCl₃, 125 MHz) δ (ppm): 19.0 (CH₂), 19.3 (CH₂), 22.3 (CH₃), 25.6 (CH₃), 26.8 (CH₃), 30.1 (CH₂), 35.2 (CH₂), 37.9 (C), 38.7 (C), 38.9 (CH₂), 51.3 (CH), 55.7 (CH₃), 65.3 (CH₂), 107.3 (CH), 114.7 (CH₂), 126.7 (C), 129.7 (CH), 130.2 (C), 143.9 (C), 149.6 (C), 154.9 (C). HRMS (ESI) m/z: calcd for C₂₁H₃₁O₂ (M+H⁺) 315.2324, found: 315.2326.

15. 1-((4bS,8S,8aR)-8-(hydroxymethyl)-3-methoxy-4b,8-dimethyl-4b,5,6,7,8,8a,9,10 octahydrophenanthren-2-yl)ethanone (158)

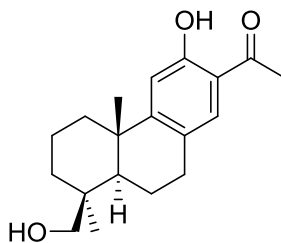


158

An ozone stream was bubbled into a solution of **157** (81 mg, 0.257 mmol) in CH₂Cl₂ (10 mL) cooled at -78 °C for 10 min, at which time TLC showed no starting material. Then an argon stream was bubbled for eliminating the ozone excess, and PPh₃ was added to the cooled solution, and then stirred for 1 h at room temperature. Solvent was evaporated to afford a crude product that was purified by flash chromatography on silica gel (30% AcOEt/hexane) to yield **158** (70 mg, 86%) as a colourless syrup $[\alpha]_D^{25} = + 49.3$ (c = 0.7, CHCl₃). IR (film) ν_{\max} : 3447, 2924, 2850, 1666, 1604, 1494, 1463, 1402, 1356, 1328,

1264, 1235, 1184, 1034, 989, 969, 850, 752, 612 cm⁻¹. ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 1.03 (ddd, J = 13.6, 13.6, 4.2 Hz, 1 H), 1.06 (s, 3 H), 1.19 (s, 3 H), 1.22 – 1.27 (m, 3 H), 1.43-1.51 (m, 3 H), 1.61 – 1.76 (m, 2 H), 2.30 (d, J = 14.7 Hz, 1 H), 2.58 (s, 3H), 2.71 – 2.81 (m, 1 H), 2.89 (dd, J = 17.1, 6.8 Hz, 1 H), 3.55 (d, J = 10.9, 1 H), 3.85 (d, J = 10.9, 1 H), 3.87 (s, 3 H), 6.83 (s, 1 H), 7.43 (s, 1 H). ¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm): 18.9 (CH₂), 19.1 (CH₂), 25.5 (CH₃), 26.8 (CH₃), 29.8 (CH₂), 35.0 (CH₂), 38.4 (C), 38.8 (C), 38.9 (CH₂), 50.9 (CH), 55.5 (CH₃), 65.2 (CH₂), 107.6 (CH), 125.7 (C), 127.2 (C), 130.9 (CH), 155.9 (C), 157.3 (C), 199.5 (C).). HRMS (ESI) m/z: calcd for C₂₀H₂₉O₃ (M+H⁺) 317.2117, found: 317.2117.

16. 1-((4bS,8S,8aR)-3-hydroxy-8-(hydroxymethyl)-4b,8-dimethyl-4b,5,6,7,8,8a,9,10 octahydrophenanthren-2-yl)ethanone (159)



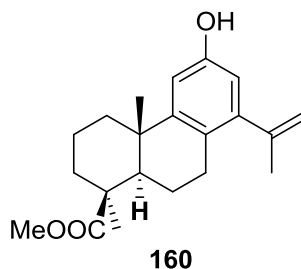
159

To a solution of **158** (50 mg, 0.158 mmol) in dry CH₂Cl₂ (5 mL) was added AlBr₃ (121 mg, 0.454 mmol), and the reaction mixture was stirred at room temperature for 4 h, at which time TLC showed no starting material. Then, the mixture was poured into ice and diluted with AcOEt – Water (15 : 5 mL). The phases were shaken and separated. The organic layer was washed with water and brine, dried over anhydrous Na₂SO₄ and filtered. Removal of the solvent under vacuum afforded a crude product which was purified by flash silicagel column chromatography using 40% AcOEt/hexanes to give **159** (42 mg, 88%) as a white solid.

[α]_D²⁵ = + 57.4 (c = 0.8, CHCl₃). IR (film) ν_{max}: 3429, 2925, 2851, 1640, 1489, 1373, 1333, 1308, 1266, 1220, 1003, 772 cm⁻¹. ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 1.02 (ddd, J = 13.6, 13.6, 4.2 Hz, 1 H), 1.06 (s, 3 H), 1.17 (s, 3 H), 1.39 – 1.47 (m, 3 H), 1.62-1.76 (m, 3 H), 1.89 (d, J = 14.3 Hz, 1 H), 1.98 – 2.03 (m, 1 H), 2.27 (d, J = 12.5 Hz, 1 H), 2.58 (s, 3H), 2.74 – 2.82 (m, 1 H), 2.91 (dd, J = 17.7, 6.4 Hz, 1 H), 3.56 (d, J = 10.9, 1 H), 3.84 (d, J = 10.9, 1 H), 6.87 (s, 1 H), 7.38 (s, 1 H), 11.89 (s, 1 H). ¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ

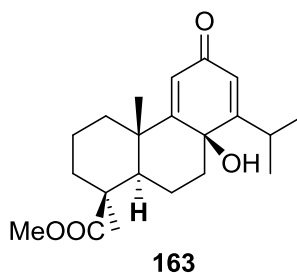
(ppm): 18.8 (CH₂), 19.1 (CH₂), 25.2 (CH₃), 26.5 (CH₃), 26.8 (CH₃), 29.6 (CH₂), 35.1 (CH), 38.5 (C), 38.6 (CH₂), 38.8 (C), 50.6 (CH), 65.3 (CH₂), 113.7 (CH), 117.9 (C), 125.8 (C), 130.9 (CH), 159.6 (C), 160.1 (C), 203.8 (C). HRMS (ESI) m/z: calcd for C₁₉H₂₇O₃ (M+H⁺) 303.1960, found: 303.1952.

17. (1S,4aS,10aR)-methyl 6-hydroxy-1,4a-dimethyl-8-(prop-1-en-2-yl)1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahydrophenanthrene-1-carboxylate (160)



To a solution of **152** (279 mg, 0.805 mmol) in dry THF (10 mL) was slowly added at 0 °C 1M methylmagnesium bromide solution in THF (3 ml, 3 mmol) and under argon atmosphere and the reaction mixture was stirred for 8 h. Then, it was quenched at 0 °C with conc HCl (3 mL), and the reaction mixture was stirred at room temperature for an additional 10 min. Then, the solvent was removed under vacuum and the mixture was diluted with AcOEt - Water (30 : 10 mL). The phases were shaken and separated. The organic extract was washed with water (10 mL) and brine (10 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and the solvent was evaporated to give **160** (217 mg, 82%) as a yellow syrup. $[\alpha]_D^{25} = +157.1$ (c = 1.1, CHCl₃). IR (film) ν_{max} : 3417, 2933, 1723, 1588, 1448, 1378, 1305, 1219, 1192, 114, 1089, 1033, 1219, 1192, 1140, 981, 772, 667 cm⁻¹. ¹H RMN (CDCl₃, 500 MHz) δ (ppm): 1.03 (s, 3 H), 1.08 (ddd, J = 13.6, 13.6, 4.3 Hz, 1 H), 1.27 (s, 3 H), 1.40 (ddd, J = 13.2, 13.2, 4.2 Hz, 1 H), 1.52 (d, J = 10.6, Hz, 1 H), 1.59 – 1.63 (m, 1 H), 1.86 (dddd, J = 12.9, 12.9, 12.9, 5.2 Hz, 1 H), 1.98 (s, 3 H), 2.16 (d, J = 13.3, Hz, 3 H), 2.27 (d, J = 13.5, Hz, 2 H), 2.57 (ddd, J = 14.7, 14.7, 6.1 Hz, 1 H), 2.81 (dd, J = 16.6, 7.0 Hz, 1 H), 3.66 (s, 3 H), 4.79 (s, 1 H), 5.12 (s, 1 H), 6.45 (s, 1 H), 6.69 (s, 1 H). ¹³C RMN (CDCl₃, 125 MHz) δ (ppm): 20.0 (CH₂), 21.1 (CH₂), 22.9 (CH₃), 24.2 (CH₃), 28.5 (CH₃), 29.2 (CH₂), 37.5 (CH₂), 39.0 (C), 39.7 (CH₂), 43.9 (C), 51.3 (CH), 52.7 (CH₃), 110.9 (CH), 112.8 (CH), 114.4 (CH₂), 124.2 (C), 145.2 (C), 146.1 (C), 149.8 (C), 153.3 (C), 178.2 (C). HRMS (ESI) m/z: calcd for C₂₁H₂₉O₃ (M+H⁺) 329.2093, found: 329.2104.

18. (1S,4aS,10aR)-methyl 6-hydroxy-8-isopropyl-1,4a-dimethyl-1,2,3,4,4a,9,10,10^a octahydrophenanthrene-1-carboxylate (161)

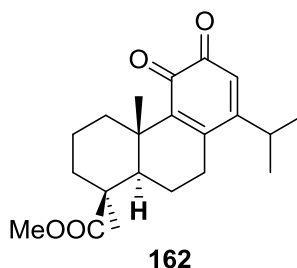


To a solution of **160** (233 mg, 0.709 mmol) in CH_2Cl_2 (10 mL) were successively added Et_3SiH (0.5 mL) and trifluoroacetic acid (0.2 mL) and the reaction mixture was refluxed for 1h. Then CH_2Cl_2 , $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ and excess Et_3SiH were evaporated and the resulting crude product, was purified by column chromatography using 20% AcOEt/hexanes to give **161** (204 mg, 87%) as colourless syrup. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +127.1$ ($c = 1.6$, CHCl_3). IR (film) ν_{max} : 3417, 2933, 1723, 1588, 1448, 1378, 1306, 1219, 1192, 1140, 1089, 981, 898, 862, 773 cm^{-1} . ^1H RMN (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm): 1.04 (s, 3 H), 1.07 (ddd, $J = 13.6, 13.6, 4.3$ Hz, 1 H), 1.16 (d, $J = 6.8$ Hz, 3 H), 1.19 (d, $J = 6.8$ Hz, 3 H), 1.28 (s, 3 H), 1.36 (ddd, $J = 13.5, 13.5, 4.3$ Hz, 1 H), 1.50 (dd, $J = 12.5, 1.8$ Hz, 2 H), 1.59 – 1.63 (m, 1 H), 1.90 (ddd, $J = 12.9, 12.9, 6.4$ Hz, 1 H), 1.94 – 2.02 (m, 1 H), 2.16 (d, $J = 12.7$, Hz, 1 H), 2.21 – 2.28 (m, 2 H), 2.51 – 2.60 (m, 1 H), 2.91 (dd, $J = 16.5, 5.5$ Hz, 1 H) 3.09 (h, $J = 6.8$ Hz, 1 H), 3.67 (s, 3 H), 6.61 (d, $J = 2.7$ Hz, 1 H), 6.63 (d, $J = 2.6$ Hz, 1 H). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 125 MHz) δ (ppm): 20.0 (CH₂), 21.1 (CH₂), 22.9 (CH₃), 23.1 (CH₃), 23.6 (CH₃), 28.0 (CH₂), 28.4 (CH₃), 37.5 (CH₂), 38.9 (C), 39.9 (CH₂), 43.9 (C), 51.3 (CH), 52.3 (CH₃), 109.76 (CH), 109.83 (CH), 124.5 (C), 148.3 (C), 149.8 (C), 153.7 (C), 178.1 (C).). HRMS (ESI) m/z : calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{O}_3$ (M+H⁺) 331.2273, found: 331.2260.

19. Treatment of phenol 161 with $(\text{PhSeO})_2\text{O}$. Obtention of compounds 162 and 163.

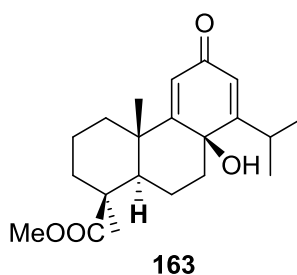
$(\text{PhSeO})_2\text{O}$ (720 mg, 1.99 mmol) was added to a solution of phenol **161** (630 mg, 1.9 mmol) in anhydrous THF (10 mL) under an argon atmosphere, and the reaction was kept stirring at reflux for 10 min. The solvent was evaporated under vacuum to give a crude product, which after column chromatography on silica gel using 10% EtOAc/hexane, afforded ortho-quinone **162** (477 mg, 73%) and hydroxy dienone **163** (131 mg, 20%).

20. (1S,4aS,10aR)-methyl 8-isopropyl-1,4a-dimethyl-5,6-dioxo-1,2,3,4,4a,5,6,9,10,10a-decahydrophenanthrene-1-carboxylate (162)



$[\alpha]_D^{25} = + 24.3$ ($c = 0.5$, CHCl_3). IR (film) ν_{max} : 2928, 2854, 1725, 1679, 1656, 1465, 1383, 1308, 1232, 1192, 1159, 1140, 1099, 980, 773 cm^{-1} . ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 1.02 (ddd, $J = 13.2, 13.2, 3.9$ Hz, 1 H), 1.09 (s, 3 H), 1.15 (d, $J = 6.7$ Hz, 3 H), 1.16 (d, $J = 6.7$ Hz, 3 H), 1.23 (s, 3 H), 1.49 – 1.56 (m, 3 H), 1.75 – 1.92 (m, 2 H), 2.17 – 2.22 (m, 2 H), 2.34 – 2.44 (m, 1 H), 2.62 – 2.68 (m, 2 H), 2.82 (h, $J = 6.7$ Hz, 1 H), 3.64 (s, 3 H), 6.21 (s, 1 H). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm): 17.6 (CH₃), 19.5 (CH₂), 19.9 (CH₂), 22.6 (CH₃), 22.7 (CH₃), 28.6 (CH), 29.0 (CH₃), 30.4 (CH₂), 36.7 (CH₂), 37.4 (CH₂), 39.5 (C), 43.5 (C), 51.4 (CH), 52.9 (CH₃), 72.1 (C), 122.7 (CH), 146.4 (C), 147.7 (C), 164.7 (C), 177.3 (C), 180.4 (C), 180.9 (C). HRMS (ESI) m/z : calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{O}_4$ ($\text{M}+\text{H}^+$) 345.2066, found: 345.2055.

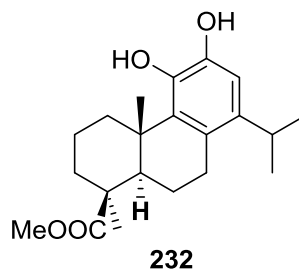
21. (1S,4aS,8aR)-methyl 8a-hydroxy-7-isopropyl-1,4a-dimethyl-6-oxo-1,2,3,4,4a,6,8a,9,10,10a-decahydrophenanthrene-1 carboxylate (263)



$[\alpha]_D^{25} = + 12.3$ ($c = 1.8$, CHCl_3). IR (film) ν_{max} : 3403, 2928, 1726, 1661, 1619, 1463, 1387, 1219, 1151, 1044, 773 cm^{-1} . ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 1.02 (ddd, $J = 13.2, 13.2, 3.9$ Hz, 1 H), 1.13 (d, $J = 6.9$ Hz, 3 H), 1.19 (d, $J = 6.9$ Hz, 3 H), 1.21 (s, 3 H), 1.22 (s, 3 H), 1.50 (ddd, $J = 13.0, 13.0, 4.3$ Hz, 1 H), 1.61 – 1.67 (m, 1 H), 1.75 (d, $J = 12.0$ Hz, 1 H), 1.91 – 2.03 (m, 2 H), 2.22 (d, $J = 13.7$ Hz, 1 H), 2.41 – 2.52 (m, 2H), 2.87 (h, $J =$

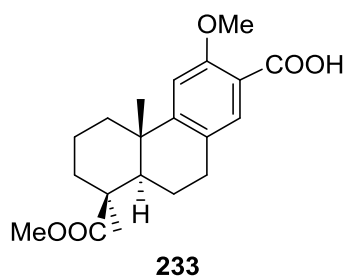
6.9 Hz, 1 H), 6.05 (d, $J = 1.8$ Hz, 1 H), 6.09 (d, $J = 1.8$ Hz, 1 H). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm): 18.6 (CH₃), 18.9 (CH₂), 19.3 (CH₂), 24.1 (CH₃), 24.7 (CH₃), 27.8 (CH), 28.7 (CH₃), 37.2 (CH₂), 37.7 (CH₂), 38.3 (CH₂), 41.9 (C), 44.4 (C), 51.4 (CH), 55.8 (CH₃), 72.1 (C), 122.35 (CH), 122.57 (CH), 169.1 (C), 173.9 (C), 177.3 (C), 187.4 (C).

22. (1S,4aS,10aR)-methyl 5,6-dihydroxy-8-isopropyl-1,4a-dimethyl 1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahydrophenanthrene-1-carboxylate (232)



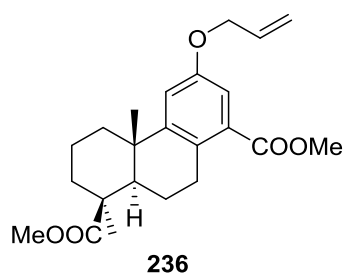
Sodium borohydride (60 mg, 1.58 mmol) was added to a solution of **230** (181 mg, 0.525 mmol) in THF (5 mL) and the yellow reaction mixture was stirred at room temperature for 10 min, at which time the solution became colourless. Then, Amberlyst A-15 (200 mg) was added carefully and the reaction was stirred for an additional 5 min. Then, the mixture was filtered and the solvent was removed under vacuum, affording **232** (178 mg, 98%) as a colourless syrup. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +21.5$ ($c = 0.9$, CHCl_3). IR (film) ν_{max} : 3419, 1610, 1588, 1452, 1434, 1379, 1305, 1231, 1206, 1161, 1142, 1087, 1007, 976, 773 cm^{-1} . ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 1.09 (ddd, $J = 13.6, 13.6, 4.3$ Hz, 1 H), 1.14 (d, $J = 6.8$ Hz, 3 H), 1.15 (d, $J = 6.8$ Hz, 3 H), 1.21 (s, 3 H), 1.28 (s, 3 H), 1.76 (ddd, $J = 13.0, 13.0, 4.7$ Hz, 2 H), 1.86 – 2.04 (m, 2 H), 2.20 (dd, $J = 13.9, 6.4$ Hz, 2 H), 2.27 (d, $J = 13.8$ Hz, 2 H), 2.57 (ddd, $J = 14.6, 14.6, 5.3$ Hz, 1 H), 2.87 (d, $J = 13.8$ Hz, 1 H), 3.06 (h, $J = 6.8$ Hz, 1 H), 3.66 (s, 3 H), 5.30 (s, 1 H), 5.54 (s, 1 H), 6.64 (s, 1 H). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm): 16.6 (CH₃), 19.9 (CH₂), 21.0 (CH₂), 23.4 (CH₃), 23.8 (CH₃), 27.9 (CH), 28.9 (CH₃), 29.8 (CH₂), 36.1 (CH₂), 37.7 (CH₂), 40.1 (C), 43.9 (C), 51.2 (CH), 54.7 (CH₃), 109.8 (CH), 127.6 (CH), 134.2 (C), 138.0 (C), 140.5 (C), 141.2 (C), 178.2 (C). HRMS (ESI) m/z : calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{O}_4$ ($\text{M}+\text{H}^+$) 347.2222, found: 347.2220.

23. (4bS, 8S, 8aR)-3-Methoxy -8-(methoxycarbonyl)-4b, 8-dimethyl-4b, 5, 6,7,8,8a,9,10-octahydrophenanthrene-2-carboxylic acid (233).



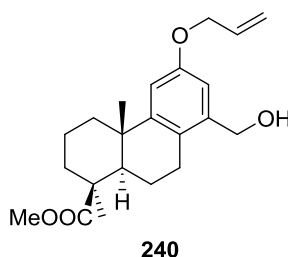
KOH (150 mg, 2.67 mmol) and water (1 mL) were added to a solution of **235** (320 mg, 0.88 mmol) in MeOH (6 mL), and the reaction mixture was kept stirring at reflux for 2 h, at which time TLC showed the disappearance of compound **235**. The mixture was warmed at room temperature and the solvent was removed in vacuum. Then, the crude product was diluted with Et₂O-water (30:15 mL) and the phases were shaken and separated. 2 N HCl (10 mL) was added to the aqueous phase and the mixture was extracted with Et₂O (2 x 20 mL). The organic phase was washed with brine (2 x 15 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated to give pure **233** (261 mg, 86%) as a colourless syrup. $[\alpha]_D^{25} = +14.3$ (c 0.9, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 1.03 (s, 3H), 1.04 (ddd, $J = 13.6, 13.6, 4.3$ Hz, 1H), 1.27 (s, 3H), 1.34 (ddd, $J = 13.2, 13.2, 3.9$ Hz, 1H), 1.61 (br d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 1.65 (m, 1H), 1.83 – 2.10 (m, 2H), 2.13 – 2.32 (m, 3H), 2.45 (ddd, $J = 16.7, 12.8, 6.1$ Hz, 1H), 2.73 (br dd, $J = 16.7, 5.3$ Hz, 1H), 3.65 (s, 3H), 4.00 (s, 3H), 6.88 (s, 1H), 7.84 (s, 1H), 10.66 (br s, 1H). ¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 19.8 (CH₂), 20.7 (CH₂), 22.8 (CH₃), 28.4 (CH₃), 30.8 (CH₂), 37.4 (CH₂), 39.27 (C), 39.30 (CH₂), 44.0 (C), 51.3 (CH₃), 52.2 (CH), 56.1 (CH₃), 108.5 (CH), 114.9 (C), 129.7 (C), 134.3 (CH), 155.8 (C), 156.0 (C), 165.5 (C), 177.6 (C). IR (film): 3277, 2932, 2851, 1720, 1613, 1564, 1463, 1415, 1379, 1331, 1300, 1257, 1215, 1191, 1172, 1142, 1097, 1033, 973, 853, 805, 753, 702, 666 cm⁻¹. HRMS (ESI) m/z : calcd for C₂₀H₂₇O₅ (M+H⁺) 347.1858, found: 347.1861.

24. (1*S*,4*aS*,10*aR*)-Dimethyl 6-(allyloxy)-1,4*a*-dimethyl-1,2,3,4,4*a*,9,10,10*a*-octahydrophenanthrene-1,8-dicarboxylate (236**)**



Allyl bromide (363 mg, 3.0 mmol) was added to a stirred suspension of **220** (540 mg, 1.56 mmol) and K_2CO_3 (276 mg, 2 mmol) in dry acetone (10 mL) under argon atmosphere. The mixture was heated under reflux for 12 h. Then, the solvent was evaporated in vacuo, ether (40 mL) was added and the mixture was washed with water (2 x 10 mL) and brine (1 x 10 mL). The organic phase was dried over anhydrous Na_2SO_4 and concentrated to give a crude product which was purified by flash chromatography (5% AcOEt/hexanes) to give 542 mg (90%) of compound **236** as a colourless syrup. $[\alpha]_D^{25} = +19.2$ (c 1.0, $CHCl_3$). 1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 1.02 (s, 3H), 1.05 (ddd, $J = 13.5, 13.6, 4.3$ Hz, 1H), 1.25 (s, 3H), 1.34 (ddd, $J = 13.5, 13.5, 4.1$ Hz, 1H), 1.50 (br d, $J = 12.2$ Hz, 1H), 1.83 (dddd, $J = 11.4, 6.0, 4.3, 3.1$ Hz, 1H), 1.97 (qd, $J = 12.7, 5.1$ Hz, 1H), 2.15 – 2.30 (m, 3H), 2.90 (ddd, $J = 16.7, 12.7, 6.3$ Hz, 1H), 3.10 (br dd, $J = 16.7, 4.6$ Hz, 1H), 3.64 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 4.50 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 5.26 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H), 5.39 (d, $J = 17.3$ Hz, 1H), 6.03 (ddd, $J = 17.3, 10.5$ and 7.3 Hz, 1H), 7.01 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 7.18 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 20.0 (CH_2), 20.8 (CH_2), 22.8 (CH_3), 28.4 (CH_3), 30.0 (CH_2), 37.4 (CH_2), 39.2 (C), 39.9 (CH_2), 43.8 (C-4), 51.2 (CH_3), 51.8 (CH), 52.3 (CH_3), 68.9 (CH_2), 113.5 (CH), 116.9 (CH), 117.7 (CH_2), 129.4 (C), 131.0 (CH), 133.1 (CH), 150.9 (C), 156.0 (C), 168.5 (C), 177.7 (C). IR (film): 2951, 1735, 1602, 1456, 1435, 1307, 1435, 1307, 1285, 1227, 1205, 1161, 1141, 1086, 1035, 998 cm^{-1} . HRMS (ESI) m/z : calcd for $C_{23}H_{31}O_5$ ($M+H^+$) 387.2171, found: 387.2168.

(1*S*,4*aS*,10*aR*)-Methyl 6-(allyloxy)-8-(hydroxymethyl)-1,4*a*-dimethyl-1,2,3,4,4*a*,9,10,10*a*-octahydrophenanthrene-1-carboxylate (**240**)



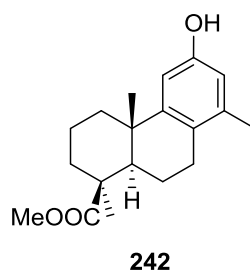
$LiAlH_4$ (60 mg, 1.57 mmol) was added to a stirred solution of **236** (175 mg, 0.45 mmol) in dry Et_2O (10 mL) cooled to -50 $^{\circ}C$ and the reaction mixture was kept stirred under an argon atmosphere for 30 min, at which time TLC showed no remaining starting material. Then, 2 N HCl (0.5 mL) was added slowly at -50 $^{\circ}C$, and the mixture was extracted with Et_2O (2 x 20 mL). The organic phase was washed with brine (2 x 10 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4 , and the solvent was evaporated to give 153 mg of pure **240** (93%) as a

colourless syrup. $[\alpha]_D^{25} = +14.7$ (c 1.1, CHCl_3). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 1.03 (s, 3H), 1.07 (ddd, $J = 13.6, 13.6, 4.3$ Hz, 1H), 1.26 (s, 3H), 1.33 (ddd, $J = 13.5, 13.5, 4.1$ Hz, 1H), 1.50 (br d, $J = 12.2$ Hz, 1H), 1.62 (m, 1H), 1.84 – 2.06 (m, 2H), 2.16 – 2.30 (m, 3H), 2.89 (ddd, $J = 16.2, 12.6, 6.4$ Hz, 1H), 3.10 (br dd, $J = 16.2, 4.6$ Hz, 1H), 3.85 (s, 3H), 4.50 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 4.59 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H), 4.63 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H), 5.25 (d, $J = 10.5$ Hz, H-11), 5.38 (d, $J = 17.3$ Hz, 1H), 6.04 (ddd, $J = 17.3, 10.5$ and 7.5 Hz, 1H), 6.80 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 6.84 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 20.0 (CH_2), 20.6 (CH_2), 22.8 (CH_3), 27.5 (CH_2), 28.5 (CH_3), 37.5 (CH_2), 38.9 (C), 39.8 (CH_2), 43.9 (C), 51.2 (CH_3), 52.3 (CH), 63.3 (CH_2), 68.8 (CH_2), 111.1 (CH), 111.6 (CH), 117.5 (CH_2), 125.5 (C), 133.5 (CH), 139.5 (C), 150.0 (C), 156.8 (C), 177.8 (C). IR (film): 3425, 2932, 2900, 1723, 1605, 1460, 1379, 1327, 1294, 1220, 1191, 1191, 1154, 1106, 1045, 978, 926, 847, 771 cm^{-1} . HRMS (ESI) m/z : calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{O}_4$ ($\text{M}+\text{H}^+$) 359.2222, found: 359.2225.

Treatment of alcohol **240** with Et_3SiH and PdCl_2

To a stirred solution of alcohol **240** (247 mg, 0.69 mmol) in dry MeOH (5 mL) was added successively triethylsilane (1 mL, 6.27 mmol) and a catalytic amount of palladium (II) chloride (10 mg) under an argon atmosphere. The resulting mixture was stirred for 45 min at room temperature, at which time TLC showed no starting material. Then the solvent was removed under vacuum, and the resulting crude product was directly purified by flash chromatography (5% AcOEt / hexane) to give phenol **242** (96 mg, 46%) and ether **241** (112 mg, 47%).

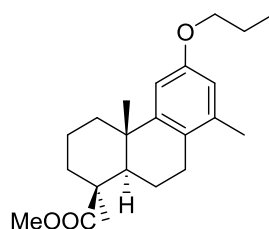
(1*S*,4*aS*,10*aR*)-Methyl 6-hydroxy-1,4*a*,8-trimethyl-1,2,3,4,4*a*,9,10,10*a*-octahydrophenanthrene-1-carboxylate (**242**).



Colourless syrup. $[\alpha]_D^{25} = +14.6$ (c 0.9, CHCl_3). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 1.02 (s, 3H), 1.05 (ddd, $J = 13.6, 13.6, 4.3$ Hz, 1H), 1.26 (s, 3H), 1.34 (ddd, $J = 13.4, 13.4, 4.1$ Hz, 1H), 1.48 (br d, $J = 12.4$ Hz, 1H), 1.60 (m, 1H), 1.85 – 2.05 (m, 2H), 2.15 (s, 3H),

2.15 – 2.29 (m, 3H), 2.45 (ddd, $J = 16.7, 12.7, 6.3$ Hz, 1H), 2.73 (br dd, $J = 16.7, 4.6$ Hz, 1H), 3.65 (s, 3H), 4.51 (br s, 1H), 6.49 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 6.62 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 19.9 (CH₃), 20.0 (CH₂), 20.8 (CH₂), 22.7 (CH₃), 28.5 (CH₃), 28.8 (CH₂), 37.5 (CH₂), 38.6 (C), 39.7 (CH₂), 44.0 (C), 51.2 (CH₃), 52.2 (CH), 109.7 (CH), 114.5 (CH), 126.2 (C), 137.7 (C), 149.7 (C), 153.1 (C), 177.9 (C). IR (film): 3435, 2931, 2852, 1725, 1700, 1608, 1468, 1447, 1379, 1328, 1304, 1246, 1223, 1193, 1144, 1026, 997, 970, 849, 771 cm⁻¹. HRMS (ESI) m/z : calcd for C₁₉H₂₇O₃ (M+H⁺) 303.1960, found: 303.1957.

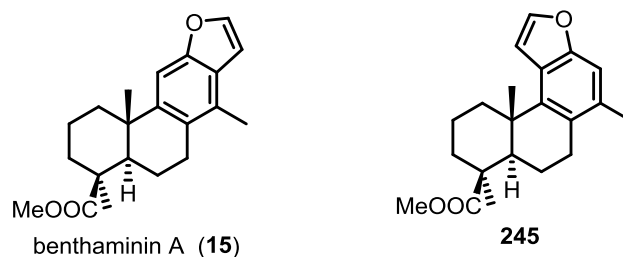
(1*S*,4*aS*,10*aR*)-Methyl 1,4*a*,8-trimethyl-6-propoxy-1,2,3,4,4*a*,9,10,10*a*-octahydrophenanthrene-1-carboxylate (241).



241

Colourless oil. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +16.3$ (c 1.0, CHCl₃). ^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 1.01 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H), 1.04 (s, 3H), 1.05 (ddd, $J = 13.6, 13.6, 4.3$ Hz, 1H), 1.26 (s, 3H), 1.35 (ddd, $J = 13.4, 13.4, 4.1$ Hz, 1H), 1.49 (br d, $J = 12.3$ Hz, 1H), 1.61 (m, 1H), 1.75 (sext, $J = 7.1$ Hz, 2H), 1.84 – 2.06 (m, 2H), 2.17 (s, 3H), 2.16 – 2.30 (m, 3H), 2.47 (ddd, $J = 16.8, 12.7, 6.3$ Hz, 1H), 3.10 (br dd, $J = 16.8, 4.6$ Hz, 1H), 3.65 (s, 3H), 3.86 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 6.57 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 6.69 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 20.1 (CH₂), 20.2 (CH₃), 20.9 (CH₂), 22.7 (CH₂), 22.8 (CH₃), 28.5 (CH₃), 28.8 (CH₂), 37.5 (CH₂), 38.7 (C), 39.8 (CH₂), 44.0 (C), 51.2 (CH₃), 52.3 (CH), 69.4 (CH₂), 109.4 (CH), 113.6 (CH), 126.1 (C), 137.3 (C), 149.4 (C), 156.9 (C), 177.9 (C). IR (film): 2933, 2873, 1745, 1604, 1583, 1468, 1378, 1299, 1273, 1234, 1190, 1143, 1108, 1059, 1028, 978, 858, 771 cm⁻¹. HRMS (ESI) m/z : calcd for C₂₂H₃₃O₃ (M+H⁺) 345.2430, found: 345.2427.

(1*S*,4*aS*,10*aR*)-Methyl 6-hydroxy-8-(hydroxymethyl)-1,4*a*-dimethyl-1,2,3,4,4*a*,9,10,10*a*-octahydrophenanthrene-1-carboxylate (244).

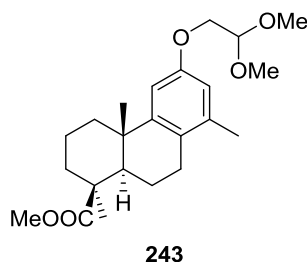


LiAlH₄ (0.5 g, 13.15 mmol) was added to a stirred solution of **220** (1.2 g, 3.46 mmol) in dry diethyl ether (60 mL) cooled at -15 °C, and the mixture was stirred at this temperature under an argon atmosphere for 3 h. Then, 2 N HCl (15 mL) was slowly added and the mixture was diluted with Et₂O (20 mL) and the phases were shaken and separated. The organic phase was washed with water (2 x 10 mL) and brine (2 x 10 mL) and dried over anhydrous Na₂SO₄. Removal of the solvent under vacuum afforded a crude product which was directly purified by flash chromatography on silica gel (20% AcOEt/hexane) to give pure phenol **244** (790 mg, 72%) as a white solid and 187 mg (15 %) of starting material. $[\alpha]_D^{25} = +12.8$ (c 1.1, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 1.00 (s, 3H), 1.04 (ddd, *J* = 13.6, 13.6, 4.3 Hz, 1H), 1.26 (s, 3H), 1.32 (ddd, *J* = 13.6, 13.6, 4.2 Hz, 1H), 1.48 (br d, *J* = 12.3 Hz, 1H), 1.60 (m, 1H), 1.83 – 2.04 (m, 2H), 2.10 – 2.30 (m, 3H), 2.52 (ddd, *J* = 16.1, 12.6, 6.4 Hz, 1H), 2.78 (br dd, *J* = 16.1, 4.6 Hz, 1H), 3.64 (s, 3H), 4.56 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H), 4.61 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H), 6.70 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 6.75 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H). ¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 20.0 (CH₂), 20.6 (CH₂), 22.8 (CH₃), 27.4 (CH₂), 28.5 (CH₃), 37.5 (CH₂), 38.7 (C), 39.7 (CH₂), 43.9 (C), 51.3 (CH₃), 52.3 (CH), 63.0 (CH₂), 111.5 (CH), 111.9 (CH), 124.9 (CH₂), 139.7 (C), 150.2 (CH), 153.8 (C), 177.9 (C). IR (film): 3397, 2930, 2852, 1723, 1611, 1460, 1378, 1301, 1220, 1193, 1144, 1106, 1033, 979, 862, 780 cm⁻¹. HRMS (ESI) *m/z*: calcd for C₁₉H₂₇O₄ (M+H⁺) 319.1909, found: 319.1912.

Synthesis of methyl phenol **242** from hydroxy phenol **244**.

Triethylsilane (3 mL, 18.8 mmol) and a catalytic amount of palladium (II) chloride (30 mg) was added successively to a stirred solution of alcohol **244** (630 mg, 1.97 mmol) in dry MeOH (14 mL) under an argon atmosphere. The resulting mixture was stirred for 40 min at room temperature, at which time TLC showed no starting material. After removing the solvent under vacuum, the resulting crude product was directly purified by flash chromatography (5% AcOEt/hexane) to give methyl phenol **242** (566 mg, 95%).

(1*S*,4*aS*,10*aR*)-Methyl 6-(2,2-dimethoxyethoxy)-1,4*a*,8-trimethyl-1,2,3,4,4*a*,9,10,10*a*-octahydrophenanthrene-1-carboxylate (**243**).

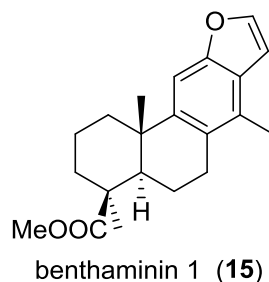


2-Bromo-1,1-dimethoxyethane (560 mg, 3.35 mmol) was added to a stirred suspension of phenol **242** (253 mg, 0.837 mmol) and K_2CO_3 (288 mg, 2.08 mmol) in dry DMF (10 mL) under argon atmosphere. The mixture was heated at 130 °C for 8 h. Then, the reaction mixture was quenched by addition of water (10 mL) at room temperature and Et_2O (40 mL). The layers were shaken and the organic phase was washed with water (2 x 10 mL) and brine (1 x 10 mL). The organic phase was dried over anhydrous Na_2SO_4 and concentrated to give a crude product which was purified by flash chromatography (10% AcOEt/hexane) to give 297 mg (91%) of acetal **243** as a colourless syrup. $[\alpha]_D^{25} = +14.1$ (c 0.9, $CHCl_3$). 1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 1.02 (s, 3H), 1.04 (ddd, $J = 13.6, 13.6, 4.3$ Hz, 1H), 1.26 (s, 3H), 1.33 (ddd, $J = 13.2, 13.2, 4.0$ Hz, 1H), 1.48 (br d, $J = 12.2$ Hz, 1H), 1.60 (m, 1H), 1.84 – 2.05 (m, 2H), 2.16 (s, 3H), 2.14 – 2.29 (m, 3H), 2.45 (ddd, $J = 16.8, 12.7, 6.3$ Hz, 1H), 2.73 (br dd, $J = 16.8, 4.6$ Hz, 1H), 3.43 (s, 6H), 3.64 (s, 3H), 3.95 (d, $J = 5.2$ Hz, 2H), 4.68 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H), 6.59 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 6.72 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 20.0 (CH_2), 20.1 (CH_3), 20.8 (CH_2), 22.7 (CH_3), 28.5 (CH_3), 28.8 (CH_2), 37.5 (CH_2), 38.7 (C), 39.8 (CH_2), 43.9 (C), 51.2 (CH_3), 52.3 (CH), 53.93 (CH_3), 53.96 (CH_3), 67.5 (CH_2), 102.2 (CH), 109.7 (CH), 113.6 (CH), 126.8 (C), 137.4 (C), 149.5 (C), 156.3 (C), 177.8 (C). IR (film): 2928, 2852, 1740, 1604, 1470, 1378, 1300, 1273, 1236, 1191, 1143, 1110, 1094, 1079, 980, 859, 771 cm^{-1} . HRMS (ESI) m/z : calcd for $C_{23}H_{35}O_5$ ($M+H^+$) 391.2484, found: 391.2486.

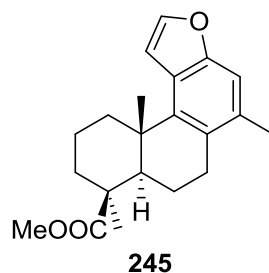
Synthesis of benthaminin 1 (15) from 243.

Amberlyst A-15 (350 mg) was added to a solution of acetal **243** (250 mg, 0.64 mmol) in CH_2Cl_2 (10 mL) cooled at -15 °C and the reaction mixture was stirred for 16 h at this temperatures, at which time TLC showed no starting material. Then the mixture was filtered

and directly purified by flash chromatography (2% AcOEt/hexane) to give 183 mg (88%) of an irresolvable mixture (1.4:1) of benthaminin 1 (**15**) and its regioisomer **245**.

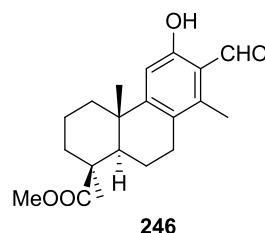


Signals assignable to *benthaminin 1* (**15**): ^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 1.10 (s, 3H), 1.31 (s, 3H), 2.35 (s, 3H), 3.680 (s, 3H), 6.71 (br s, 1H), 7.33 (s, 1H), 7.52 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H).



Signals assignable to (*7aR,8S,11aS*)-methyl 5,8,11a-trimethyl-6,7,7a,8,9,10,11,11a-octahydrophenanthro[3,4-*b*]furan-8-carboxylate (**245**): 1.27 (s, 3H), 1.55 (s, 3H), 2.31 (s, 3H), 3.681 (s, 3H), 6.87 (br s, 1H), 7.19 (s, 1H), 7.48 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H).

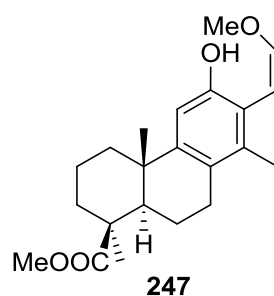
(1S,4aS,10aR)-Methyl 7-formyl-6-hydroxy-1,4a,8-trimethyl-1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahydrophenanthrene-1-carboxylate (246).



To a stirred solution of phenol **242** (309 mg, 1.02 mmol) in freshly distilled THF (20 mL) was added anhydrous magnesium chloride (284 mg, 3.02 mmol) and triethylamine (710 mg, 7.03 mmol). After being stirred for 5 min, paraformaldehyde (500 mg) was added at

room temperature. The resulting mixture was stirred under reflux for 16 h, at which time TLC showed no starting material. Then, the reaction mixture was cooled to room temperature and quenched with 2 M aqueous HCl solution (10 mL). The solvent was removed in vacuum and Et₂O–water (40–10 mL) was added. The phases were shaken and separated, and the organic phase was washed with water (10 mL), brine (10 mL) and dried over anhydrous Na₂SO₄. Removal of the solvent under vacuum afforded a crude product which was directly purified by flash chromatography (15% AcOEt/hexane) to give aldehyde **246** as a colourless syrup (310 mg, 92 %). $[\alpha]_D^{25} = +36.3$ (c 1.2, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 1.05 (s, 3H), 1.06 (ddd, *J* = 13.6, 13.6, 4.2 Hz, 1H), 1.29 (s, 3H), 1.34 (ddd, *J* = 13.2, 13.2, 3.8 Hz, 1H), 1.47 (dd, *J* = 12.5, 1.7 Hz, 1H), 1.65 (m, 1H), 1.88 – 2.07 (m, 2H), 2.21 (m, 1H), 2.25 – 2.33 (m, 2H), 2.45 (s, 3H), 2.51 (ddd, *J* = 16.5, 12.7, 6.5 Hz, 1H), 2.82 (ddd, *J* = 16.5, 5.4, 1.5 Hz, 1H), 3.67 (s, 3H), 6.79 (s, 1H), 10.38 (s, 1H), 11.74 (s, 1H). ¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 13.4 (CH₃), 19.9 (CH₂), 20.7 (CH₂), 22.4 (CH₃), 28.4 (CH₃), 29.05 (CH₂), 37.3 (CH₂), 39.4 (CH₂), 39.6 (C), 43.0 (C), 51.3 (CH₃), 51.6 (CH), 112.4 (CH), 117.1 (C), 125.9 (C), 140.3 (C), 159.4 (C), 160.7 (C), 177.5 (C), 195.1 (CH). IR (film): 2965, 2944, 1720, 1642, 1610, 1463, 1380, 1324, 1290, 1226, 1187, 1137, 1074, 1046, 981, 885, 774, 743 cm⁻¹. HRMS (ESI) *m/z*: calcd for C₂₀H₂₇O₄ (M+H⁺) 331.1909, found: 331.1910.

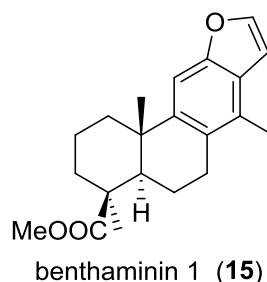
(1*S*,4*aS*,10*aR*)-Methyl 6-hydroxy-7-((*Z*)-2-methoxyvinyl)-1,4*a*,8-trimethyl-1,2,3,4,4*a*,9,10,10*a*-octahydrophenanthrene-1-carboxylate (247**).**



To a solution of methoxymethyltriphenylphosphine chloride (560 mg, 1.63 mmol) in dry THF (7 mL), was added, at 0°C, *t*-BuOK (450 mg, 4.1 mmol), and the red solution was stirred at 0 °C for 20 min. Then a solution of aldehyde **246** (137 mg, 0.41 mmol) in THF (10 mL) was added and the mixture was stirred and the red solution slowly become colourless and a white solid was deposited. After 3 h of reaction, TLC showed no starting material. Then, the solvent was removed in vacuum, Et₂O–water (25–10 mL) was added to the crude

product, and the phases were shaken and separated. The organic phase was washed with brine (2 x 10 mL), dried over Na₂SO₄ and the solvent was evaporated. Purification by column chromatography (7% AcOEt/ hexane) afforded enol ether **247** (130 mg 89 %), as the sole product of reaction. $[\alpha]_D^{25} = +15.6$ (c 1.1, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 1.03 (s, 3H), 1.07 (ddd, $J = 13.3, 13.3, 3.9$ Hz, 1H), 1.25 (s, 3H), 1.33 (ddd, $J = 13.5, 13.5, 3.8$ Hz, 1H), 1.46 (br d, $J = 12.6$ Hz, 1H), 1.60 (m, 1H), 1.83 – 2.05 (m, 3H), 2.12 (s, 3H), 2.17 – 2.29 (m, 2H), 2.48 (ddd, $J = 16.5, 12.7, 6.5$ Hz, 1H), 2.77 (ddd, $J = 16.5, 5.2$ Hz, 1H), 3.65 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 5.38 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 6.20 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 6.34 (s, 1H), 6.80 (s, 1H). ¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 16.4 (CH₃), 20.1 (CH₂), 21.1 (CH₂), 22.7 (CH₃), 28.5 (CH₃), 29.8 (CH₂), 37.6 (CH₂), 38.5 (C), 39.8 (CH₂), 43.9 (C), 51.2 (CH₃), 52.2 (CH), 80.4 (CH), 102.5 (CH), 111.8 (CH), 118.7 (C), 126.1 (C), 135.0 (C), 145.0 (C), 149.0 (C), 151.6 (C), 177.9 (C). IR (film): 3393, 2935, 1722, 1650, 1609, 1561, 1467, 1379, 1293, 1192, 1140, 1100, 1040, 980, 760, cm⁻¹. HRMS (ESI) m/z : calcd for C₂₂H₃₁O₄ (M+H⁺) 359.2222, found: 359.2219.

Synthesis of benthaminin 1 (15) from from enol ether 247.



To a solution of enol ether **247** (35 mg, 0.097 mmol) in CH₂Cl₂ was added Amberlyst A-15 (60 mg) and the reaction mixture was stirred at reflux for 30 min, at which time TLC showed no starting material. Then the mixture was filtered and directly purified by flash chromatography (2% AcOEt/hexane) to give compound **15** (24 mg, 76%) as a colourless syrup $[\alpha]_D^{25} = +14.4$ (c 1.0, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 1.09 (ddd, $J = 13.2, 13.2, 3.6$ Hz, 1H), 1.10 (s, 3H), 1.30 (s, 3H), 1.43 (ddd, $J = 13.9, 13.9, 3.4$ Hz, 1H), 1.57 (br d, $J = 12.5$ Hz, 1H), 1.65 (m, 1H), 1.89 – 2.11 (m, 3H), 2.21 – 2.36 (m, 2H), 2.36 (s, 3H), 2.65 (ddd, $J = 17.0, 12.8, 6.5$ Hz, 2H), 2.96 (dd, $J = 16.6, 5.2$ Hz, 1H), 3.68 (s, 3H), 6.71 (br s, 1H), 7.33 (s, 1H), 7.51 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H). ¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ 15.9 (CH₃), 20.2 (CH₂), 21.0 (CH₂), 22.5 (CH₃), 28.5 (CH₃), 29.4 (CH₂), 37.5 (CH₂), 39.1 (C), 40.4 (CH₂), 44.0 (C), 51.2 (CH₃), 52.4 (CH), 104.9 (CH), 105.6 (CH), 125.4 (C), 127.92

(C), 127.97 (C), 144.2 (CH), 145.7 (C), 153.5 (C), 177.8 (C). IR (film): 2925, 2853, 1727, 1463, 1378, 1272, 1227, 1191, 1150, 1140, 1047, 1016, 731 cm^{-1} . HRMS (ESI) m/z : calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{O}_3$ ($\text{M}+\text{H}^+$) 327.1960, found: 327.1961.

PARTE II
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
BIOLÓGICA

Generalidades sobre el cáncer

El cáncer sigue siendo una de las principales causas de morbilidad en la actualidad. En 2015 provocó alrededor de 8,8 millones de defunciones en todo el mundo. Se identifican cinco tipos de cáncer responsables del mayor número de fallecimientos: cáncer pulmonar (1,69 millones de muertes), cáncer hepático (788.000 muertes), cáncer colorrectal (774.000 muertes), cáncer gástrico (754.000 defunciones) y de mama (571.000 muertes) (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2017). Las estimaciones poblacionales indican que el número de casos nuevos probablemente aumente en un 70 % en las próximas décadas, alcanzando los 24 millones de casos en el año 2035.¹⁴²

En España el número total de casos ronda los 250.000 según los últimos datos de Redecan de los que se hace eco la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) y en concreto, sólo en 2015 se registraron 247.771 casos (148.827 en varones y 98.944 en mujeres). Los tipos de cáncer más diagnosticados durante ese año fueron: colorrectal (41.441 casos), próstata (33.370 casos), pulmón (28.347 casos), mama (27.747 casos) y vejiga (21.093 casos).

El cáncer, también denominado tumor maligno o neoplasia, es un conglomerado heterogéneo de enfermedades (más de 100) con diferentes tipos de alteraciones genéticas (daños en el ADN) que culminan con una proliferación celular sin control, con la posible invasión y proliferación desde el lugar de origen (sitio primario) a otros tejidos del cuerpo¹⁴³. Este grupo de enfermedades pueden originarse en cualquier tejido del cuerpo humano, cuando las células muestran un comportamiento inusual y comienzan a dividirse sin control, viéndose truncado su mecanismo de muerte celular programada o apoptosis. Además, estas células son capaces no solo de aumentar su número más allá de los límites fisiológicos normales, sino

¹ html Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2017). Cáncer. Nota descriptiva. Recuperado el 19 de septiembre de 2017, de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>

también de invadir otros tejidos de manera local o a distancia, propagándose a través de los vasos sanguíneos y linfáticos.^{144,145}

En el caso de los tumores sólidos, la angiogénesis es la división incontrolada de estas células que causa la formación progresiva de una masa en la que se originan nuevos vasos sanguíneos que la irrigan manteniendo su integridad. Además, a medida que el tumor va creciendo, algunas células cancerígenas pueden separarse de la masa tumoral y viajar a través de la circulación sanguínea o linfática extendiéndose a otras partes del cuerpo desarrollando allí nuevos tumores. Este proceso se denomina metástasis (American Cancer Society, 2015)¹⁴⁶.

El cáncer posee diferentes propiedades según el tejido en el que se desarrolle. En función del origen, el cáncer se puede clasificar en: carcinomas, si se origina en células epiteliales; sarcomas, si se desarrolla desde células mesodérmicas (por ejemplo, huesos o músculo); o adenocarcinomas, si se produce en tejidos glandular,

Cáncer de colon

El cáncer de colon, también conocido como cáncer colorrectal, corresponde a todos aquellos tumores ubicados en el intestino grueso, pudiendo localizarse desde la válvula ileocecal hasta el recto.

El cáncer de colon es el tercer tipo de cáncer más común en hombres representando un 10% del total de casos y, el segundo en mujeres, siendo ligeramente inferior con un 9,2% del total. Además, representa un 8% de las muertes causadas por el cáncer a nivel global, lo que supone la cuarta causa de muerte por esta enfermedad. Sin embargo, en España es el primer cáncer más diagnosticado, representando un 14,98% del total de casos.

1-1-1.1 Factores de riesgo

Los diferentes factores de riesgo del cáncer de colon suelen estar relacionados entre sí. Aunque en la actualidad puede ser detectado de forma precoz mediante pruebas de

¹⁴⁴ Hejmadi, M., *Introduction to Cancer Biology*, Ventus Publishing 2010.

¹⁴⁵ Raymond, W. R., *Cancer Biology*, Oxford University Press 2007.

¹⁴⁶ Disponible en: <https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/what-is-cancer.html>. Acceso el 30 de enero de 2017

screening, uno de sus principales factores de riesgo es la edad y se ha demostrado que la incidencia de cáncer de colon aumenta a partir de los 50 años.

En general, el estilo de vida del individuo juega un papel muy importante en la aparición de este tipo de cáncer. Se ha demostrado que las dietas ricas en carne roja aumentan el riesgo de cáncer de colon, sobre todo en colon izquierdo. Los estudios epidemiológicos que se han llevado a cabo muestran una asociación directa entre la presencia de cáncer de colon y una dieta rica en carnes rojas con carencia en fibra, o el consumo de carne ahumada y procesada.

El tabaquismo es otra de las causas de aparición de este cáncer y se ha asociado con una mayor presencia de pólipos, como el adenomatoso o el serrado.

Entre los factores que incrementan las posibilidades de padecer cáncer de colon destacamos los siguientes: el sobrepeso y la obesidad (según el “World Cancer Research Fund International” (WCRFI), por cada unidad de índice de masa corporal aumenta el riesgo de padecer cáncer de colon, entre 2% y 3%), una baja actividad física, el consumo de alcohol, la diabetes mellitus, la falta de sueño y una dieta desequilibrada. Los factores genéticos representan un 15-20% de todos los casos de cáncer colorrectal. Existen mutaciones o desregulación de la expresión de genes supresores de tumores como APC, SMAD 2 o p53, y en oncogenes como K-Ras u otras rutas, que se encuentran implicadas en el desarrollo tumoral y en la metástasis.

1.1.2. Clasificación del cáncer de colon

El cáncer de colon se puede dividir en dos categorías principales, en función de si la localización del tumor es proximal o distal al ángulo esplénico del colon. Los tumores proximales son más estables genéticamente y parecen seguir los mismos mecanismos que la enfermedad de Lynch, mientras que los tumores distales muestran mayor inestabilidad genética y parecen seguir los mismos mecanismos que los síndromes polipósicos. Además, los proximales son más frecuentes en personas de edad avanzada y en mujeres .

1.1.3. Terapia del cáncer de colon

Para el tratamiento del cáncer de colon se sigue un protocolo que recoge las indicaciones o limitaciones de tratamiento, en función de una serie de factores: el estado

general del paciente, la localización del tumor y, en la fase en la que se encuentra la enfermedad, infiltración en la pared del colon o recto, afectación ganglionar, afectación de órganos próximos y diseminación de la enfermedad.

Es muy importante tener en cuenta la existencia de otras enfermedades que puedan dificultar la realización de algún tratamiento específico en los pacientes que padecen cáncer de colon.

Los tratamientos empleados con mayor frecuencia en el tratamiento del cáncer de colon son la cirugía y la quimioterapia y depende del estadio de la enfermedad:

- En el estadio A el tratamiento es solamente quirúrgico.
- En el estadio B la cirugía puede ser el único tratamiento, pero los pacientes con factores de mal pronóstico se benefician de una quimioterapia adyuvante o complementaria a la cirugía.
- En el estadio C el tratamiento quirúrgico es insuficiente para la curación de la enfermedad y se debe realizar una quimioterapia adyuvante en todos los casos, salvo contraindicaciones médicas.
- En el estadio D la quimioterapia es el tratamiento principal. Además, si es posible llevar a cabo una resección quirúrgica completa de las metástasis, la supervivencia del paciente se prolonga de forma significativa.

Cáncer de mama

El cáncer de mama es un proceso oncológico, en el que células sanas de la glándula mamaria degeneran, proliferan y se multiplican hasta constituir un tumor

Los carcinomas de mama pueden aparecer en cualquier edad de la vida, pero son más frecuentes en mujeres de edad avanzada. Suelen ser escasos en mujeres menores de 40 años y son raros en menores de 30 años, aunque ha habido un incremento de los casos a estas edades en los últimos años.

Este tipo de cáncer es el tumor maligno más frecuente en mujeres, con 1,7 millones de nuevos casos diagnosticados en 2012. Supone un 25,2% de los cánceres diagnosticados en mujeres, y en general, se sitúa en segunda posición con un 11,9% del total de la población afectada por cáncer. Según datos estadísticos, y debido al aumento de su

incidencia, se prevé que el cáncer de mama pueda afectar hasta a una de cada ocho mujeres en los próximos años

1.2.1. Factores de riesgo

Los factores de riesgo del cáncer de mama pueden clasificarse en:

- No modificables (factores genéticos, antecedentes familiares, edad, raza, edad de menarquia).
- Modificables (índice de masa corporal, historia reproductiva, dieta, ejercicio, tabaquismo, alcohol, consumo de estrógenos exógenos).
- Potencialmente modificables (edad al primer embarazo, lactancia, edad de menopausia)

Los factores de riesgo más relevantes son:

- La edad: el envejecimiento es el principal factor de riesgo para padecer cáncer de mama. A mayor longevidad, mayor riesgo de sufrir cáncer de mama.
- El factor hereditario: entre un 10 y un 15% de los casos de cáncer de mama son hereditarios. El criterio hereditario se refiere a pacientes cuyas familias presentan varias mujeres (tres o más), emparentadas en primer y segundo grado, que padecen o han padecido cáncer de mama. En un tercio de estas familias se certifica una mutación en los genes BRCA-1 o BRCA-2, siendo ambos marcadores de riesgo de progresión tumoral.
- La historia personal: haber padecido anteriormente un cáncer de mama aumenta el riesgo de padecer un segundo cáncer de mama y este factor constituye un 1% anual (10% cada 10 años desde el primero).
- Historia reproductiva personal: la nuliparidad se asocia con mayor riesgo de padecer cáncer de mama. Las mujeres con al menos un hijo tienen un 25% menos de riesgo de padecer cáncer de mama que las nulíparas. En el caso de las mujeres con cinco o más hijos el riesgo se reduce hasta el 50%.
- Factores hormonales: la exposición a hormonas, tanto exógenas como endógenas, condiciona el riesgo de padecer cáncer de mama. La menarquía tardía y la menopausia precoz se asocian a un menor riesgo de padecer cáncer de mama. Parece

que la explicación reside en el hecho de que las mamas están expuestas durante menos tiempo a las hormonas sexuales femeninas ováricas

- Factores ambientales y de ingesta: el consumo de alcohol la obesidad el índice de masa corporal y el ejercicio físico influyen en el riesgo de padecer cáncer de mama. Este último puede reducir el riesgo de padecer la enfermedad entre un 10 y un 70%, dependiendo del nivel de actividad

1.2.2. Clasificación del cáncer de mama

Desde el punto de vista histológico, la OMS clasifica los tumores que afectan a la mama en ocho grupos principales: epiteliales, mioepiteliales, mesenquimales, fibroepiteliales, linfomas malignos, tumores del pezón, metastásicos y masculinos. La mayoría de los cánceres de mama son epiteliales y se suelen originar en la unidad ducto-lobulillar terminal, por lo que reciben el nombre de adenocarcinomas. Éstos representan un 90% de las neoplasias malignas de mama, afectando en un 70-80% de los casos al epitelio ductal, y entre un 5 y un 10% al epitelio lobulillar. Los adenocarcinomas, a su vez, se dividen principalmente en dos grupos: carcinomas *in situ* e invasivos. Estos últimos son capaces de invadir tejidos adyacentes y de metastatizar a zonas distantes.

Gracias a técnicas innovadoras se pueden analizar los genes que forman parte del cáncer de mama, dando lugar a una clasificación más precisa del cáncer de mama, que se correlaciona con el riesgo de recaída de la enfermedad. La clasificación molecular establece cuatro tipos de cáncer de mama: luminal A, luminal B, HER 2 y basal o triple negativo. Los tumores luminales presentan receptores hormonales, en los HER₂ se expresa el gen HER2 y en los triples negativos no se expresan ni receptores hormonales ni HER2. El subtipo luminal A es el de mejor pronóstico y el triple negativo el de peor pronóstico.

Para comprender mejor el origen del cáncer, es necesario entender cómo se dividen las células, es decir, cómo se produce el ciclo celular.

1.2.3 terapia del cáncer de mama

Los tratamientos empleados con mayor frecuencia en el cáncer de mama son la **cirugía**, la **radioterapia**, la **quimioterapia** y la **hormonoterapia**. Dependiendo del tipo de cáncer que presenta el/la paciente, y atendiendo a la clasificación molecular ya mencionada, encontramos los siguientes tipos de tratamientos:

1.- Para tumores hormonales

Son los tumores con receptores hormonales positivos para estrógenos y progesterona, llamados también hormono-dependientes. Suponen el 66% de todos los cánceres de mama y son más característicos de mujeres postmenopáusicas. El tratamiento más idóneo es la hormonoterapia, quedando la quimioterapia como una opción terapéutica para casos y situaciones particulares. Son los tumores de mejor pronóstico.

2.- Para tumores HER2 positivos

La célula tumoral tiene la proteína HER2 sobre-expresada y no contiene receptores para hormonas (estrógenos ó progesterona). Su incidencia estimada es del 25% de los tumores de mama. Debido a la presencia actual de fármacos dirigidos frente a la proteína HER2, como el Trastuzumab (Herceptin) y, más recientemente, el Lapatanib, se ha mejorado mucho el pronóstico de estas pacientes.

3.- Para tumores triple negativos

La célula tumoral no posee receptores para hormonas (estrógenos o progesterona), ni tiene sobreexpresión de la proteína HER2. Su incidencia es mucho más reducida y suponen el 15% aproximadamente de todos los cánceres de mama. En estos casos, la quimioterapia es la única opción terapéutica conocida hasta el momento.

Cáncer de pulmón

Es el tipo de cáncer más frecuente, siendo actualmente el cáncer más diagnosticado en hombres y el cuarto más diagnosticado en mujeres. Además, es el cáncer con mayor tasa de mortalidad, considerando que una de cada cinco muertes producidas por cáncer es debida al cáncer de pulmón.

1.2.3. Factores de riesgo

El tabaco es el factor de riesgo más importante en el desarrollo del cáncer de pulmón, ya que contiene 60 carcinógenos reconocidos por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer, de los cuales destacan los hidrocarburos aromáticos policíclicos como el benzopireno y la nitrosamina (4-metilnitrosamino-1-(3-piridil)-1-butanona o NNK). Estas sustancias inducen mutaciones en el gen p53, desregulando el ciclo celular e

induciendo el proceso de carcinogénesis. De igual modo, se ha demostrado que estas sustancias son capaces de producir carcinomas pulmonares en ratones, de las mismas características que los que se desarrollan en humanos.

Se estima que, en individuos fumadores, el riesgo de padecer cáncer de pulmón es diez veces mayor que en personas no fumadoras, y que un 18% de los fumadores desarrollará la enfermedad. En el caso de los ex fumadores el riesgo disminuye entre un 80 y un 90% para aquellos que lleven más de 15 años sin fumar. En individuos no fumadores, los factores de riesgo más importantes están relacionados con factores medioambientales, como la exposición pasiva al humo del tabaco, exposiciones a radiación ionizante o a carcinógenos relacionados con la actividad laboral (asbestos o radón) El radón se considera la segunda causa de cáncer de pulmón después del consumo de tabaco. La exposición al radón se produce principalmente por inhalación y el efecto cancerígeno que produce es debido a la emisión de partículas α en el pulmón.

1.2.4. Clasificación histológica del cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón se clasifica comúnmente en dos grupos, según la clasificación histológica de la OMS: Carcinoma de Pulmón de Células Pequeñas (CLC), o microcítico, y Carcinoma de Pulmón de Células no Pequeñas (NSCLC, del inglés non-small cell lung cancer), o no microcítico.

El CLC representa el 15% de los casos de cáncer de pulmón y se caracteriza por estar constituido por células pequeñas, con límites poco definidos y escaso citoplasma. Es el tipo más agresivo y suele estar muy diseminado en el momento del diagnóstico.

El NSCLC constituye alrededor del 85% del total de casos de cáncer de pulmón, y a su vez, se subdivide en tres grupos: adenocarcinoma, carcinoma pulmonar de células escamosas y carcinoma pulmonar de células grandes. El adenocarcinoma es el tipo de cáncer de pulmón más común tanto en fumadores y exfumadores como en no fumadores. El carcinoma pulmonar de células grandes suele ser el cáncer de pulmón de crecimiento más rápido.

Dependiendo del tamaño del tumor generado, el grado de afectación linfática y la aparición o no de metástasis distantes, el cáncer de pulmón también se puede clasificar en función de su grado de desarrollo según el método de clasificación TNM.

1.3.3. Terapia del cancer de pulmon

Como en la mayoría de los tumores, el tratamiento del cáncer de pulmón es multidisciplinar y distintas especialidades trabajan conjuntamente para combinar terapias y ofrecer al paciente las mejores posibilidades de curación. Fundamentalmente colaboran neumólogos, radiólogos, anatomopatólogos, cirujanos y oncólogos.

En el tratamiento del cáncer de pulmón se sigue un protocolo que recoge las indicaciones o limitaciones del tratamiento en función de los siguientes factores:

- Fase o estadio en la que se encuentra la enfermedad (TNM).
- Tipo de tumor: carcinoma microcítico o no microcítico.
- Características del paciente: edad, enfermedades que dificulten algún tratamiento específico, estado nutricional, etc.

Así, el tratamiento indicado por el especialista variará según cada paciente. Los tratamientos más empleados en el cáncer de pulmón son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. Además, el médico se encargará de tratar específicamente los síntomas que presenta cada enfermo.

Existen múltiples agentes activos en el tratamiento del **carcinoma de pulmón no microcítico**, que se han utilizado tanto en combinación como en monoterapia. Los más utilizados son los derivados de platino (cisplatino y carboplatino), los taxanos (paclitaxel y docetaxel), vinorelbina, gemcitabina, etopósido y pemetrexed. Para este subtipo de cáncer de pulmón los esquemas de tratamiento quimioterápico que se suelen utilizar son:

Tratamiento adyuvante (tras la cirugía)

Los pacientes sometidos a una resección completa siguen presentando un elevado riesgo de recidiva (50% en el estadio IB, 70% en el II y un porcentaje aún mayor en pacientes con tumores en estadio IIIB). Es por ello que el uso de quimioterapia adyuvante (tras la cirugía) se ha estudiado desde hace varias décadas. Los primeros estudios, que se realizaron en los años 70 y 80 del siglo XX, identificaron a los derivados del platino como agentes activos para el tratamiento de este tipo de cáncer.

En los últimos años se han realizado varios ensayos clínicos para evaluar la efectividad y forma de administración óptima de los regímenes de poliquimioterapia (basados en combinaciones con sales de platino). Es por ello que se ofrece la posibilidad de recibir quimioterapia adyuvante en aquellos pacientes operados de cáncer de pulmón en estadio II o III.

Tratamiento de la enfermedad localmente avanzada

El tratamiento del carcinoma no microcítico de pulmón localmente avanzado es un campo de investigación activa en el momento actual. Generalmente, los pacientes en estadio IIIA, según la clasificación de estadificación anatomopatológica, suelen ser sometidos a cirugía y posteriormente tratados con quimioterapia adyuvante.

A los pacientes con derrame tumoral pleural o pericárdico se les suele ofrecer quimioterapia paliativa, ya que, a pesar de que actualmente se clasifican estos casos como IIIB, el pronóstico y la evolución de estos pacientes es similar a la de aquellos con enfermedad extratorácica. De hecho, en la revisión propuesta de la clasificación TNM, estos tumores se consideran estadio IV. Para el resto de pacientes con tumores en estadio III, el tratamiento varía entre la administración de quimio y radioterapia neoadyuvantes, seguida de resección quirúrgica y un número variable de ciclos de quimioterapia de consolidación o la utilización de quimiorradioterapia concomitante.

Tratamiento de la enfermedad avanzada

El valor del tratamiento quimioterápico, para los pacientes con carcinoma no microcítico de pulmón metastásico, se puso de manifiesto a raíz de los estudios en los que se comparaba el tratamiento con quimioterapia basada en cisplatino y tratamiento de soporte sin quimioterapia. Se observó una diferencia estadísticamente significativa en supervivencia global a favor del tratamiento quimioterápico.

En los últimos años se han producido avances muy significativos en el tratamiento del cáncer de pulmón, incorporando nuevos fármacos dirigidos a dianas específicas de las células tumorales. Es el caso de los fármacos dirigidos al EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico) o al VEGF (factor de crecimiento derivado del endotelio vascular).

Ciclo celular

Se denomina ciclo celular al conjunto de sucesos altamente regulado por el que una célula origina dos células hijas. Este ciclo incluye el periodo entre dos divisiones mitóticas, además de los procesos en los que la célula aumenta su tamaño, duplica su material genético y finalmente, se divide en dos células independientes. Para que la división celular tenga éxito tienen que darse dos condiciones esenciales: la replicación del ADN tiene que ser exacta y los cromosomas replicados tienen que distribuirse correctamente entre las dos células descendientes

Clásicamente, el ciclo celular se divide en cuatro fases:

1) La fase M o denominada mitosis que comprende la división nuclear o mitosis y la citoplasmática o citocinesis.

2) La fase G1 sigue a la citocinesis y se corresponde con el intervalo entre el final de la fase M y el inicio de la síntesis de DNA, en la cual, la célula aumenta de tamaño debido a la síntesis y desarrollo de estructuras como los microtúbulos, los microfilamentos de actina, los ribosomas, las proteínas, etc.

3) A continuación está la fase S (también llamada fase de síntesis) en la que la célula duplica su contenido de DNA.

4) El ciclo termina con la fase G2 o premitótica que abarca desde el final de la fase S hasta principio de una nueva mitosis. En esta fase se reparan algunos errores que ocurren en la duplicación del ADN.

Ante determinadas condiciones, en ausencia de estímulo mitogénico, las células pueden entrar en un periodo de latencia denominado fase G0 donde permanecen durante días, semanas o años dependiendo del organismo. Este estado de latencia se debe a la ausencia de factores de crecimiento.

Las moléculas reguladoras del ciclo celular están muy conservadas durante la evolución. Existen distintas proteínas, que ejercen el control en la entrada y la progresión de las células a lo largo de las fases del ciclo celular⁴⁸, como son las quinasas dependientes de ciclinas (CDK) y ciclinas que pueden formar complejos CDK-ciclinas implicadas en la

progresión de cada fase del ciclo. Hay que destacar los denominados puntos de control del ciclo, que se caracterizan por ser zonas donde puede ocurrir la detención del transcurso normal del ciclo (arresto), y que son capaces de detectar la presencia ADN dañado, para repararlo y evitar alteraciones genéticas. Se distinguen varios puntos de control, siendo los más importantes: el punto de transición G1/S, el punto de transición G2/M y el punto de control en la mitosis en la transición de metafase a anafase.

Cuando la célula no puede reparar un daño provocado en el ADN en los distintos puntos de control, se activa un mecanismo de muerte celular programada o apoptosis que consiste en eliminar dicha célula e impedir que ese ADN dañado pase a las siguientes generaciones. Estos puntos de control son muy importantes, proporcionando una barrera contra el cáncer y representan una buena opción para la aplicación de agentes quimioterapéuticos.

Es por ello que para el desarrollo de un cáncer deben de fallar múltiples mecanismos que provocan que en la célula no se active la señalización de la apoptosis y evite la muerte incluso dividiéndose más rápidamente.

Además, las células tienen mecanismos de control capaces de frenar el ciclo celular si ocurre algún error, bien para poder ser reparado o para inducir la apoptosis cuando el daño se ha extendido. En condiciones normales no se permite la progresión del ciclo, hasta que el error no se haya corregido; sin embargo, las células tumorales tienen mutada alguna de las proteínas reguladoras y son capaces de repetir el ciclo indefinidamente, incluso sin integridad de su ADN.

Apoptosis

La apoptosis o "muerte celular programada" es un fenómeno natural, regulado fisiológicamente, y es fundamental para el desarrollo y mantenimiento de la homeostasis tisular. Se trata de un mecanismo muy importante en los organismos multicelulares, ya que ejerce un papel esencial como mecanismo de defensa cuando las células son dañadas por agentes nocivos. Se diferencia de la muerte por necrosis en que la apoptosis al ser una muerte celular programada, está controlada genéticamente y además no se produce una respuesta inflamatoria asociada.

La apoptosis es considerada como un mecanismo inherente al desarrollo celular, que se desencadena por señales fisiológicas, o bien mediante estimulaciones exógenas ambientales. Estas señales pueden actuar sobre receptores de la superficie celular y causar la activación en cascada de proteínas citoplasmáticas y como consecuencia la activación de un programa genético que conduce, generalmente, a la nucleólisis por la acción de las endonucleasas. Este mecanismo de muerte celular interviene en importantes fenómenos fisiológicos como: embriogénesis, mantenimiento de la homeostasia, renovación tisular y desarrollo y funcionamiento del sistema inmunitario.

La apoptosis puede ser activada por estímulos, como el cambio en la disponibilidad de hormonas, el estrés oxidativo, el daño en el ADN o la radiación. Hay dos vías distintas por las que los estímulos pueden activar la apoptosis: la vía intrínseca (intracelular) y la vía extrínseca (extracelular). La vía intrínseca o mitocondrial se caracteriza por ser iniciada por agentes físicos o químicos que causan daño celular, como son los fármacos quimioterapéuticos, las neurotoxinas, la radiación ultravioleta, moléculas del estrés oxidativo, etc.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Los objetivos de este último capítulo son:

1- Evaluar el efecto de los productos naturales, así como de varios intermedios de síntesis y derivados, sobre la viabilidad celular de líneas tumorales (de mama, colon y pulmón) y células normales PBMCs.

2- Determinar el mecanismo de acción de los compuestos más efectivos, para estudiar su potencial como agentes antitumorales.

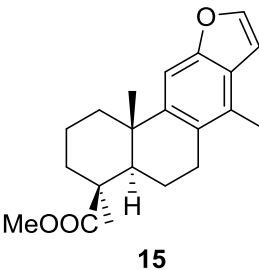
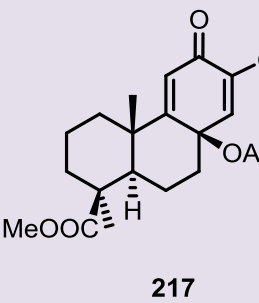
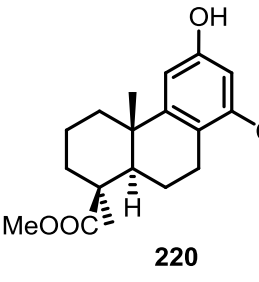
RESULTADOS Y DISCUSION

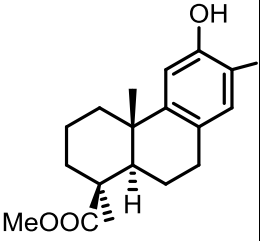
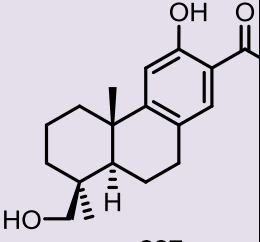
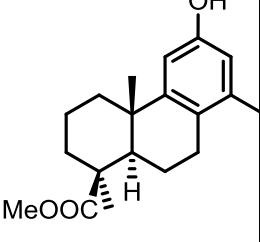
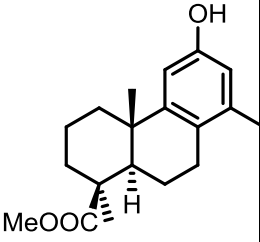
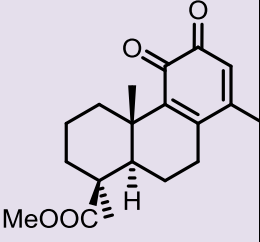
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA

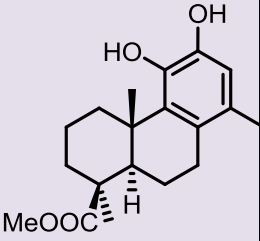
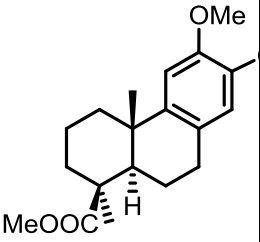
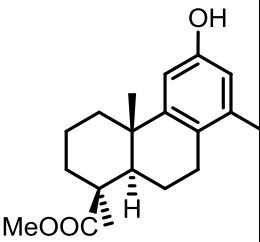
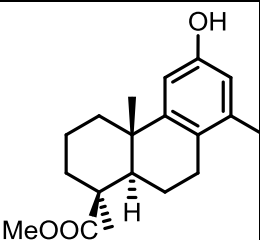
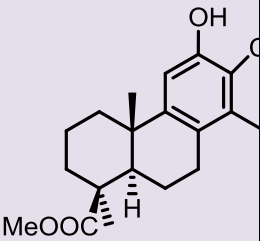
Actividad antiproliferativa en células tumorales

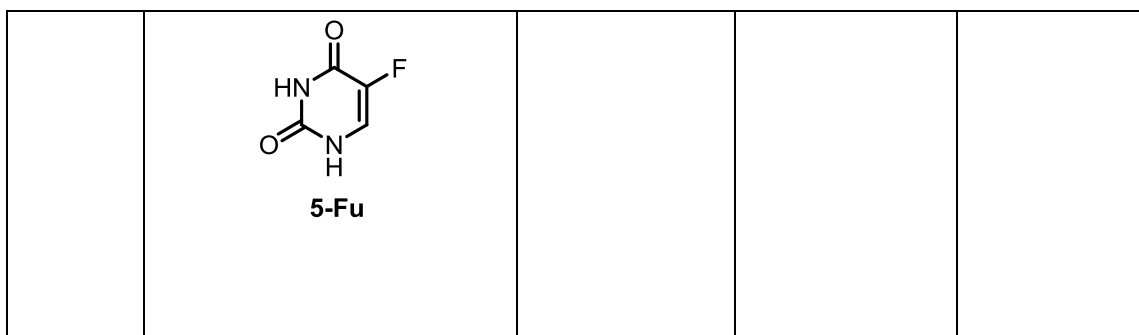
Las líneas tumorales utilizadas en el ensayo pertenecen a los tres tipos de cáncer más comunes: mama (MCF-7), pulmón (T-84) y colón (A-549). A continuación, se muestran los resultados, indicando el IC₅₀ para cada compuesto (Tabla 1).

Tabla 1. Valores de IC₅₀ frente a adenocarcinoma de mama (MCF-7), carcinoma de pulmón (T-84) adenocarcinoma de (A-549).

Tabla de compuestos químicos S*		IC ₅₀ (μM)		
Entrada	Productos	MCF-7	T-84	A-549
1	 <p>15</p>	> 40	> 40	> 40
2	 <p>217</p>	3.43 ± 0.79	13.6 ± 2.5	12.31±1.59
3	 <p>220</p>	> 40	> 40	> 40

4	 <p style="text-align: center;">221</p>	21.65 ± 1.29	20.65 ± 3.01	17.1 ± 1.87
5	 <p style="text-align: center;">227</p>	9.3 ± 0.3	7.8 ± 0.4	4.8 ± 0.2
6	 <p style="text-align: center;">228</p>	26.10 ± 1.19	30.74 ± 0.96	23.68 ± 1.95
7	 <p style="text-align: center;">229</p>	28.76 ± 0.74	30.46 ± 2.38	18.58 ± 2.86
8	 <p style="text-align: center;">230</p>	1.14 ± 0.21	11.44 ± 2.22	6.77 ± 0.81

9	 <p>232</p>	2.81 ± 0.20	0.96 ± 0.18	0.58 ± 0.02
10	 <p>233</p>	> 40	> 40	> 40
11	 <p>242</p>	20.72 ± 3.01	> 40	> 40
12	 <p>244</p>	> 40	> 40	> 40
13	 <p>246</p>	2.55 ± 0.89	7.0 ± 2.1	11.90 ± 2.89
14		7.8 ± 0.19	3.4 ± 0.14	7.1 ± 0.24



Se evaluó la actividad antiproliferativa *in vitro* de 13 nuevos diterpenoides frente a líneas tumorales de adenocarcinoma de mama (MCF-7), adenocarcinoma de pulmón (A-549) y carcinoma colorrectal derivado de metástasis pulmonar (T-84), utilizando el método Sulforodamina B [31]. Como estándar de referencia, se usó 5-fluorouracilo (5-Fu), un fármaco comercial ampliamente utilizado para tratar tumores sólidos [32] (Tabla 1). El efecto antiproliferativo fue inducido por los compuestos **246**, **217**, **227**, **230** y **232**, con $IC_{50} < 10 \mu M$ en una (**217**) en dos (**246** y **230**) o en las tres líneas celulares (**227** y **232**). El compuesto más activo fue **232**. Por lo tanto, la IC_{50} media, considerando las tres líneas celulares, fue de $1.5 \mu M$ para el compuesto **232** frente a $7.3 \mu M$ y $6.4 \mu M$ para los compuestos **227** y **230**, respectivamente, siendo **232** cuatro veces más activo que 5-Fu (media IC_{50} $6,1 \mu M$). El mejor resultado lo presentó el compuesto **232** frente a la línea A-549 con IC_{50} de $0,6 \mu M$, mientras que la IC_{50} del estándar de referencia 5-Fu fue $7,1 \mu M$.

Como se puede observar en el caso de los hidroxiésteres **220** y **221**, que no tienen una actividad importante, el valor medio de IC_{50} se reduce, al menos, a un 50% cuando el grupo éster cambia de posición meta (**220**) a orto (**221**) (entradas 3 y 4). En publicaciones anteriores, el podocarpano **227**, un constituyente de *Gaultheria yunnanensis*, no mostró actividad inhibidora significativa frente a la producción de óxido nítrico (NO) inducida por LPS, TNF- α e IL-6 en los macrófagos RAW 246.7 [27]. Sin embargo, se ha observado que presenta actividad antiproliferativa frente a las líneas celulares tumorales utilizadas. La o-quinona **230**, con esqueleto de totarano, y especialmente el catecol **232** (fácilmente oxidable al compuesto **230**), fueron los compuestos más activos. El grupo catecol del compuesto **232**, comparado con el fragmento de o-quinona del compuesto **230**, mostró una actividad superior a la media frente a células tumorales de colon y de pulmón. Sin embargo, la ausencia del grupo hidroxilo en C11 hace que el fenol **229** sea inactivo. Curiosamente, se ha encontrado que el catecol natural puede reducir el crecimiento tumoral del cáncer de pulmón *in vitro* e *in vivo* [33]. En general,

nuestros resultados indican que el anillo C de catecol o quinona es el máximo responsable de la actividad de estos compuestos.

El grado diferente de oxidación de los compuestos **230** y **232** podría justificar la mayor actividad de **232** en las líneas T-84 y A-549, basándonos en diferentes aspectos. Es posible que los grupos hidroxilo en C11 y C12 mejoren la capacidad interactiva del esqueleto con elementos celulares, que son responsables de la inducción del efecto observado de **232** en A-549. Además, como en el caso del ácido cafeíco o ferúlico, los grupos hidroxilo podrían ejercer una actividad prooxidante celular mediada por reacciones con metales de transición [34]. Como se observa experimentalmente, el catecol **232** sufre una oxidación rápida para dar la o-quinona **230**, lo que conduciría a la transformación de **232** a **230** en un contexto biológico. Por lo tanto, la mejor actividad presentada por el compuesto **232** podría derivarse de una mayor incorporación intracelular. El estudio de correlación entre log P e IC₅₀, teniendo en cuenta la serie completa de compuestos, no mostró resultados significativos. Sin embargo, el log P de **232** es mayor que el de **230**, lo que podría afectar a su incorporación.

Lipofilia

La lipofilia desempeña un papel importante en el descubrimiento de fármacos y en el diseño de compuestos, ya que puede determinar sus procesos farmacocinéticos, como la absorción, la distribución y la excreción del fármaco 36. La lipofilia de un compuesto orgánico se puede describir mediante un coeficiente de partición, log P, que se puede definir como la relación de la concentración del compuesto sintetizado en equilibrio entre las fases orgánica y acuosa 37. El log P de las moléculas estudiadas se determinó usando el software Marvin 18.3.8 (ChemAxon Ltd., 2013) (Tabla 2). No se encontró correlación entre la IC₅₀ de las tres líneas tumorales y los valores log P de los compuestos (correlación de Pearson, p >0.05).

Tabla 2. Valores de lipofilia de los compuestos

Com puestos	20	21	27	28	29	30	32	33
Log P	.6	.6	.79	.35	.33	.51	.04	.35

Citotoxicidad en células normales (PBMC)

La capacidad de inhibir el crecimiento de células cancerígenas, sin afectar la proliferación de linfocitos en PBMC, es un buen indicador de la selectividad del compuesto, una propiedad deseable para un fármaco candidato en quimioterapia frente al cáncer.

Una vez demostrada la actividad citotóxica potencial de los mejores compuestos **230** y **232** frente a diferentes líneas tumorales, evaluamos su acción en células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Los resultados presentados en la fig. 1 muestran que los efectos citotóxicos de la quinona **230** y el catecol **232** fueron menos pronunciados en las PBMC, en comparación con las células tumorales, con un índice de selectividad (SI) para A-549 de 2.51 y 43.48, respectivamente. El SI se calculó usando la siguiente fórmula: $SI = IC_{50} (PBMC) / IC_{50} (A-549)$ 39. La capacidad de inhibir el crecimiento de las células cancerosas sin afectar a las células normales es una característica deseada para un nuevo candidato a fármaco quimioterapéutico [37]. A continuación, evaluamos el efecto de los compuestos más activos (**246**, **217**, **230** y **232**) en células normales con el objetivo de comprobar su toxicidad inespecífica. Para ello, se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de muestras de sangre de donantes sanos y se indujeron con concentraciones crecientes de los compuestos. Las PBMC inducidas con **230** experimentaron una reducción de la viabilidad celular dependiente de la dosis que oscilaba entre 25% a 0,5 μM y 43,8% a 10 μM , mientras que en los cultivos inducidos con **232** solo se redujo la viabilidad hasta 21,5% a 10 μM (figura 2).

Los productos **227**, **229**, **230** y **232** no causaron toxicidad en ninguna de las concentraciones probadas. La viabilidad celular permaneció por encima del 75% con el catecol **232**, que fue comparable a la quinona **230** (>55%). El tratamiento con menos de 10 μM de los compuestos **230** y **232** no inhibió el crecimiento celular de PBMC, por lo que concluimos que los diterpenos sintetizados (**230** y **232**) no son tóxicos para las células humanas normales y podrían usarse de forma segura para el tratamiento del cáncer sin dañar las células normales. La notable actividad biológica del catecol **232** en la línea tumoral A-549 nos llevó a investigar sus efectos a nivel celular, en particular los mecanismos responsables de la inhibición del crecimiento celular.

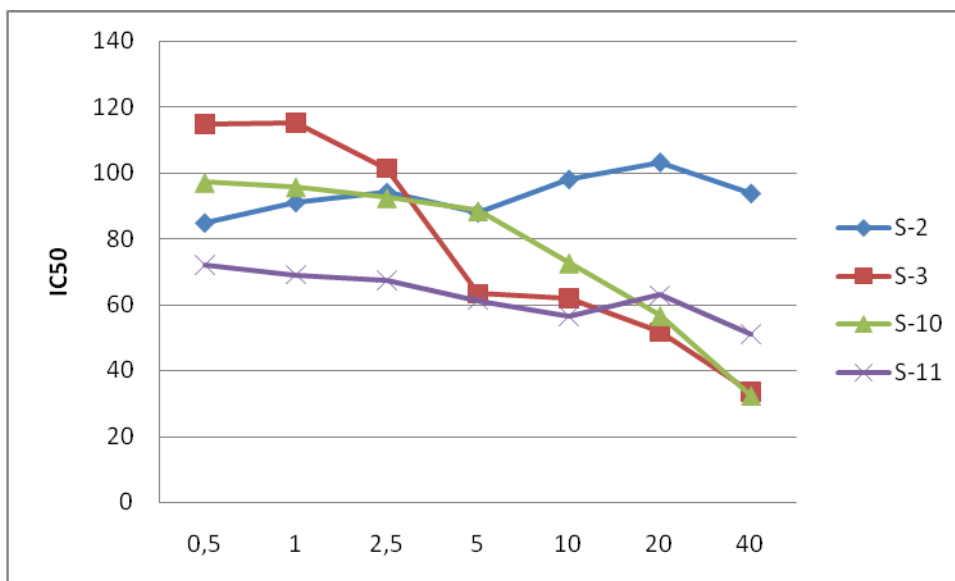


Fig. 1 Inhibición de la proliferación de PBMC con compuestos S-2 (**246**), S-3 (**217**), S-10 (**230**) y S-11 (**232**)

Análisis del ciclo celular y apoptosis

Muchos compuestos citotóxicos ejercen su efecto inhibitor del crecimiento, deteniendo el ciclo celular en un punto de control particular [40], por inducción de apoptosis [41] o por un efecto combinado sobre el ciclo celular y apoptosis [42]. Por lo tanto, el estudio del bloqueo de la progresión del ciclo celular por los compuestos es un punto interesante a considerar [43]. Dado que el mejor resultado antiproliferativo se observó para el compuesto **232** frente a las células A-549 (IC_{50} 0,6 μ M), y debido a que el compuesto era menos tóxico en las células normales, procedimos a analizar el efecto de **232** en el ciclo celular de la línea A-549 (Figura 2). Después de 24 horas de inducción con IC_{50} de **232**, encontramos un incremento significativo de células en la fase G2/M (14.5% vs 8.8% en el grupo control) y una reducción de la fracción G0/G1 (53.7% vs 60.6% en controles).

Sin embargo, a las 48 horas, el compuesto **232** indujo un alto incremento en la fase Sub-G1 (70.1% vs 2.6% en los controles), asociado a una reducción de las otras fases, lo cual podría reflejar inducción de apoptosis [44].

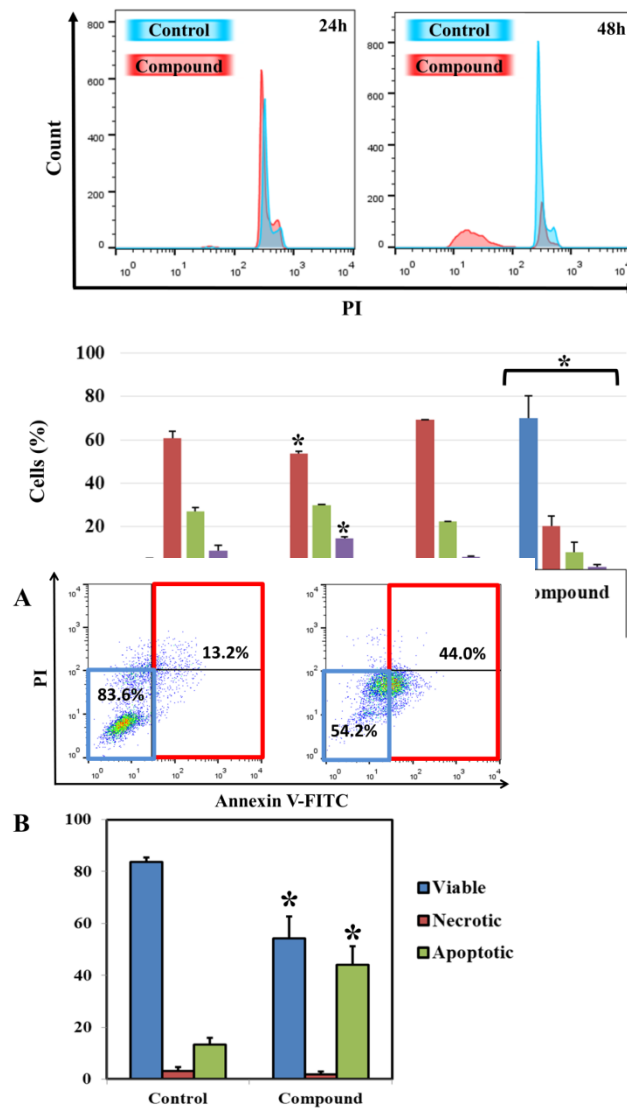


Fig.3 Análisis mediante citometría de flujo de la viabilidad de células A-549 tras el tratamiento con y sin (control) compuesto **232** a las 24 horas utilizando tinción con Anexina V-FITC/PI. A) Citogramas seleccionados de cultivos de control (izquierda) y tratados (derecha). B) Histogramas que representan los porcentajes de células viables, necróticas o apoptóticas.

Análisis mediante citometría de flujo del ciclo celular de la línea A-549 tras el tratamiento con y sin compuesto **232** (control) a las 24 y 48 horas.

A través de efectos moleculares, los agentes citotóxicos pueden influir en la progresión del ciclo celular y la apoptosis [45]. La apoptosis es uno de los principales procesos que conducen a la muerte celular, en la que la condensación y la fragmentación de la cromatina son características típicas [46, 47]. Evaluamos la viabilidad de las células A-549 después de la inducción o no (control) con el compuesto **232** durante 24 horas, utilizando un kit de anexina V-FITC/PI para citometría de flujo [48]. Encontramos que el compuesto **232** provoca una reducción significativa de la viabilidad celular (54,2% frente a 83,6% de los controles), asociada a un incremento de la apoptosis total (44,0% frente a 13,2%) (Figura 3). Bax y Bcl-2 son algunas de las proteínas cuya expresión juega un papel crítico en el proceso apoptótico [49, 50]. Las células A-549 se indujeron con 0x (control), 0,5x o 1x IC₅₀ del compuesto **232** durante 24 horas. El análisis mediante Western Blot mostró una disminución y un aumento de las proteínas Bcl-2 y Bax, respectivamente, que es una señal molecular de apoptosis (Figura 4). En general, los miembros de la familia Bcl-2 (que incluye a Bcl-2, Bad y Bax), son reguladores importantes de diversas vías apoptóticas [51]. Bax ejerce efectos pro-apoptóticos mientras que Bcl-2 posee una actividad anti-apoptótica [52, 53]. En general, estos resultados sugieren que el compuesto **232** induce la detención de la fase G2/M y promueve la apoptosis. Este mecanismo de acción es similar al de otros compuestos como el 1,8-cineol, compuesto abundante en el extracto hexánico de *Callistemon citrinus*, en células de carcinoma de piel humana A-431 [54], la ovatodiolida, aislada de la planta *Anisomeles indica*, en líneas de cáncer de pulmón humano A-549 y H1299 [55]; [1-9-N α C]-crouororb A1, un péptido cíclico aislado de *Croton urucurana*, en células humanas de hepatocarcinoma Huh-7 [56]; y Glaucoalyxin A (GLA), componente principal aislado de *Rabdosia japonica*, en la línea celular de cáncer de vejiga humana UMUC3 [57].

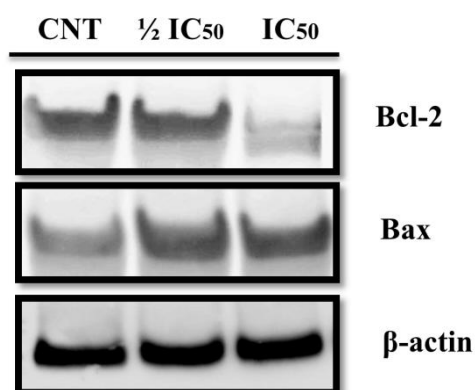


Fig. 4 Análisis Western blot de la expresión de Bcl-2 y Bax en cultivos de A-549 inducidos con 0x (CNT), 0,5x (1/2IC₅₀) o 1x IC₅₀ (IC₅₀) del compuesto **232** durante 24h.

EXPERIMENTAL SECTION

MATERIALES Y MÉTODOS

Tras la primera fase de obtención de los compuestos con esqueleto de cassano, abietano, podocarpano y totarol, realizada en el laboratorio de Síntesis Orgánica Aplicada (Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias de Granada), decidimos realizar ensayos de citotoxicidad de algunas de estas sustancias. Estos fueron llevados a cabo en los laboratorios del Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (Centro de Investigaciones Biomédicas de Granada). De entre los compuestos sintetizados, se seleccionaron aquellos derivados cuyas estructuras fuesen susceptibles de presentar actividad antitumoral.

1. Preparación de la muestra

Con el fin de preparar la muestra, se solubilizó 1 mg de cada compuesto puro en 100 μ l de DMSO. La solución se prepara antes de utilizar y es estable a -4°C . Se realizaron una serie de diluciones en medio de cultivo DMEM (Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco-Sigma al 10 % SFB (suero bovino fetal), y posteriormente se cambiaron a intervalos de 5 en 5 en función de la localización del efecto de IC_{50} (concentración requerida del fitoesteroide que induce un decremento del 50 % la densidad celular)

2. Evaluación de la actividad citotóxica

Solamente aquellos compuestos que mostraron actividad citotóxica con $\text{IC}_{50} < 10 \mu\text{M}$, fueron evaluados mediante otras técnicas, con la finalidad de determinar si inducían o no apoptosis .

2-1 Líneas celulares

Para evaluar la actividad antitumoral de nuestros compuestos, se emplearon tres líneas celulares tumorales de mama (MCF-7), de pulmón (A-549) y de colon (T-84). Todas las líneas celulares fueron suministradas por el banco de células del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

2-2 Cultivo y conservación

Las líneas celulares MCF-7, T-84 y A-549 se cultivaron en medio DMEM (Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbeco-Sigma), y las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se cultivaron en medio RPMI 1640 (Sigma). Ambos medios de cultivo se suplementaron con 10% (v/v) de suero bovino fetal (SBF), 2 mM de glutamina y antibióticos (penicilina 50 U/mL y estreptomycin 50 mg/mL).

Las líneas celulares y PBMCs se mantuvieron en el incubador en condiciones de cultivo estándar a 37 °C de temperatura, 95% de humedad y 5% de CO₂. Todas las manipulaciones con células se realizaron en una campana de flujo laminar, usando material y soluciones estériles.

Las células sobrantes se conservaron en criotubos de 2 ml en el congelador a -20°C y con una mezcla de 90% de FBS y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), con la intención de ser utilizadas a corto plazo. Si la intención es almacenar las líneas celulares a largo plazo, los criotubos deben ser guardados en un contenedor de nitrógeno líquido, a unos -170°C.

2-3 Descongelación de las líneas celulares

En primer lugar, se procedió a la descongelación parcial a temperatura ambiente de los criotubos MCF-7, T-84 y A-549. A continuación, se añadió el contenido celular a un tubo de 30 ml al que previamente se le habían añadido 10 ml del medio de cultivo DMEM. Posteriormente, se centrifugaron los tubos (1500 rpm, 5 min) para eliminar el dimetilsulfóxido (DMSO), vehículo en el que se habían congelado las células. Una vez desechado el sobrenadante, se añadió nuevo medio de cultivo a cada tubo (10-12 ml aproximadamente), de manera que el contenido estuviera correctamente resuspendido. Tras recoger el pellet celular con una pipeta Pasteur, las células se colocaron en uno o más frascos de cultivo de 75 cm² junto con 15 ml de medio DMEM, suplementado o completo. Se visualizaron al microscopio para asegurar su correcta morfología y se incubaron a 37 °C y en una atmósfera de CO₂ al 5%. Las células deben adherirse al fondo de frasco del cultivo en las siguientes horas y se reproducirán hasta alcanzar una monocapa. Para el mantenimiento de los cultivos se realizó el cambio de medio a los frascos de cultivo cada dos días, previo lavado suave de las células con 10 ml de solución tampón de fosfato (PBS) de 298 mOsm/L y pH= 7,3.

2-4 Recuento Y Comprobación De Viabilidad

Los cultivos con 90% de confluencia se trataron con 3-5 ml de solución de tripsina al 0,025% durante 5 minutos a 37 °C, para despegar las células del frasco de cultivo. A los 5 minutos se interrumpe el proceso de tripsinización añadiendo la misma cantidad de medio de cultivo completo. Tras resuspender el medio añadido con las células, se pasa la mezcla a un tubo de 30 ml y se lleva a la centrifuga durante 5 minutos a temperatura ambiente para obtener el pellet celular. Tras la centrifugación, se descartó el sobrenadante, que contenía tripsina, y se añadieron 4-5 ml de medio completo. De esta nueva suspensión celular, se obtiene una alícuota de 10 microlitros, a la cual se le añadirá la misma cantidad de azul de tripán y se colocaran 10 microlitros de esta mezcla en la cámara de Neubauer para llevar a cabo el recuento y la comprobación de la viabilidad celular.

3. Ensayo Citotóxico Por El Método De Sulforodamina B

Las células de las líneas celulares MCF-7, T-84 y A-549 se sembraron en placas de 96 pocillos a una concentración de 2×10^4 células/pocillo, y se dejaron proliferar durante 24 horas en medio de cultivo DMEM, suplementado con suero fetal bovino al 10 %. Tras 24 horas, las células ya adheridas fueron inducidas, añadiendo en los pocillos diferentes concentraciones de cada uno de los compuestos (0.5, 1, 5, 10, 15, 20, 30 y 40 μM) por triplicado, usando DMSO como control negativo. Después de la incubación a 37 °C con 5 % de CO_2 durante 72 horas, se evaluó el crecimiento celular, siguiendo el método de SRB. Para ello, se eliminó el sobrenadante de cada pocillo por succión y las células se fijaron con 100 μl de ácido tricloroacético (TCA) al 10 % frío (4°C), durante 20 minutos. Se realizaron 3 lavados para eliminar el TCA con agua esterilizada y se dejaron secar las placas completamente a temperatura ambiente. A continuación se tiñeron los pocillos con sulforrodamina B (SRB), añadiendo 100 μl de sulforrodamina B (SRB) al 0.4 % a cada pocillo, y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos, en oscuridad y con agitación suave. Este colorante de color violeta es capaz de teñir de forma rápida y específica las proteínas de las células vivas. Tras la incubación, la SRB se retiró y las placas se lavaron tres-cuatro veces con ácido acético al 1 % y se dejaron secar a temperatura ambiente. La SRB de las células teñidas se solubilizó con 100 μl de una solución de Tris-base 10 mM, pH 10,5, y se dejaron las placas en un agitador durante 10 minutos en oscuridad. Pasado este tiempo, se leyó la absorbancia de los pocillos a 492 nm, restando la medición de fondo de 620 nm. La absorbancia obtenida en cada pocillo es, por tanto, proporcional al número de células.

Para este ensayo se utilizó 5-fluorouracilo (Sigma), un fármaco antitumoral, como control positivo, mientras que las células sin tratar fueron utilizadas como controles negativos. Una vez realizado el ensayo, los resultados se expresaron según el índice de inhibición 50 (IC₅₀), que se define como la dosis que produce la muerte del 50% de las células en cultivo en un tiempo determinado.

4. Ensayo De Citotoxicidad En Pbmcs De Muestras De Sangre Periférica De Pacientes Sanos

Para realizar este ensayo, primero fue necesario aislar células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). Tras mezclar la sangre con PBS estéril en proporción 1:2, se depositaron 15 mL de sangre sobre 7 mL de Ficoll-Histopaque y se centrifugaron durante 30 minutos a 1500 rpm. Luego, se extrajo la fase correspondiente a las células mononucleares, y se realizaron 2 lavados, centrifugando durante 15 minutos a 1500 rpm, para descartar el plasma y las plaquetas. El pellet obtenido corresponde a PBMCs, las cuales fueron mantenidas en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de FBS.

Posteriormente, 5×10^5 PBMCs se sembraron en placas de 96 pocillos y se indujeron con diferentes concentraciones de los compuestos que habían mostrado mayor eficacia en ensayos anteriores (compuestos **246**, **217**, **230** y **232**) durante 72 horas. Se usó el método MTT (Sigma M5655-100 mg), para determinar mediante colorimetría el posible efecto citotóxico de los compuestos sobre los cultivos primarios de estas células sanguíneas normales. Se preparó una solución de MTT diluida en PBS (1 mg/mL), y se añadieron 100 μ L en concentración 0,25 mg/mL en cada pocillo, con medio sin suplementar. Las placas fueron incubadas durante 4 horas en condiciones estándar. Luego, se eliminó cuidadosamente el sobrenadante y se adicionaron 100 μ L de DMSO. Para la lectura de las placas de cultivo se usó un lector de placas (BIORAD) a 570 nm. Los valores resultantes se tomaron como medida indirecta de masa celular viable.

5. Índice De Selectividad

Para determinar la especificidad de la actividad citotóxica de un compuesto en líneas celulares tumorales es necesario obtener información sobre su citotoxicidad en células

normales. Las células normales en las que decidimos probar los compuestos fueron PBMCs. El índice de selectividad (SI) fue calculado usando la siguiente ecuación:

$$SI = IC_{50} \text{ PBMCs cel} / IC_{50} \text{ cancer cel}$$

6. Análisis Estadístico

Los datos que se presentan en el apartado de “Resultados”, se expresan como la media \pm error estándar de las valoraciones obtenidas en las muestras ensayadas. Los datos han sido tratados con el programa GraphPad 5.0 en poblaciones múltiples, con diferentes medias. Se analizó la varianza de las mismas, mediante el test ANOVA (análisis de varianza) de una rama, comparándose dichas medias mediante un test de Bonferroni. Un valor de p igual o inferior a 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

7. Ensayo De Ciclo Celular

El estudio del ciclo celular se llevó a cabo mediante citometría de flujo. Las células A-549 se cultivaron en placas de 6 pocillos a una concentración de 4×10^5 células/pocillo con medio DMEM, sin suero (3 ml/pocillo), durante 24 horas, para sincronizar sus ciclos celulares. A continuación, se expusieron durante 12, 24 y 48 horas a dosis crecientes del catecol **232**, a partir de la IC_{50} obtenida a alta densidad celular. Una vez terminada la inducción, las células se recogieron mediante el proceso de tripsinización y se pasaron a tubos de 15 ml. Se centrifugaron durante 5 min a 1500 rpm y se realizó un lavado con PBS. Tras el lavado, se retiró el sobrenadante y se fijaron los pellet en etanol al 70%, añadiéndolo gota a gota mientras se agitaban suavemente en un vórtex.

Tras una incubación durante 15 minutos a 37 °C con solución de extracción de ADN (0,2 M Na_2HPO_4 , 0,1 M ácido cítrico, pH 7,8), se centrifugaron y se lavaron de nuevo las muestras con PBS. Finalmente, se añadieron 250 μ l de solución de yoduro de propidio (40 μ g/ml) y RNasa (100 μ g/ml) y se incubaron las muestras durante 30 minutos a 37 °C en oscuridad.

Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FACSCan, con el programa CellQuest 5.2.1-Pro (BD), analizando 10.000 eventos, usando una escala lineal para ciclo celular y una escala logarítmica para determinar la fracción sub-G1. Los resultados se analizaron con el software FlowJo (v 7.6.5, Tree Star, Inc.)

El análisis de los datos obtenidos se realizó mediante el programa Infinicyt (Cytognos). El estudio de los histogramas nos puede dar indicios sobre la inducción de apoptosis. (Rieger et al., 2011).

7-1 Tinción Con Yoduro De Propidio

La detección de células muertas se realizó mediante tinción *in vivo* con yoduro de propidio (IP). Dicha tinción se llevó a cabo, resuspendiendo los pellet obtenidos tras recoger y lavar las células en PBS 2x, en una dilución 1/1000 de IP en PBS 2x. De forma inmediata, se realizó el análisis por citometría de flujo para detectar aquellas células en las que por pérdida de la integridad de su membrana, se hubiera el compuesto..

7-2 Inducción De Apoptosis Con Anexina V

Para realizar este ensayo, los tiempos de exposición fueron variables y se usaron dosis crecientes de los compuestos objeto de estudio, tomando como referencia la IC₅₀. Mediante citometría de flujo y utilizando el kit de detección de apoptosis Anexina V-DY634 (Immunostep) se determinó la viabilidad celular y el porcentaje de células apoptóticas tras la exposición al compuesto. Para ello, se sembraron 5x10⁴ células por pocillo de la línea A-549 y tras 24 horas, se indujeron con distintas concentraciones de compuesto.

Tras la inducción durante 24 ó 48 horas, se recogieron los sobrenadantes celulares del cultivo de cada pocillo en tubos de ensayo limpios (para rescatar células que se encontraran flotando) y tripsinizamos las células adheridas a los pocillos. Una vez realizado el proceso de inactivación de la tripsina, se recogieron las células para llevarlas al tubo con su sobrenadante correspondiente. Se centrifugaron los tubos durante 5 minutos a 1500 rpm a temperatura ambiente, y se lavaron 2 veces con PBS 1x.

El marcaje con Anexina V se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. El análisis de las muestras se realizó en un citómetro de flujo FACSCan, usando el software FlowJo (v 7.6.5, Tree Star, Inc.).

8. Análisis De La Expresión De Proteínas Mediante Western Blot

Extracción De Proteínas Totales

Para la extracción de proteína total procedente de la línea celular A-549, se añadió al pellet tampón de lisis, complementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas (Sigma), se incubaron en hielo durante 30 minutos y después se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Posteriormente, el contenido de proteína total de los extractos se evaluó por el método Bradford modificado (BioRad), según las instrucciones del fabricante, utilizando como control la albumina sérica bovina (BSA). Los sobrenadantes que correspondían a la fracción soluble se almacenaron en eppendorf a -30 °C.

Western Blot

El análisis de expresión de proteínas endógenas se llevó a cabo mediante la técnica de Western Blot (WB). Tras determinar la concentración de proteína, se disolvieron las cantidades apropiadas de cada muestra en tampón de carga y se desnaturalizaron durante 10 minutos a 70 °C. La separación por tamaño de las proteínas fue llevada a cabo mediante electroforesis en PowerEase™ 90W Power Supply (230 VAC) con geles 4-12% Bis-Tris Plus (Invitrogen). Las muestras fueron procesadas con Bolt™ Sample Reducing Agent (10x) y Bolt™ LDS Sample Buffer (4x). En cada carril del gel se cargaron 40 µg de proteínas extraídas de cultivos A-549 inducidas durante 72 horas con el compuesto seleccionado. Las proteínas separadas en los geles se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (IB23001, Invitrogen), las cuales se bloquearon usando una solución 5% de leche desnatada en PBS durante una hora. Se comprobó la correcta transferencia de las proteínas a la membrana, tiñéndola con Rojo Ponceau S (Sigma). A continuación, se incubaron con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4 °C.

Posteriormente, las membranas se lavaron con PBS-Tween y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente, acoplado a peroxidasa durante 45 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, tras lavar las membranas con PBS-Tween, los inmunocomplejos se visualizaron, utilizando el sistema de quimioluminiscencia ECL (Amersham Pharmacia Biotech, UK) y las expresiones relativas de proteína fueron semicuantificadas con el software Quantity One.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron monoclonales específicos frente a Bcl-2 (SC-56015, SantaCruz Biotechnology) y Bax (SC-7480, SantaCruz Biotechnology). Como anticuerpo secundario se empleó m-IgG kappa BP-HRP (SC-516102, SantaCruz

Biotechnology) y β -actina (Sigma, A-3854). Los inmunocomplejos fueron detectados mediante quimioluminiscencia usando el sistema ECL (Amersham Pharmacia Biotech, UK).

CONCLUSIONS

1.- Se ha puesto a punto una nueva estrategia para la preparación de derivados terpénicos con esqueleto de abietano, podocarpano, totarano y cassano, que poseen funcionalizado el metilo axial del grupo gem-dimetilo, a partir del ácido *trans*-comúnico (**142**), obtenido del ciprés.

2.- La etapa clave del proceso es la cicloadición de Diels-Alder del furano **212** y acetoxifurano **213**, obtenidos mediante degradación oxidativa del éster metílico del ácido **142**, con propiolato de metilo, que permite obtener los hidroxiésteres **220** y **221**.

3.- El hidroxiéster **221** es un intermedio adecuado para la síntesis de derivados con esqueleto de abietano y de podocarpano. Así, el compuesto **221** se ha transformado en el podocarpano natural **227**.

4.- Por su parte, el hidroxiéster **220** ha permitido la preparación de derivados con esqueleto de totarano, como la *orto*-quinona **230** y el catecol **232**, y de cassano, como el compuesto **15**, con la supuesta estructura de benthaminin 1.

5.- Algunos de los compuestos sintetizados han sido evaluados por nuestro equipo para conocer su potencial antiproliferativo *in vitro* frente a diferentes líneas de células tumorales humanas (MCF-7, T-84 y A-549). El efecto antiproliferativo fue inducido por los compuestos **227**, **230** y **232**, con IC₅₀ <10 μM en dos (**230**) o tres líneas celulares (**227** y **232**), sin ninguna relación con los valores log P. La o-quinona **230**, con esqueleto de totarano, y especialmente el catecol **232**, fácilmente oxidable al compuesto **230**, fueron los compuestos más activos.

6.-El compuesto **232** mostró toxicidad limitada en PBMC normales y parece ejercer efecto antiproliferativo en células A-549, a través de un mecanismo que implica bloqueo de G2/M e inducción de apoptosis mediada/apoyada por una relación Bax / Bcl-2 incrementada.

7.-Los resultados del presente trabajo indican que el compuesto **232** podría ser útil como agente antitumoral. Se requieren más estudios para dilucidar los elementos celulares y moleculares implicados en su efecto, y la actividad/toxicidad en modelos preclínicos.

ANEXOS

De forma paralela a la realización del trabajo presentado en esta memoria, la etapa de formación predoctoral en el grupo de “*Productos Naturales y Síntesis Orgánica Aplicada*”, me ha permitido llevar a cabo otras actividades complementarias y ha dado lugar a las siguientes publicaciones y comunicaciones en congresos:

PUBLICACIONES

“**Synthesis and anti antiproliferative activity of podocarpene and totarane derivatives**” Soumicha Mahdjour.; Juan J.Guardia.; Fernando Rodríguez-Serrano.; José Manuel Garrido.; Isabel Blancas López-Barajas.; Nuria Mut-Salud.; Rachid Chahboun.; Enrique Alvarez-Manzaneda, In *Eur J Med Chem.* **2018** Oct 5;158:863-873.

“**Enantiospecific synthesis of antifungal dasyscyphin E from cupressic acid**”. Antonio Fernández.; Ettahir Boulifa.; Fermín Jiménez.; **Soumicha Mahdjour.**; Ahmed I. Mansour.; Rachid Chahboun.; Enrique Alvarez-Manzaneda.; In *Tetrahedron.* **2017, 73, 6549-6557**

“**Antiproliferative Activity of Natural Taiwaniaquinoids and Related Compounds**”. Guardia Juan J.; Tapia Ruben.; **Mahdjour Soumicha.**; Rodríguez-Serrano Fernando.; Mut-Salud Nuria.; Chahboun Rachid.; Alvarez-Manzaneda, Enrique. In *J. Nat. Prod.*, **2017**, 80 (2), 308– 318.

“**A Short Route to Cassane-Type Diterpenoids: Synthesis of the Supposed Structure of Benthaminin I**” Mahdjour Soumicha.; Harche-Kaid Meriem.; Haidour Ali.; Chahboun Rachid.; Alvarez-Manzaneda Enrique.; In *Org. Lett.*, **2016.** 18 (22), 5964–5967.

COMUNICACIONES EN CONGRESOS

1) “**Effets Anticancereux de l’extract polyphenolique des feuilles de Retama Reatam**”, Mahdjour, S.; Mahdjour, M.; Zentar, H. Ist International Symposium « Environment and Sustainable Development », **10 and 11 february 2020** in Relizane, Algeria.

2) **“In vitro Anticancer Activity of Synthetic Cassane Diterpenoid and their intermediates”** Zentar, H.; Mahdjour, S.; Chahboun, R.; Alvarez-Manzaneda, E, Ist International Symposium « Environment and Sustainable Development », February 2020 in Relizane, Algeria.

3) **« Consommation des compléments alimentaires en automédication »** Dermeche, K. ; Mellali, S. ; Tamert, A. ; Mahdjour, S. ; Ouis, M. ; Ist International Symposium « Environment and Sustainable Development », February 2020 in Relizane, Algeria.

4) **“Synthesis and antiproliferative activity of diterpene Catechol derivative with Totarane Skeleton”** II Simposio de la unidad de excelencia de química aplicada a biomedicina y medio ambiente, 2019, Granada, Spain.

5) **“Exosomes for drug delivery to lung cancer”** Mahdjour, M.; Mahdjour, S.;, in International Conference on Biotechnology and Cancer (ICBC). December 2019, Oran, Algeria.

6) **“In vitro anticancer activity of *Ephedra vulgaris* against different human cancer cell lines”**, Mahdjour, S.; Mahdjour, M.; ...in International Conference on Biotechnology and Cancer (ICBC). 2019, Oran, Algeria.

7) **“The teratogenic effects of thalidomide enantiomers”** , December 2019 In International Conference on Biotechnology and Cancer (ICBC). Oran, Algeria.

8) **“Aluminium-induced acute neurotoxicity in rats: Treatment with omega-6/omega-3 ratio”**,... Mahdjour, S.; In International Conference on Biotechnology and Cancer (ICBC). December, 2019, Oran, Algeria.

9) **“Synthesis and antiproliferative activity of diterpene Catechol derivative with Totarane Skeleton”**, Mahdjour, S.; II Simposio de la unidad de excelencia de química (UQE) aplicada a biomedicina y medio ambiente. January 2019, UGR, Granada-Spain.

10) **“Preparación de compuestos con esqueleto de abietano”** III Jornadas de Investigadores en Formación - III Congreso Nacional - JIFFI - 2018, Granada, Spain.

11) Les produits naturels, une source d'agents anticancéreux. Journée d'étude pour lutter contre le cancer « J.E.L.C.C » 27 february **2018**, Relizane, Algerie.

12) “First synthesis and biological evaluation of 12, 19-dihydroxy-13-acetyl-8,11,13-podocarpatriene from *trans*-communic acid”. Women in Science - 1st Erlangen Symposium, **2018**, Erlangen, Germany.

13) “Synthesis of Celaphanol A”. II Jornadas de Investigadores en Formación, II Congreso Nacional - JIFFI - **2017**, Granada, Spain.

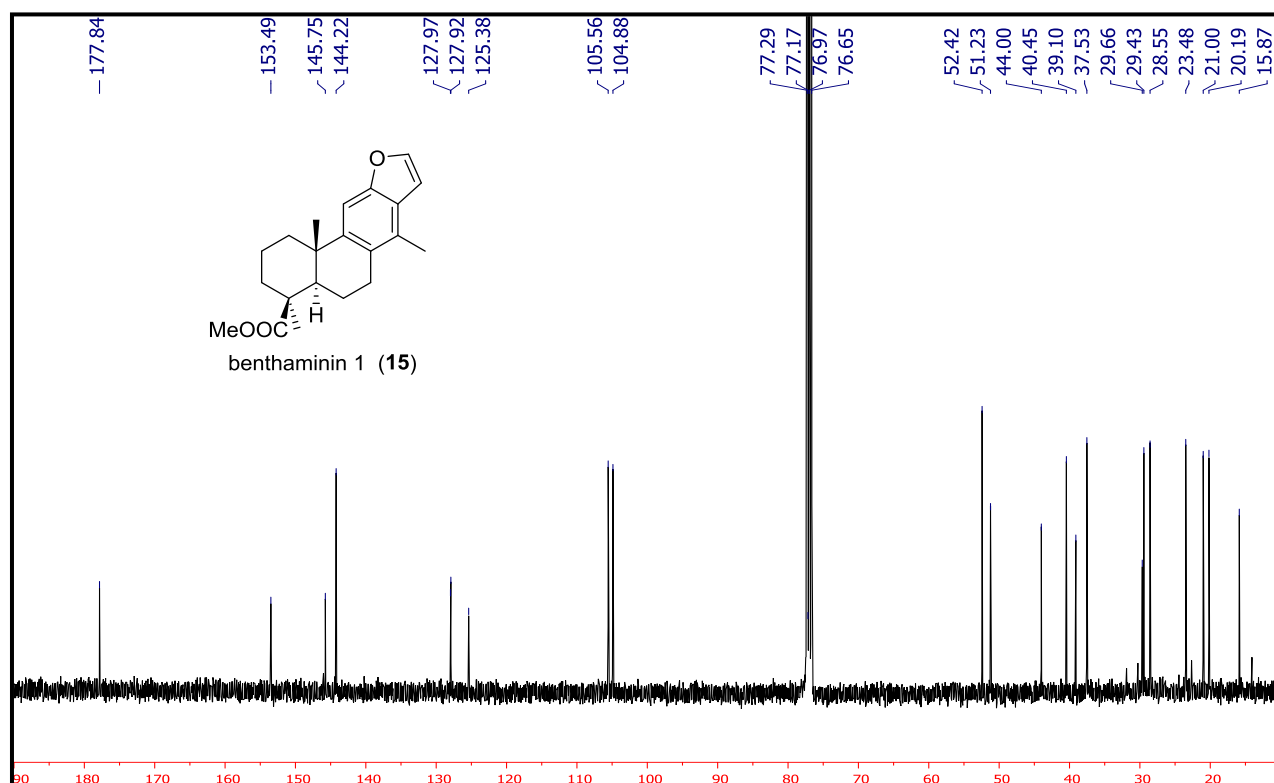
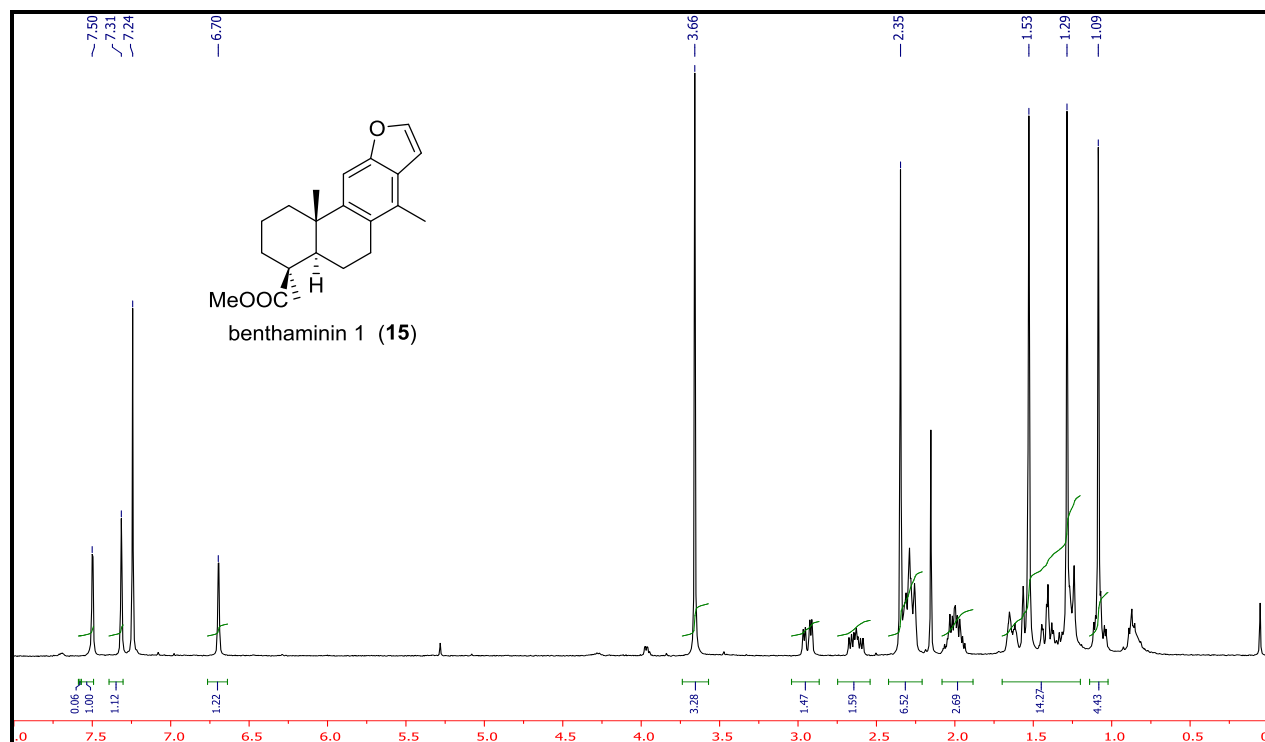
14) “Synthesis of wiedelactone” 1^{er} Congreso de Jovenes quimicos y bioquimicos Terapeuticos, Quim Bio Quim, **2016**, Granada, Spain.

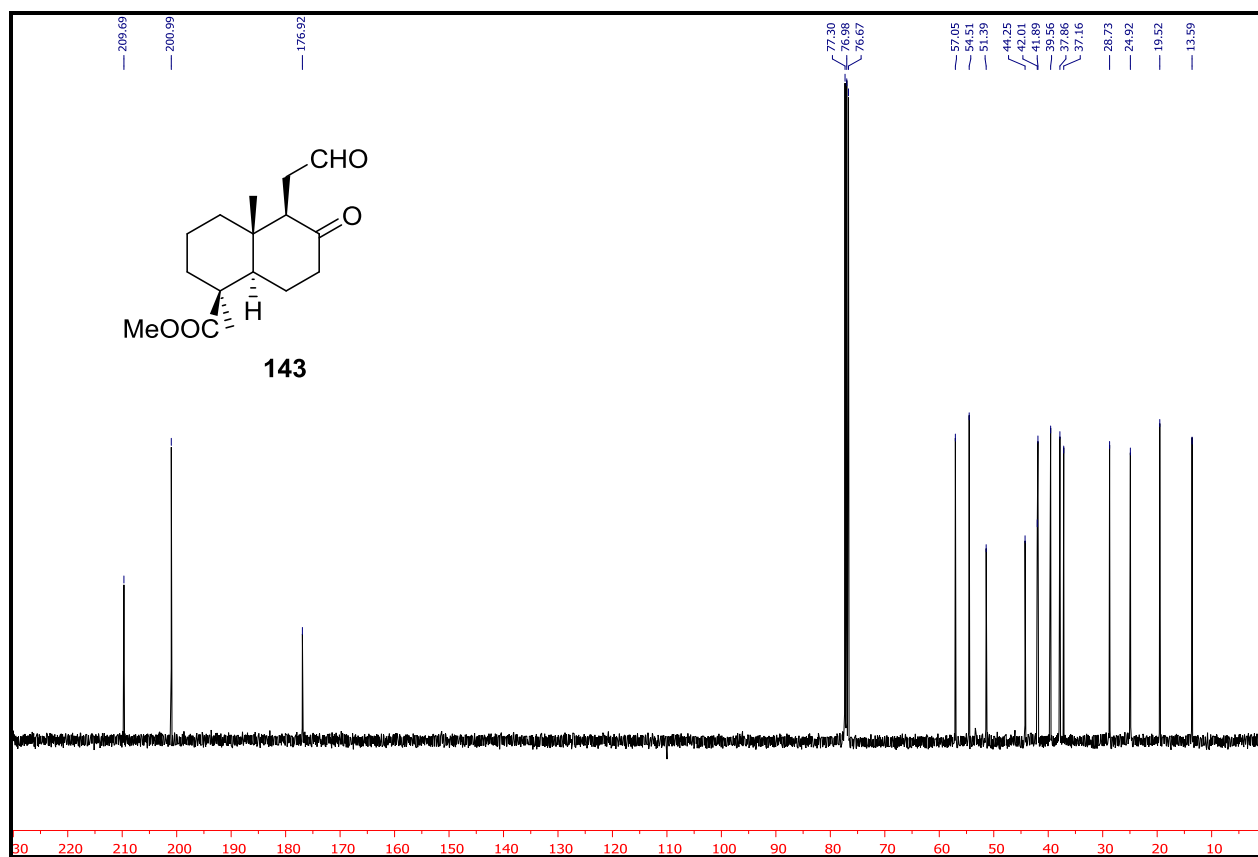
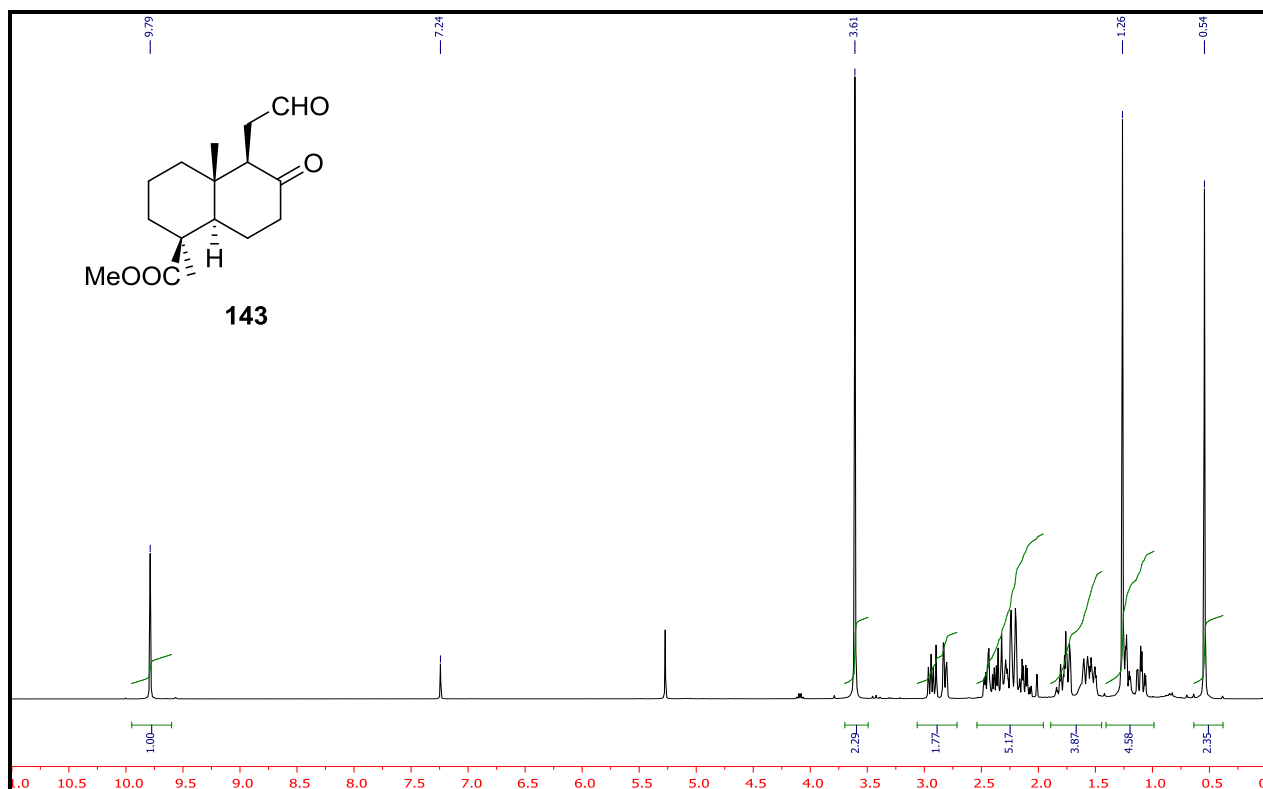
15) “Synthesis of 8-epipuupehedione”. 5th Spanish-Moroccan Symposium on Organic Chemistry, **2016**, Casablanca, Morocco.

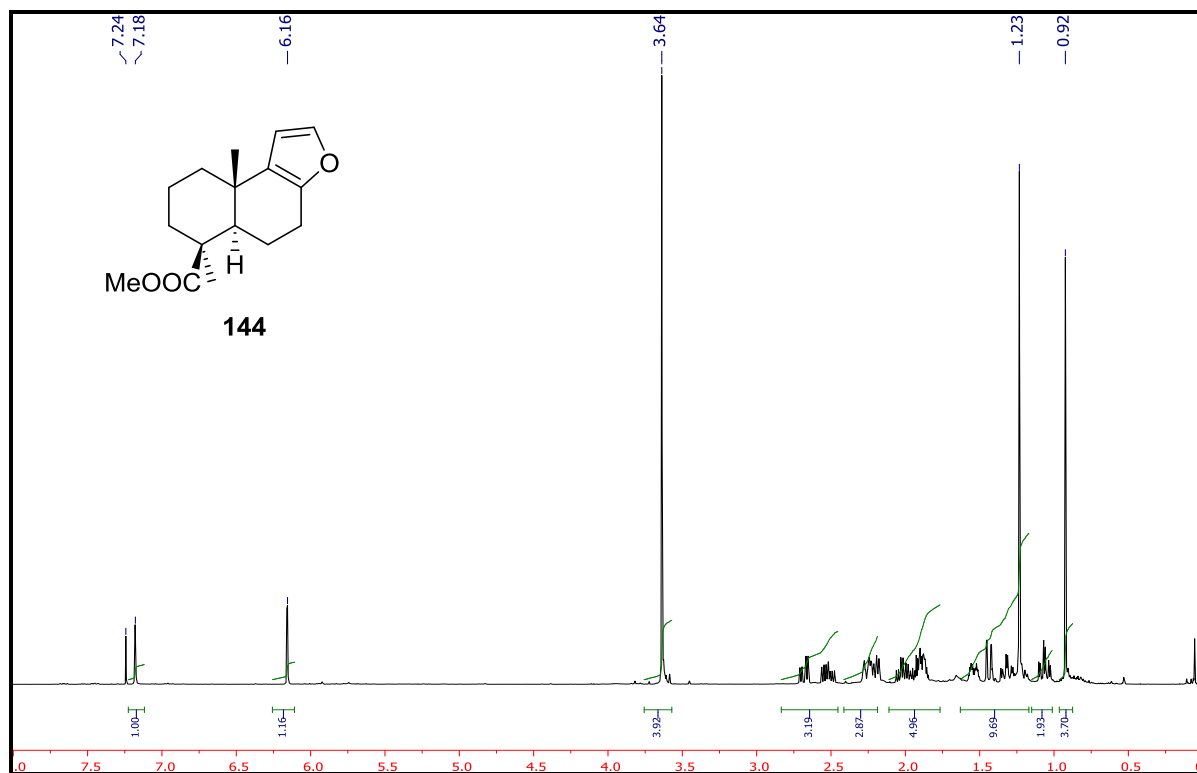
16) “Approach to the synthesis of 4-epi-taepeenin from *trans* communic acid”, Colloque Internationale de Biologie Appliquée (CIBA), **2015**, Oran, Algeria.

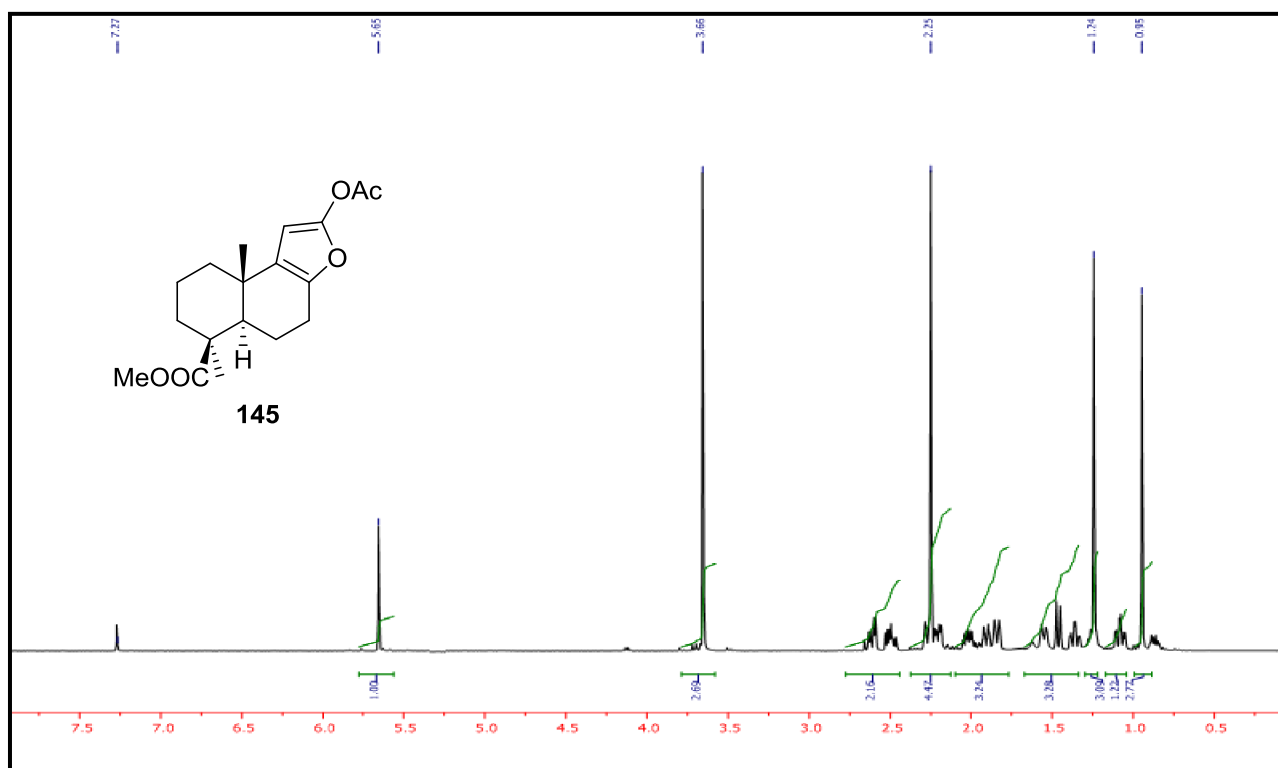
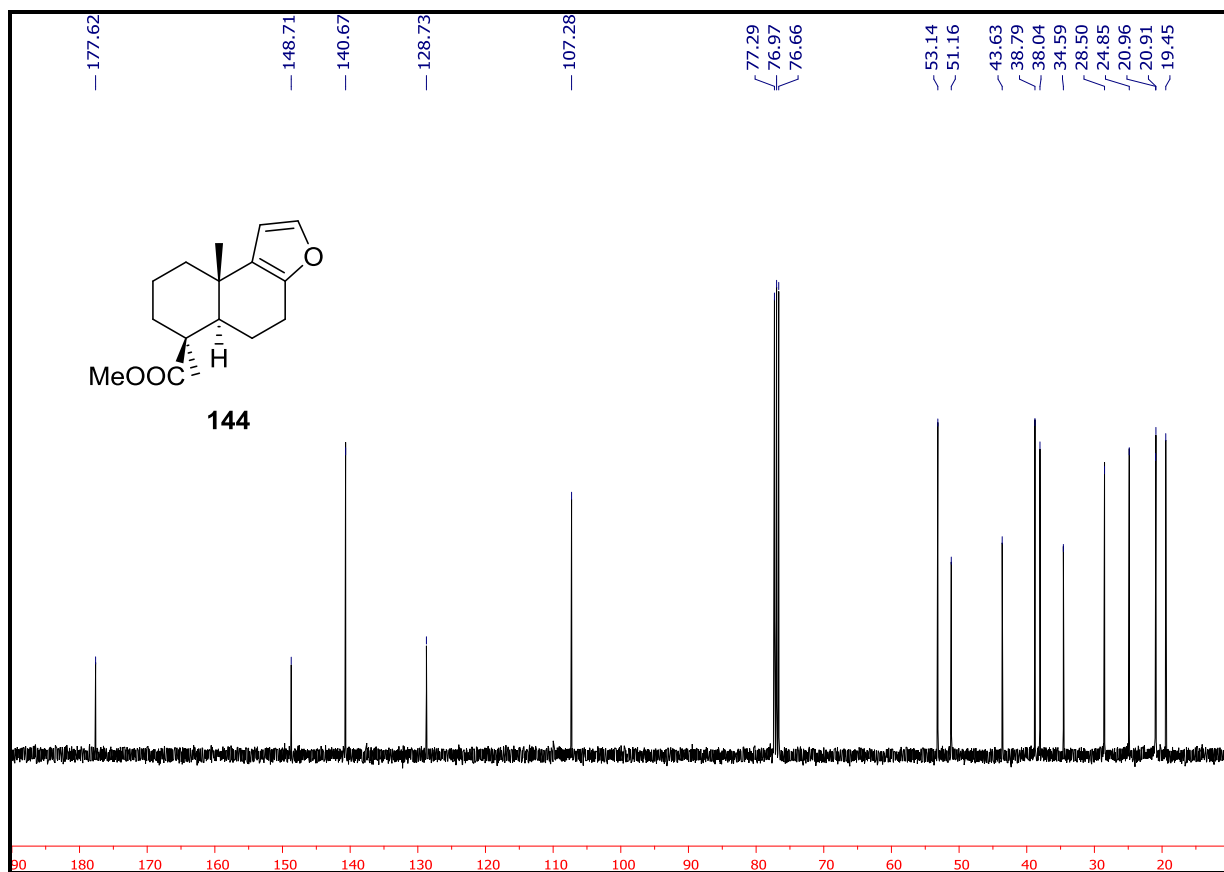
17) “A new synthetic strategy towards ring a functionalized abietane phenols” Reunión de Química Orgánica Del Mediterráneo, **2015**, Malaga- Spain.

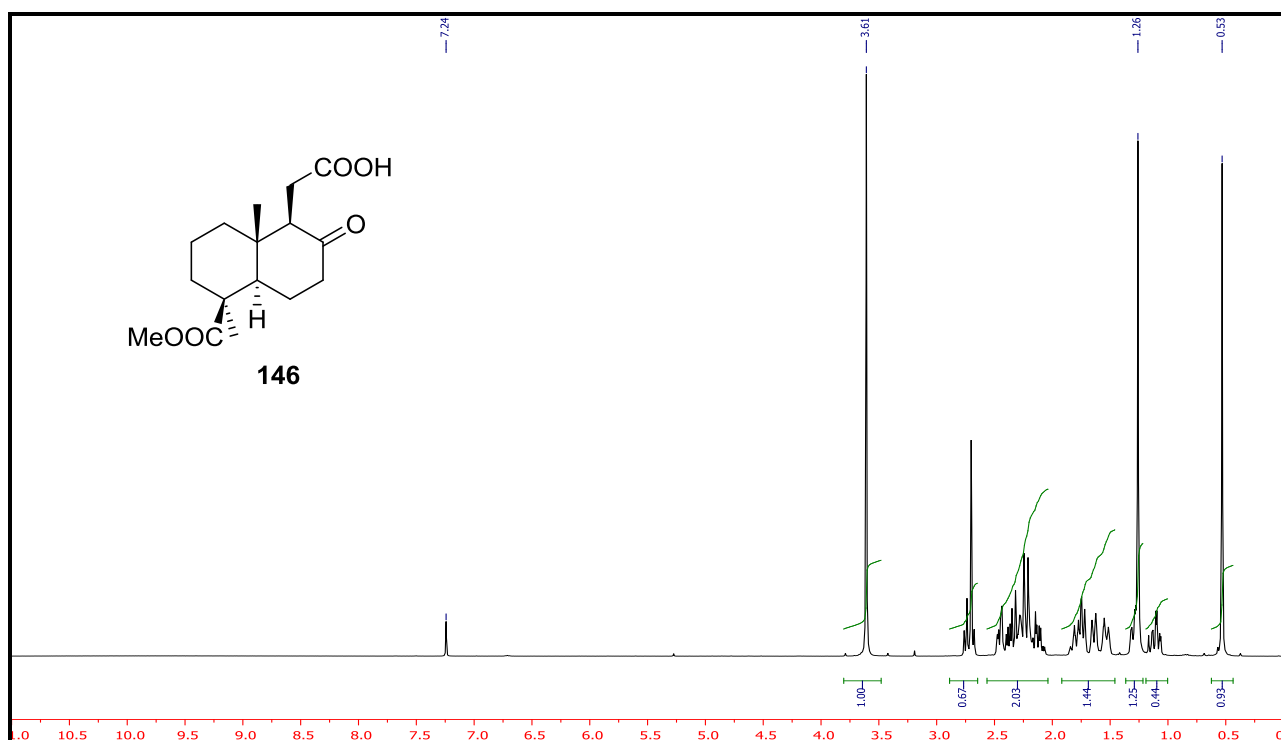
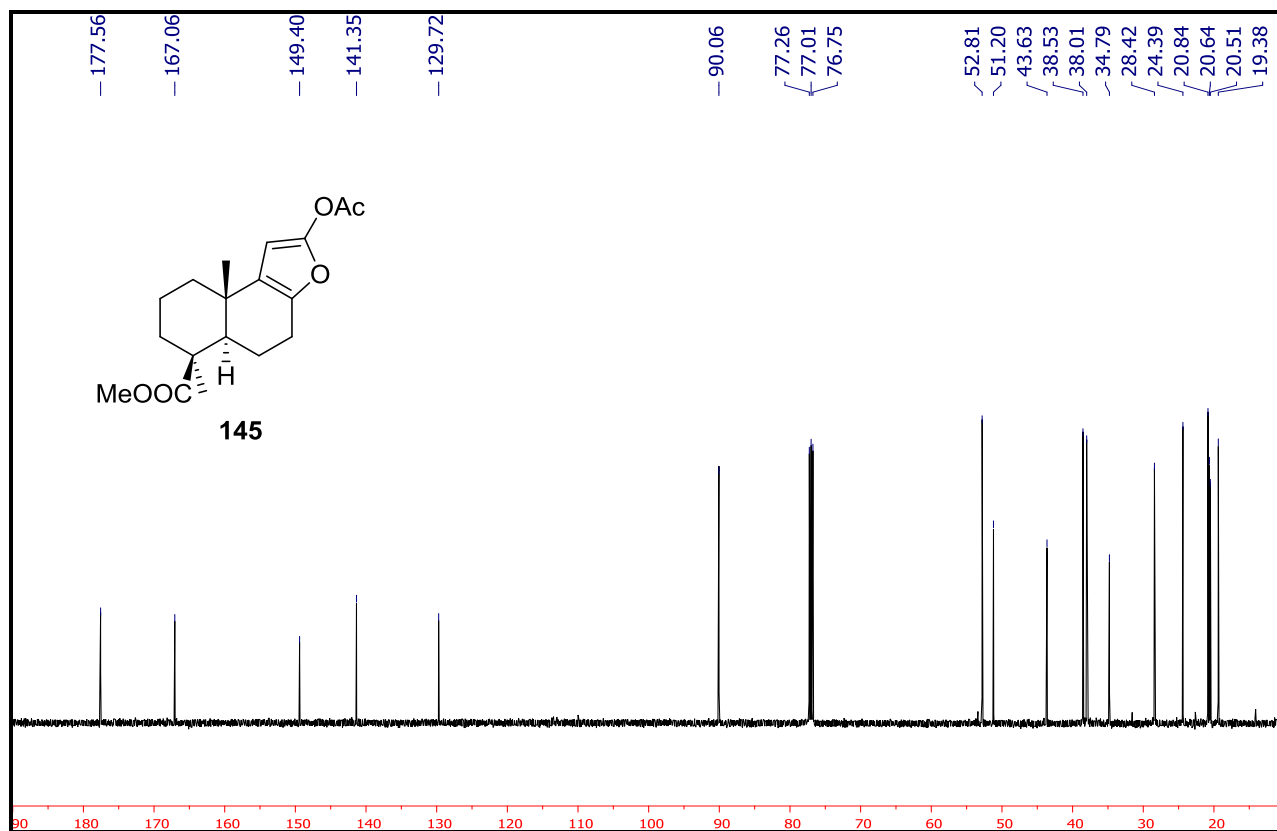
ESPECTROS

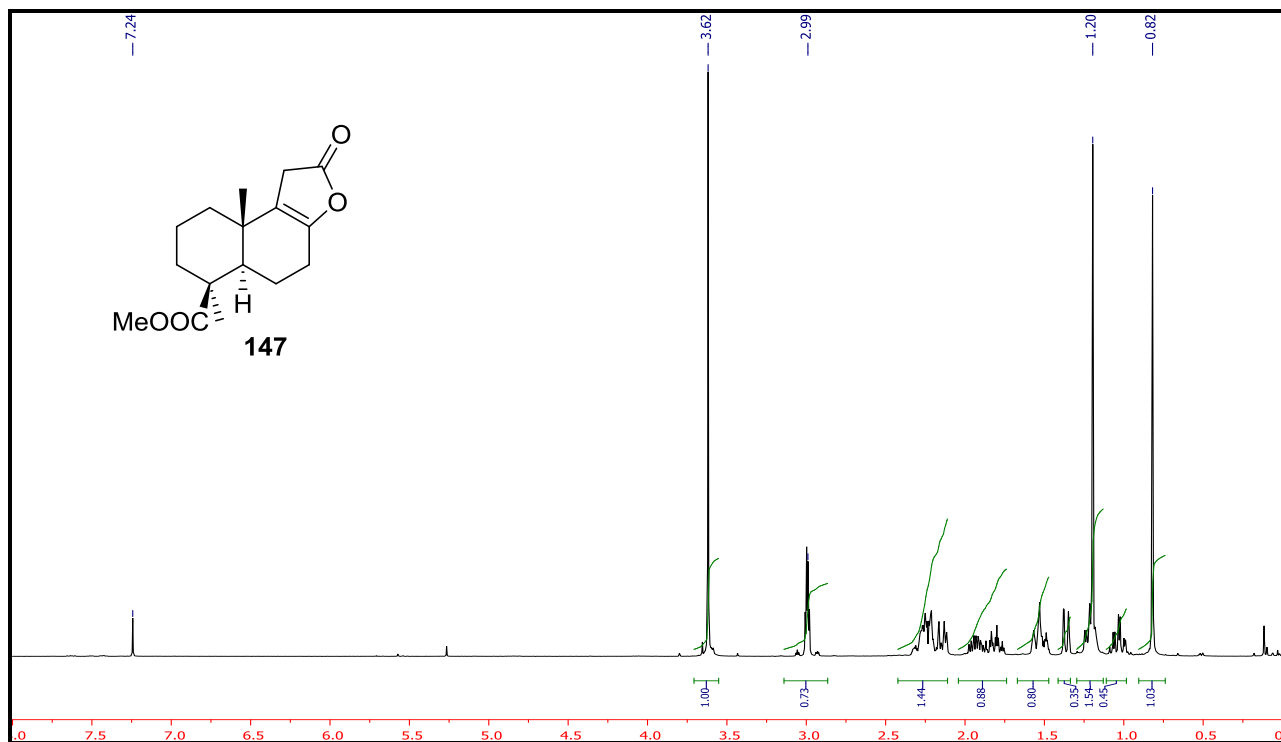
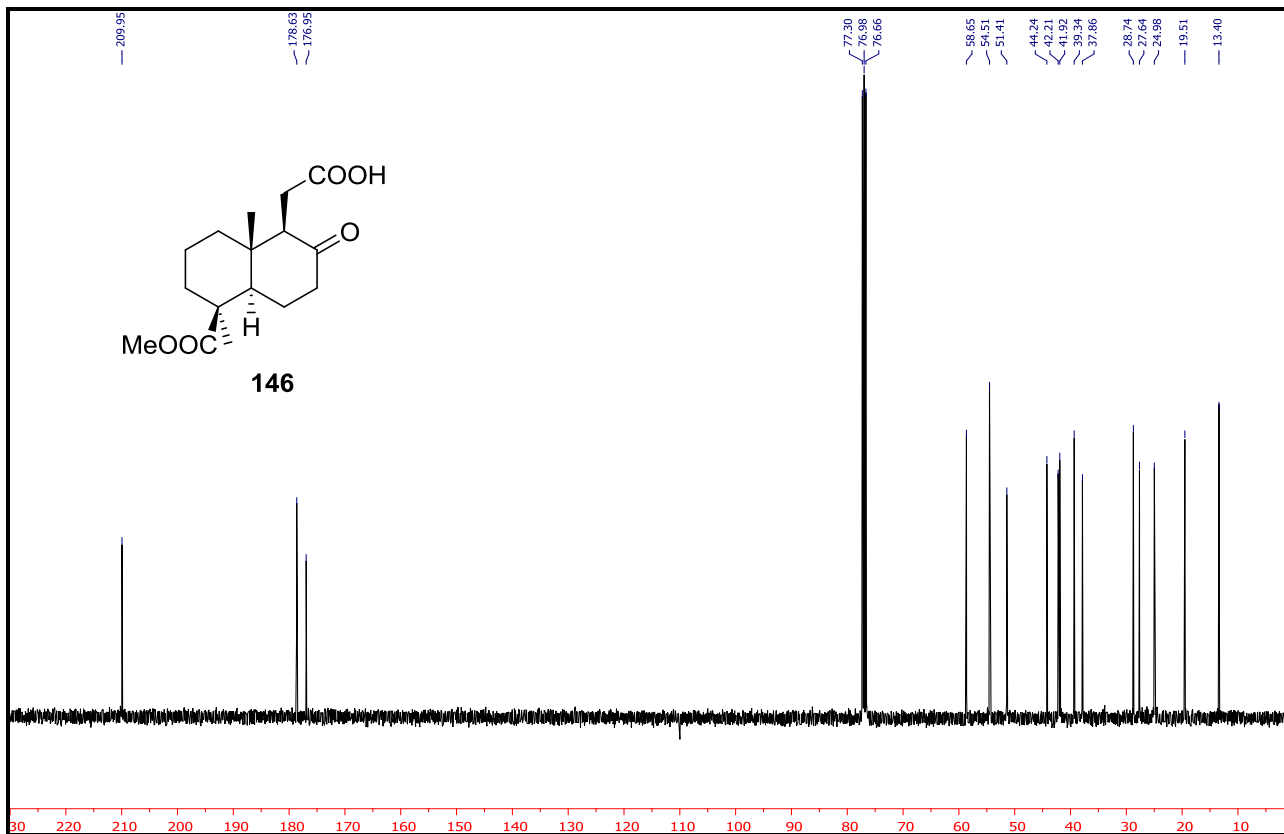


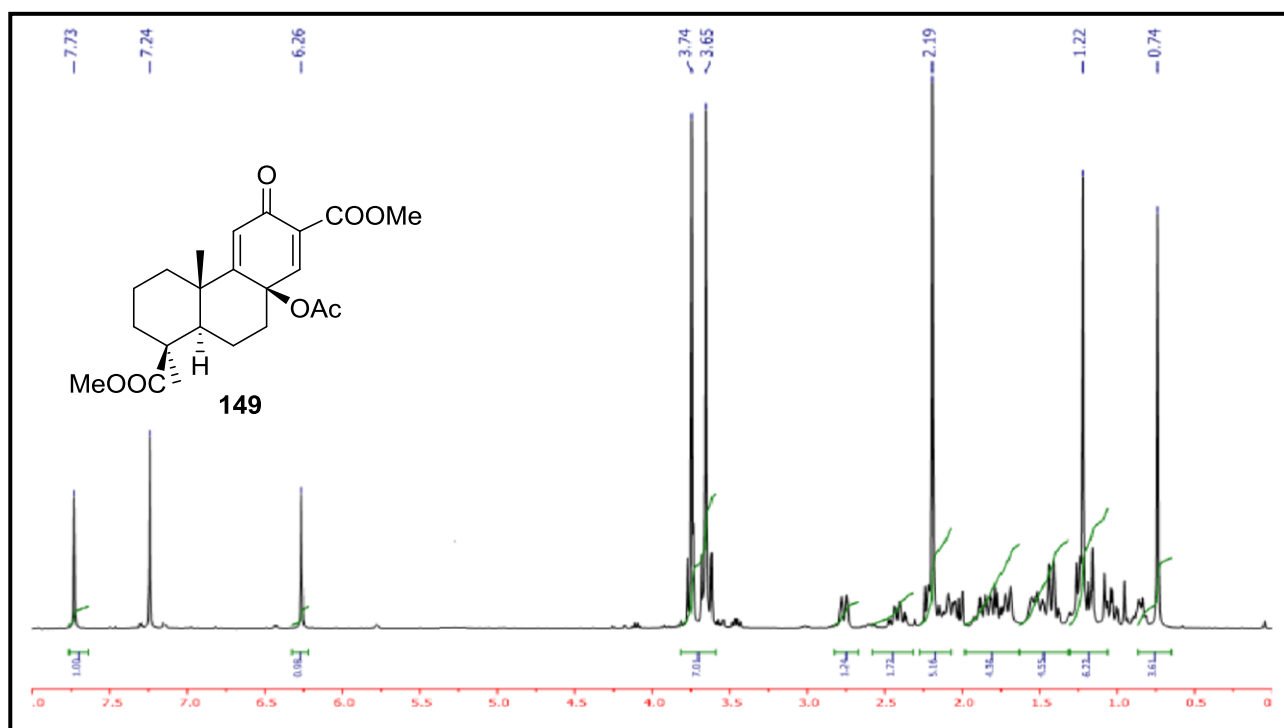
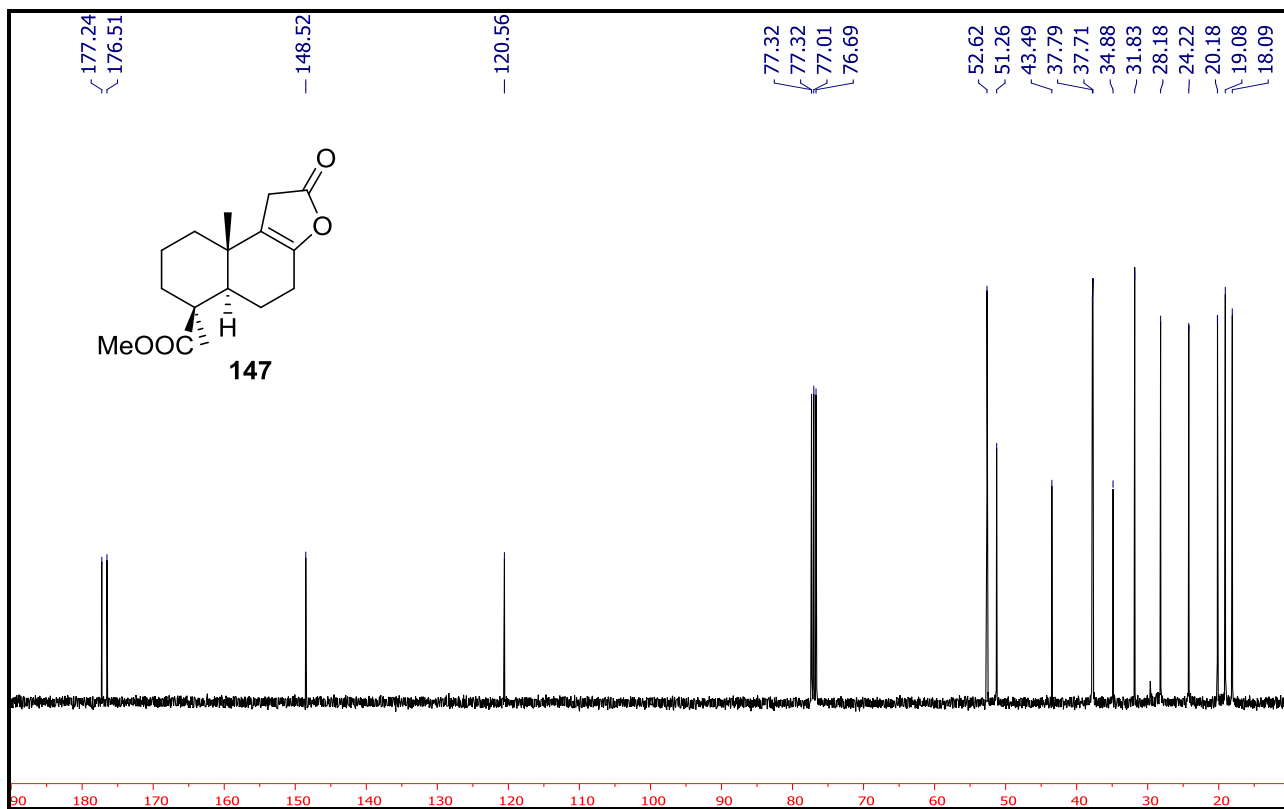


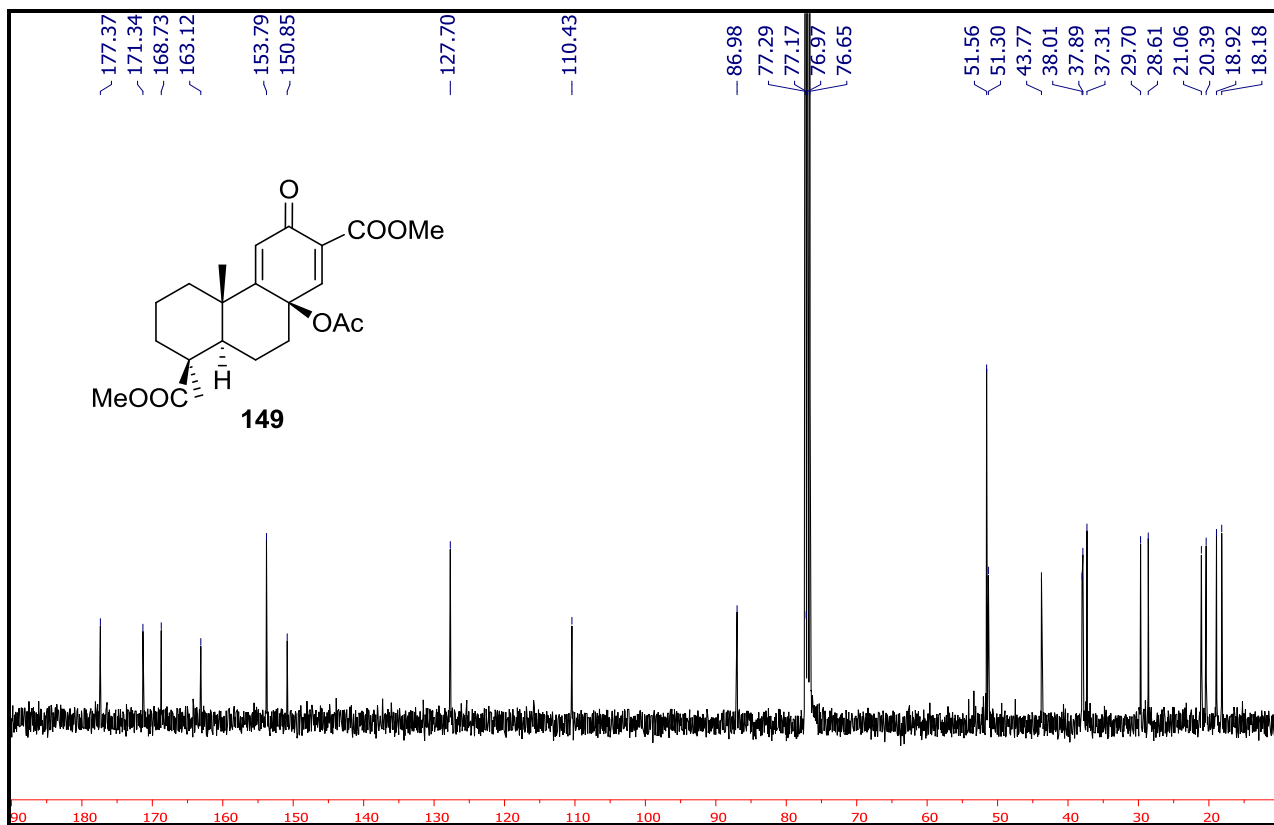


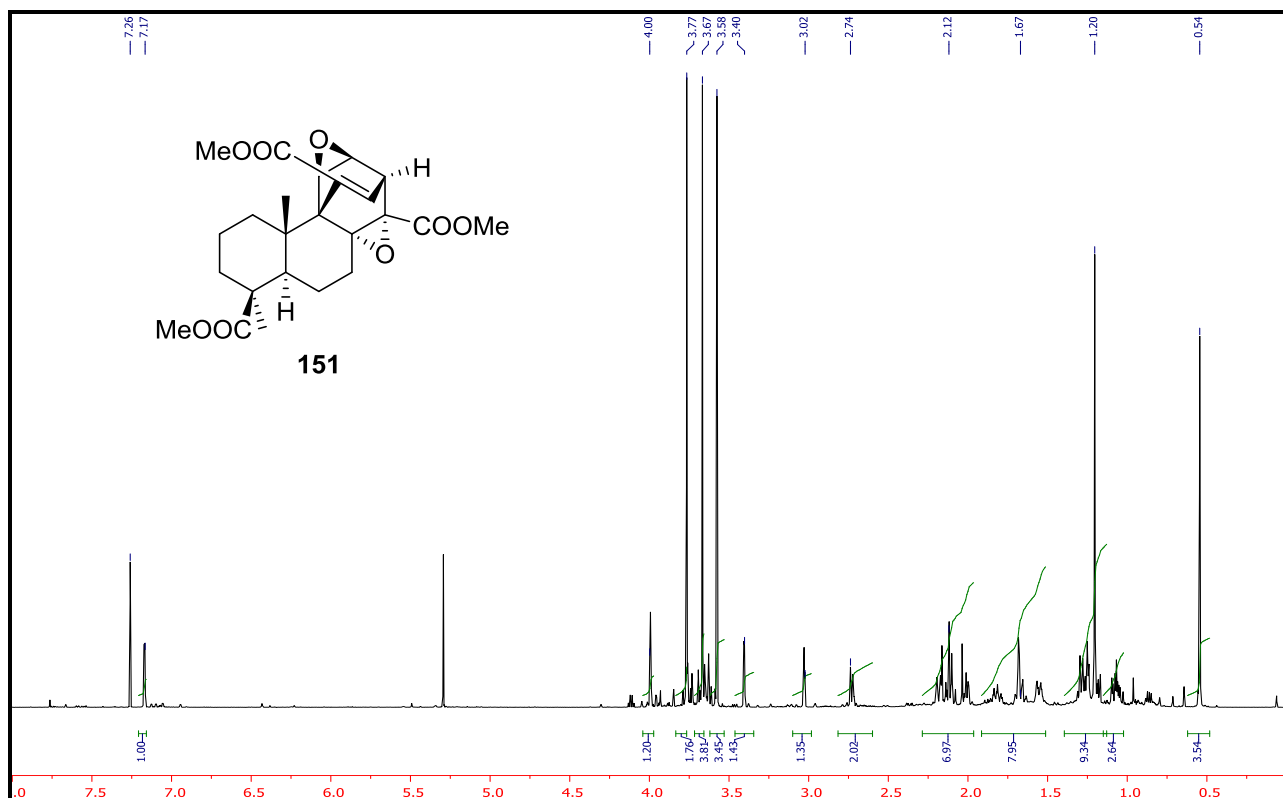


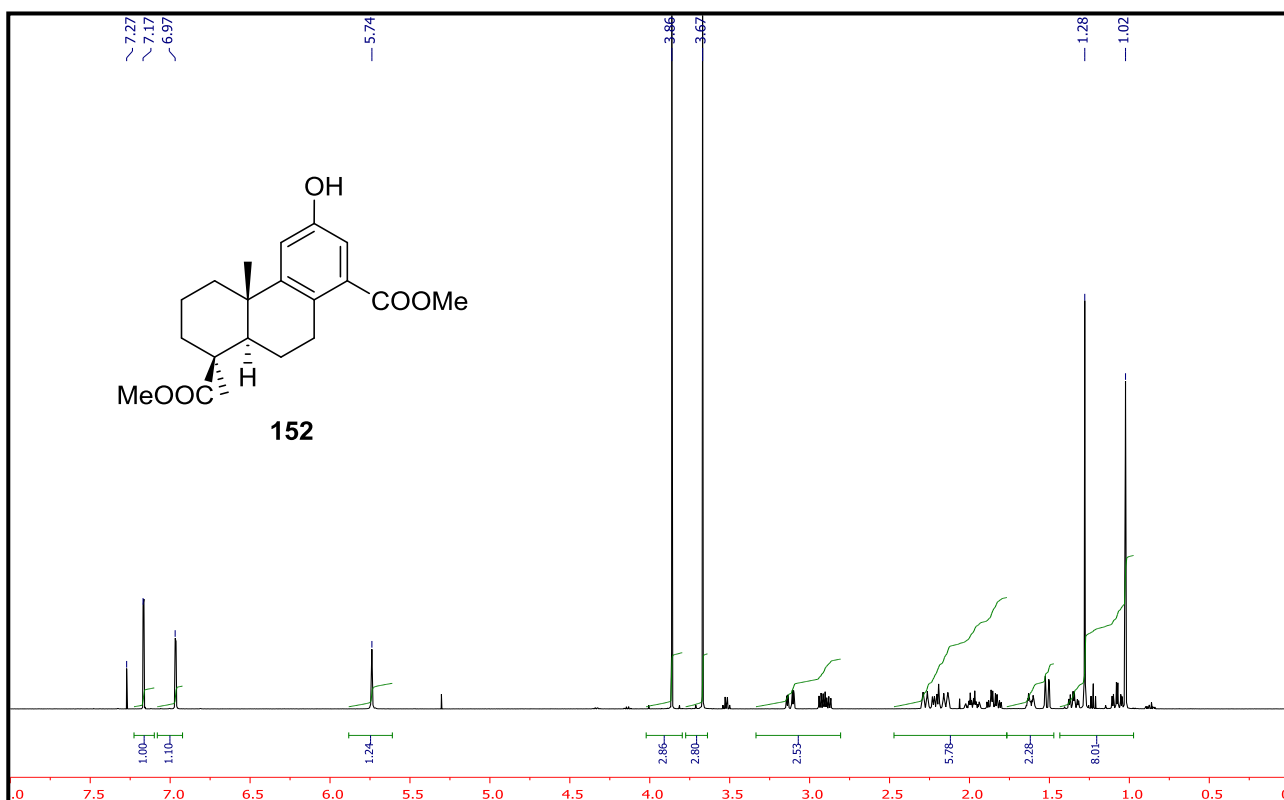
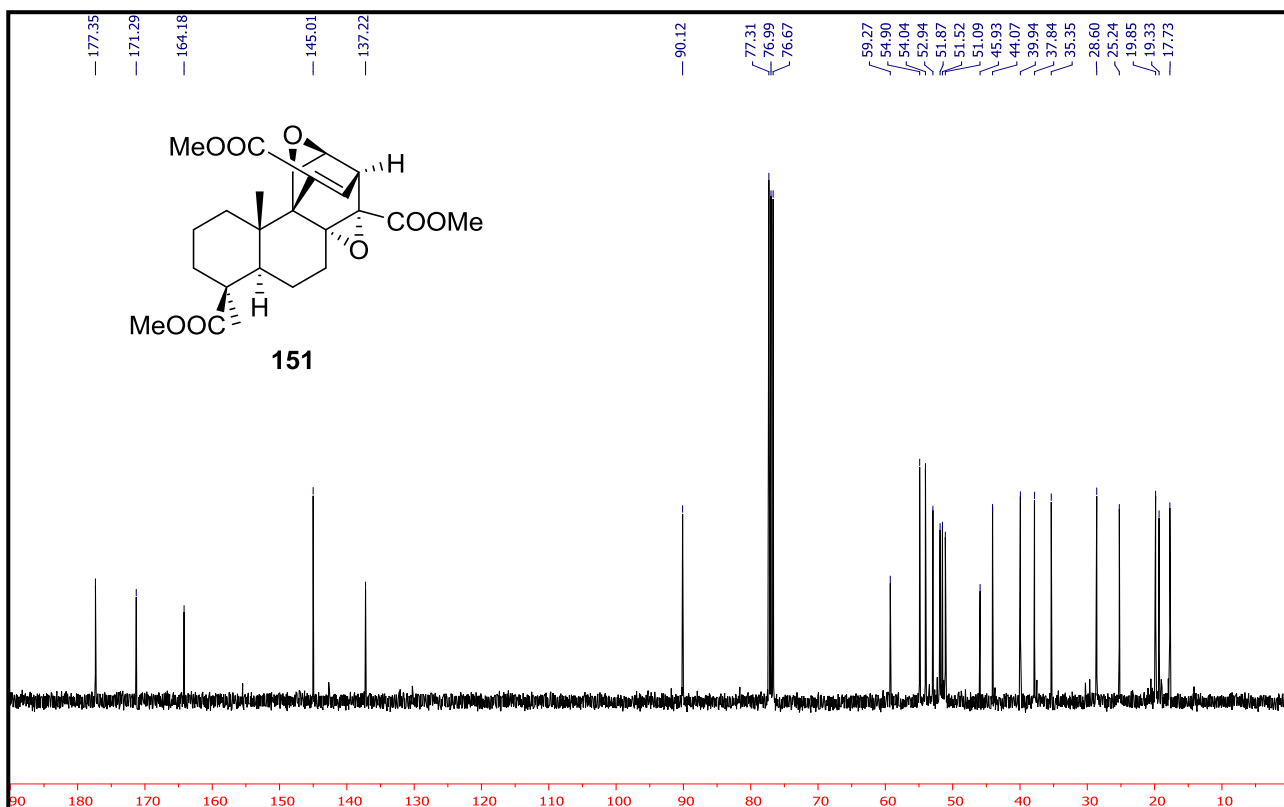


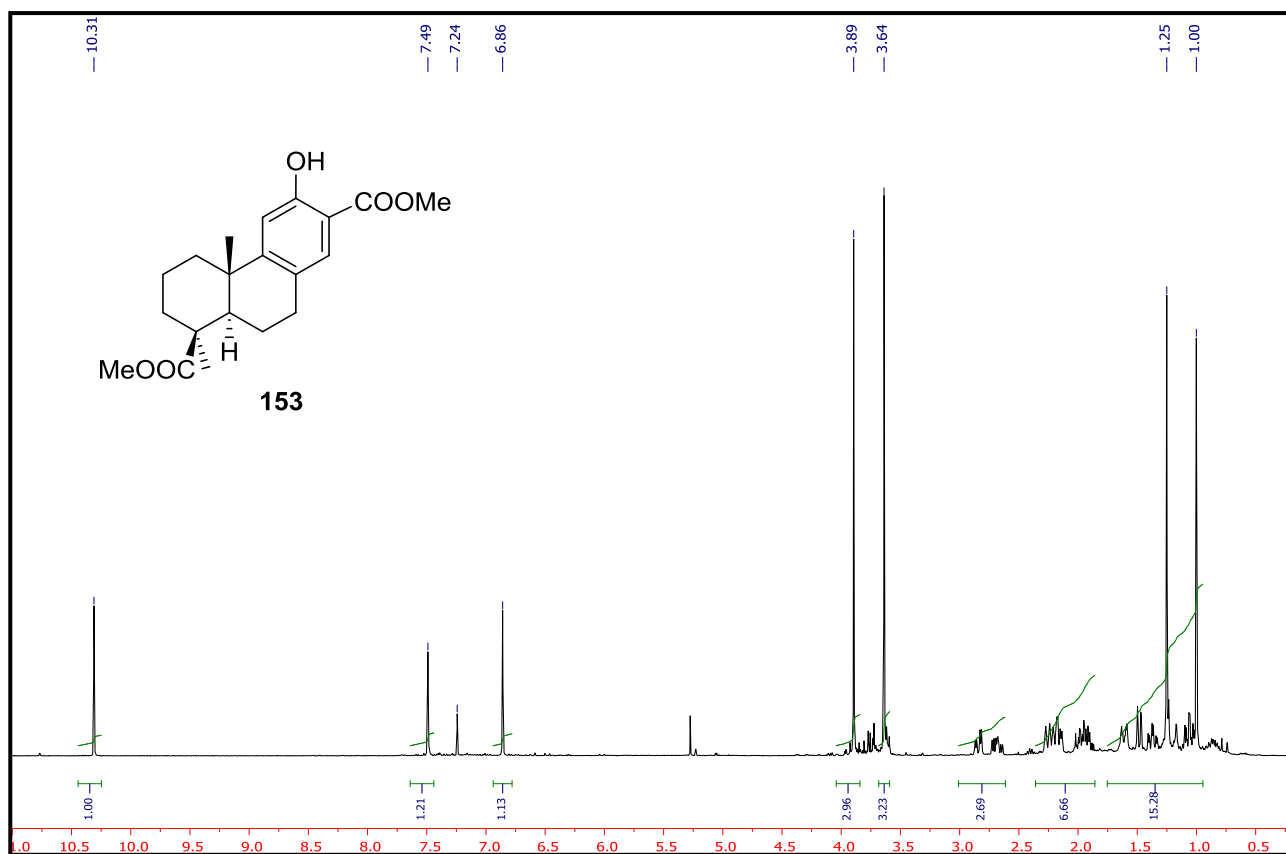
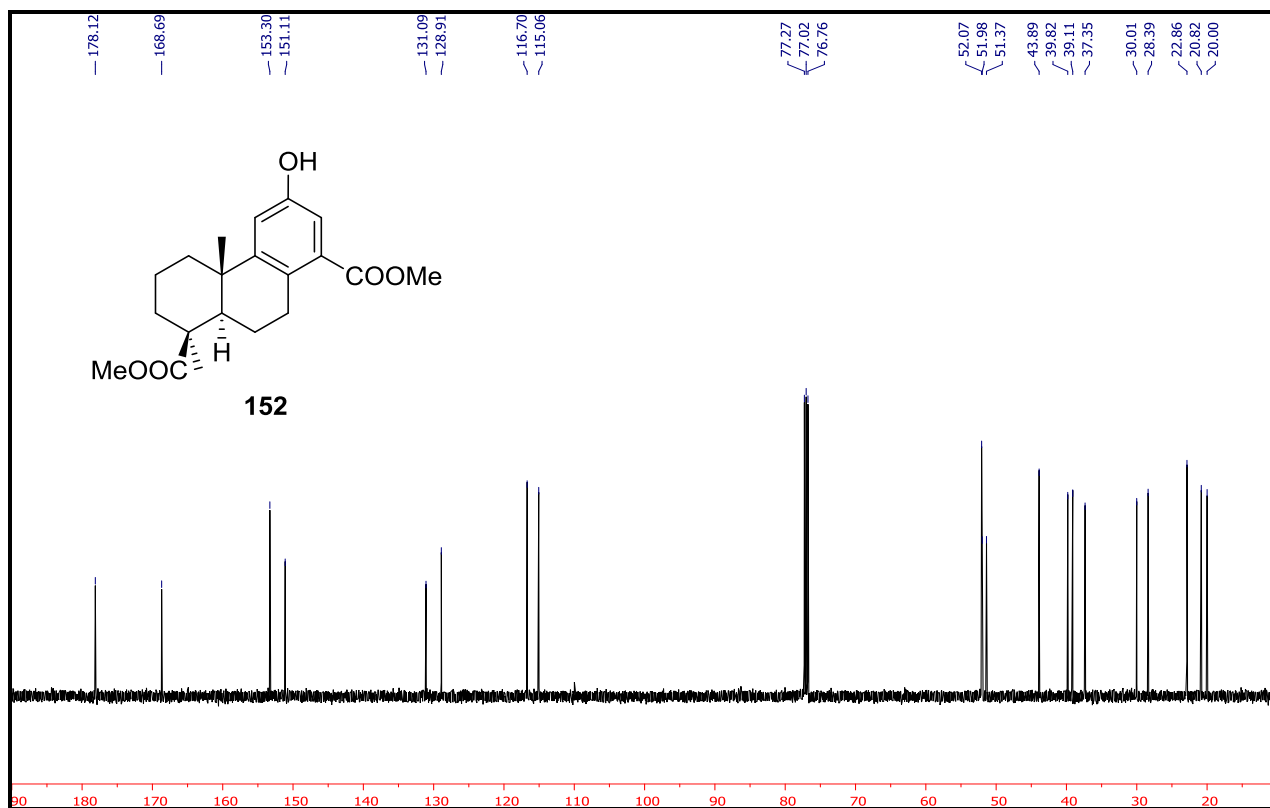


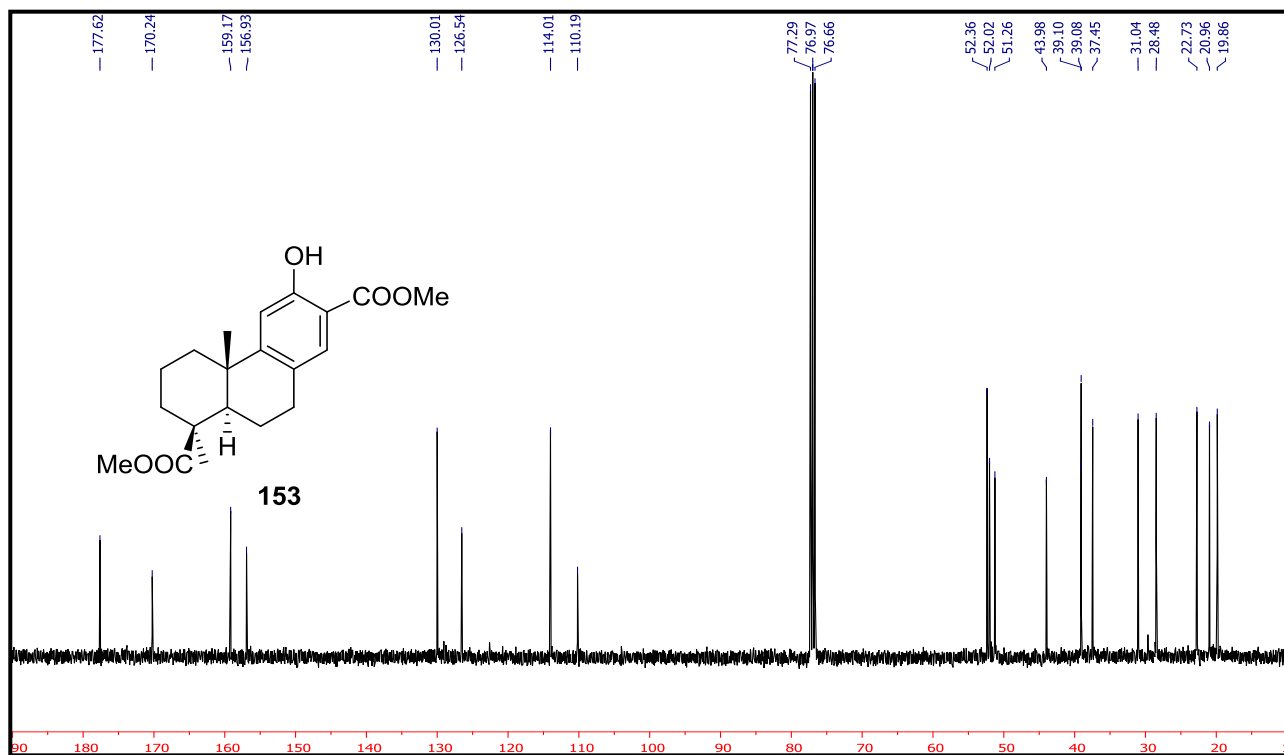


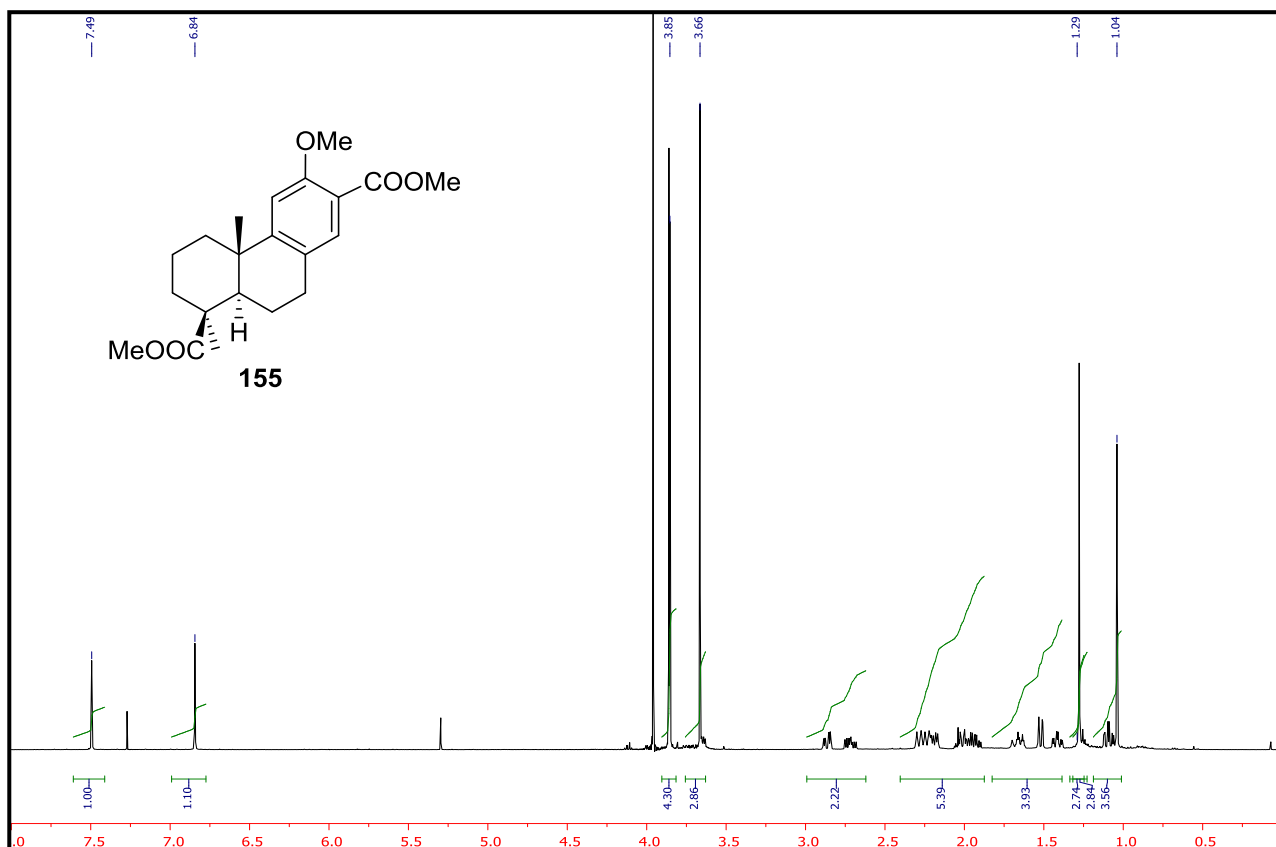


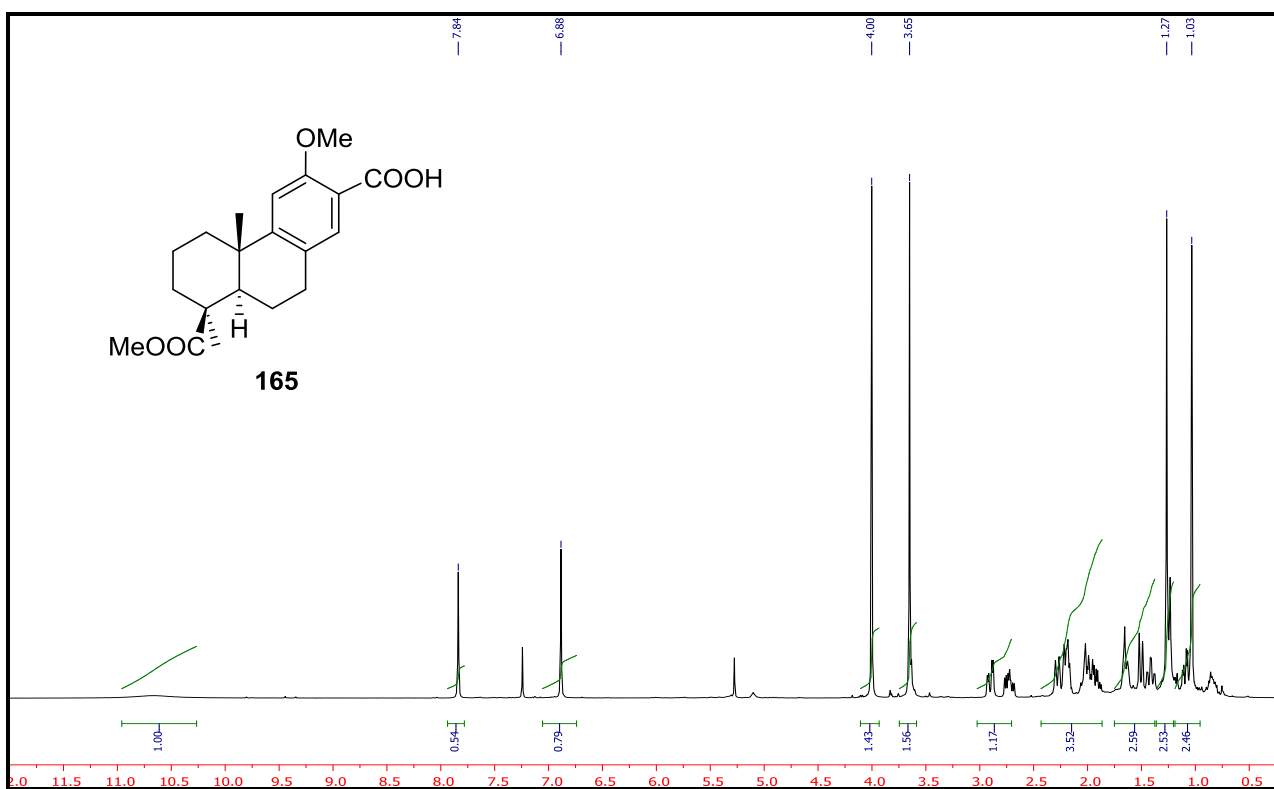
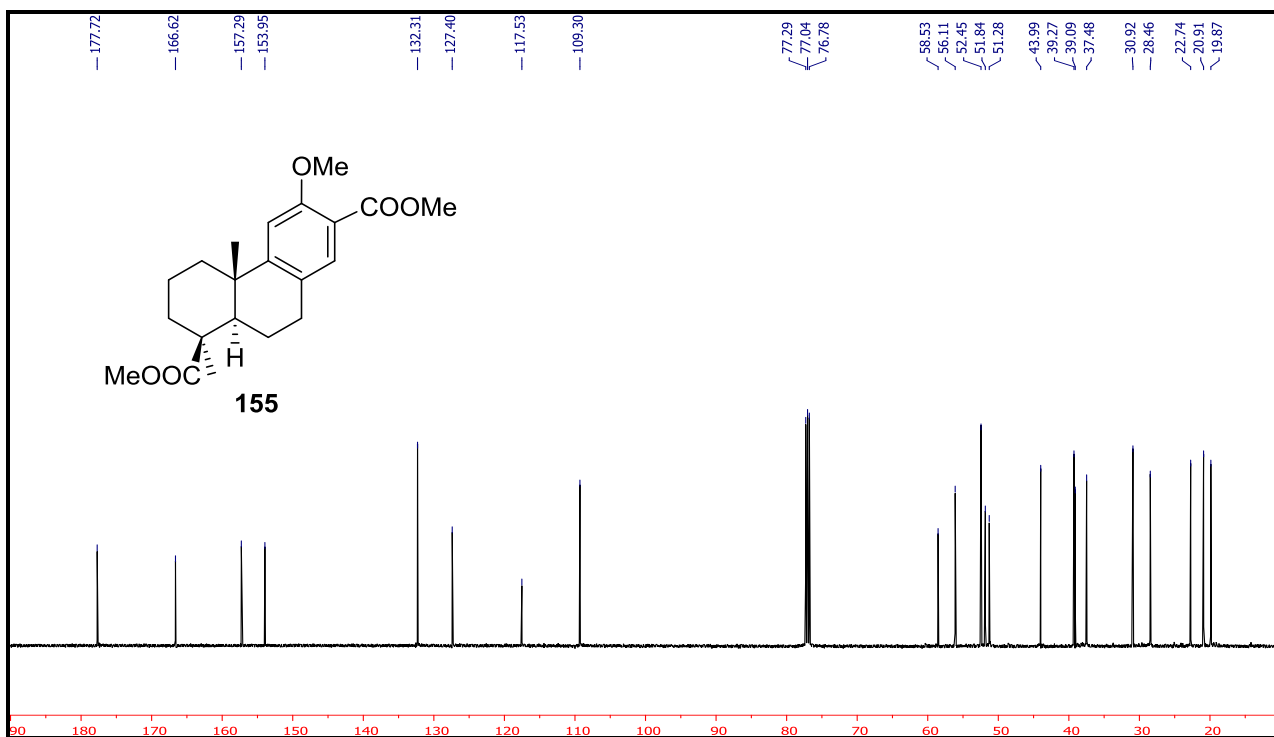


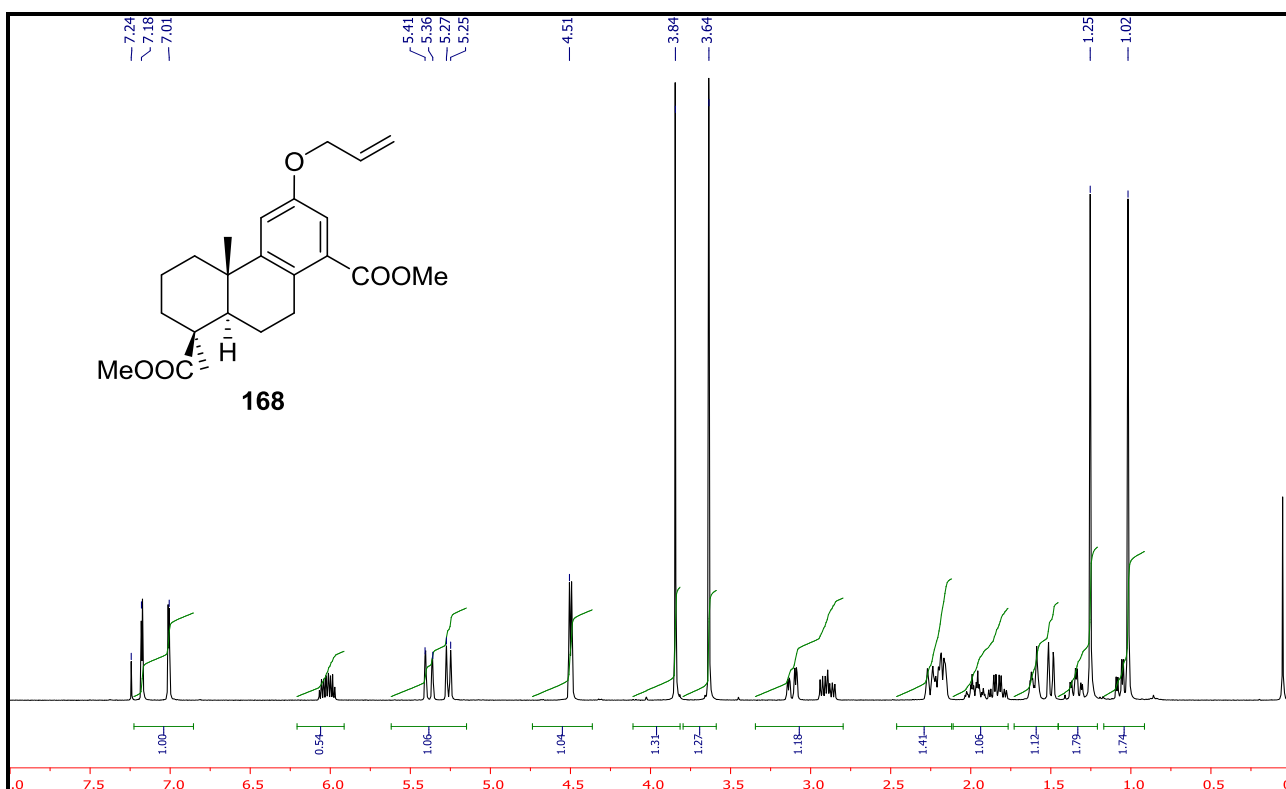
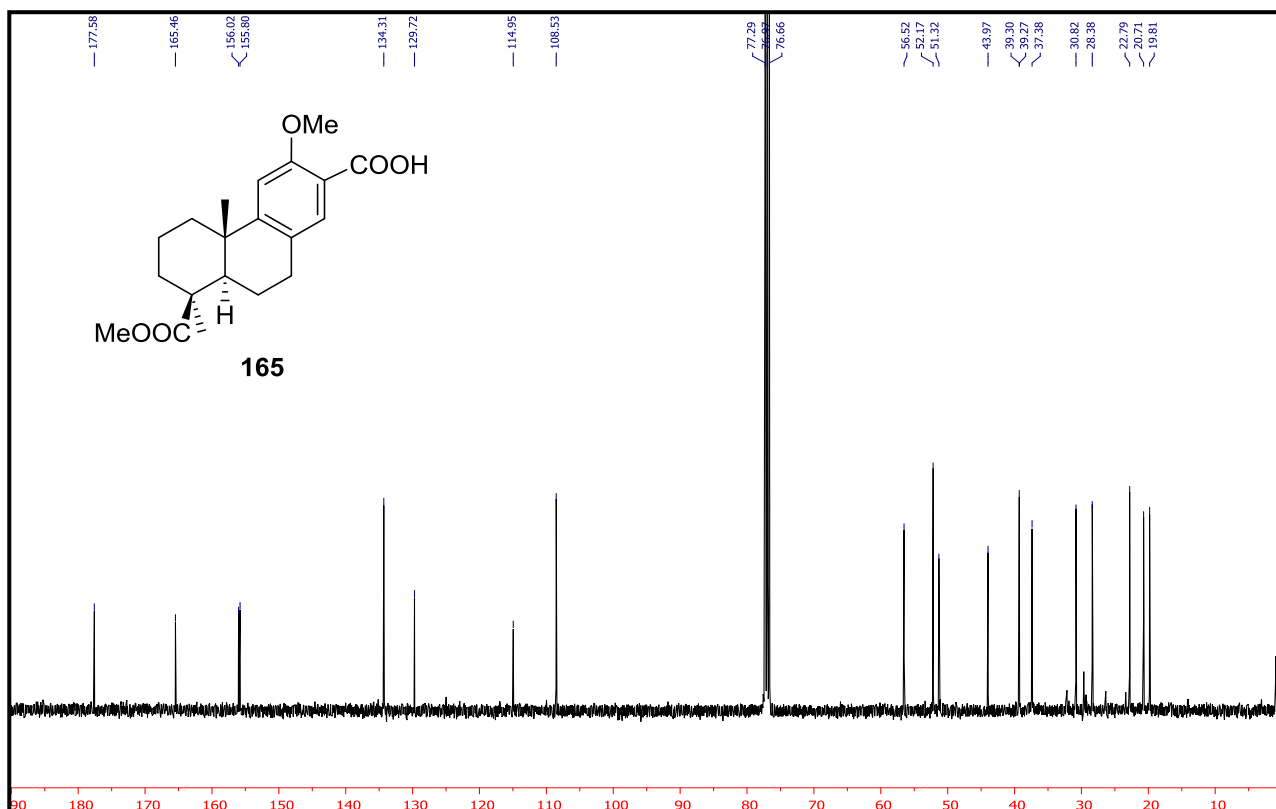


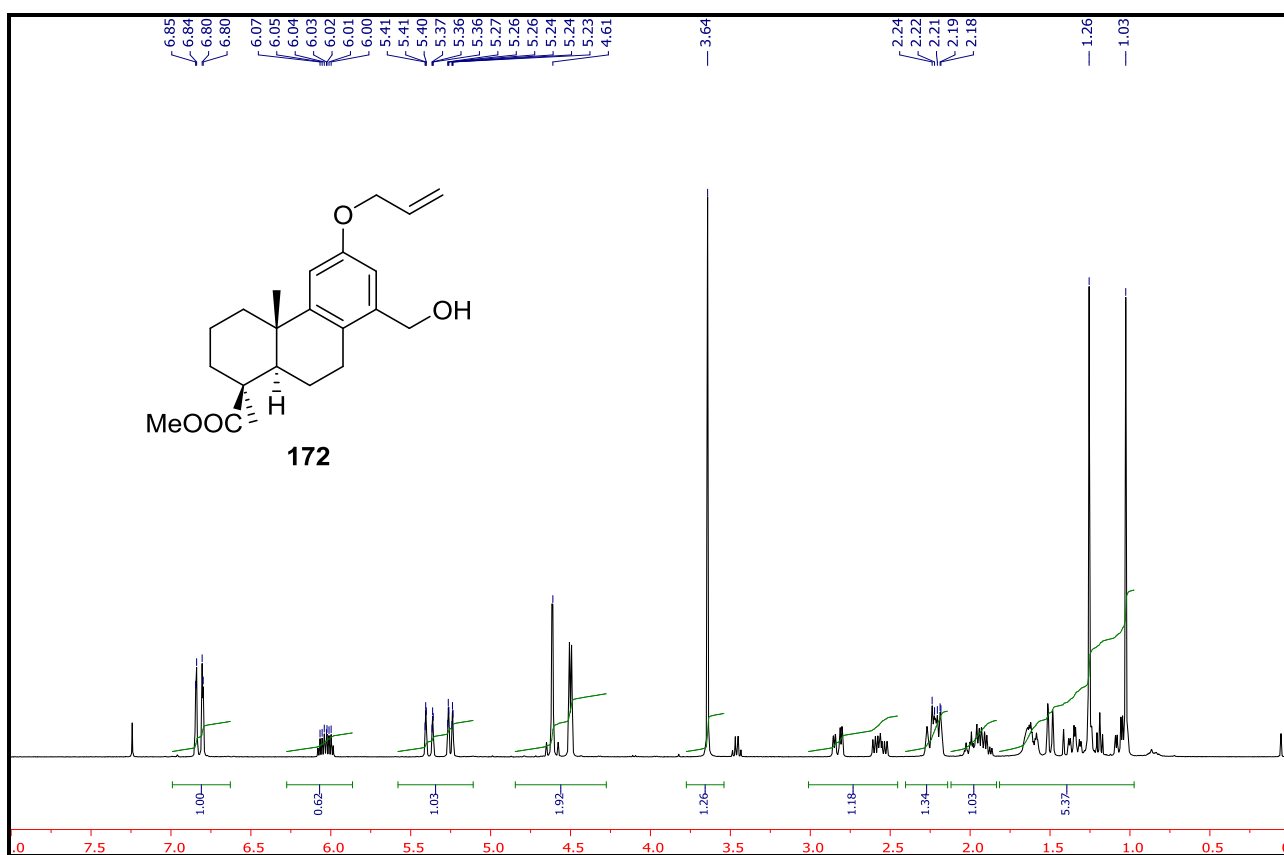
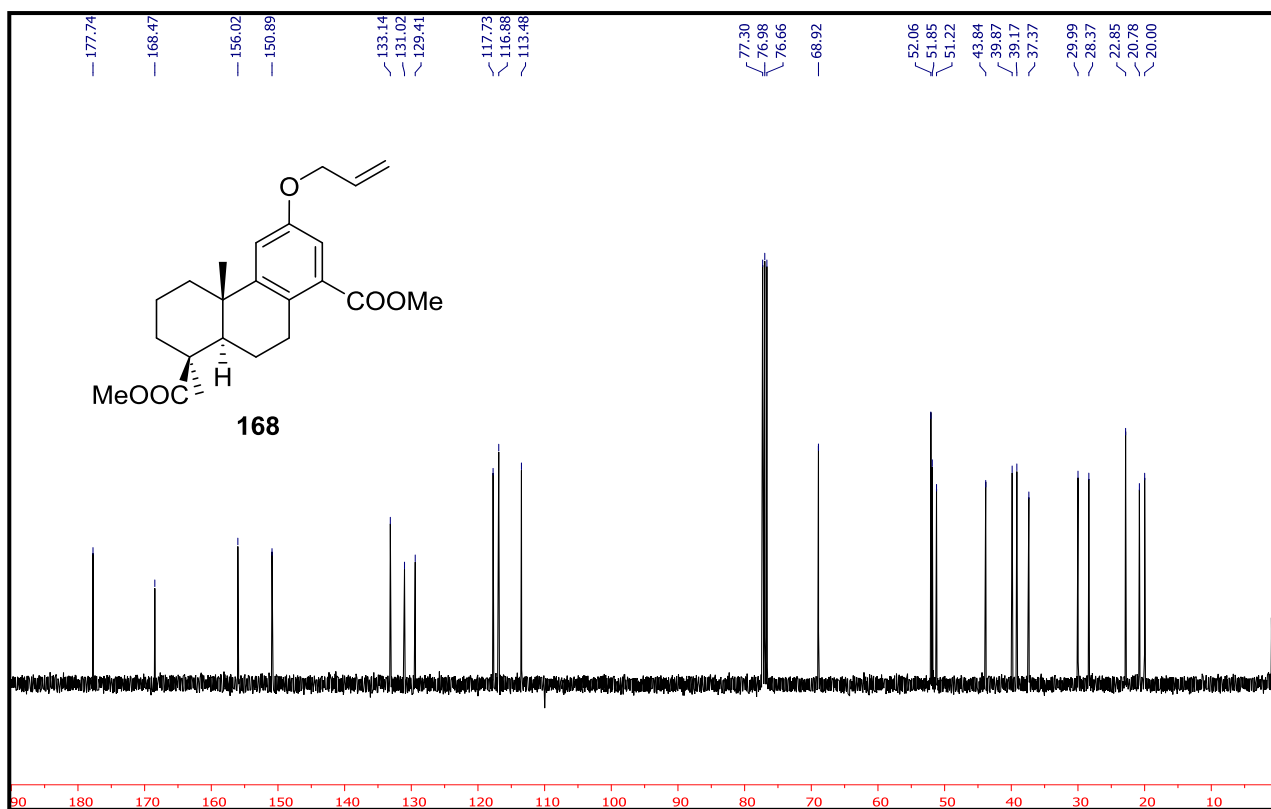


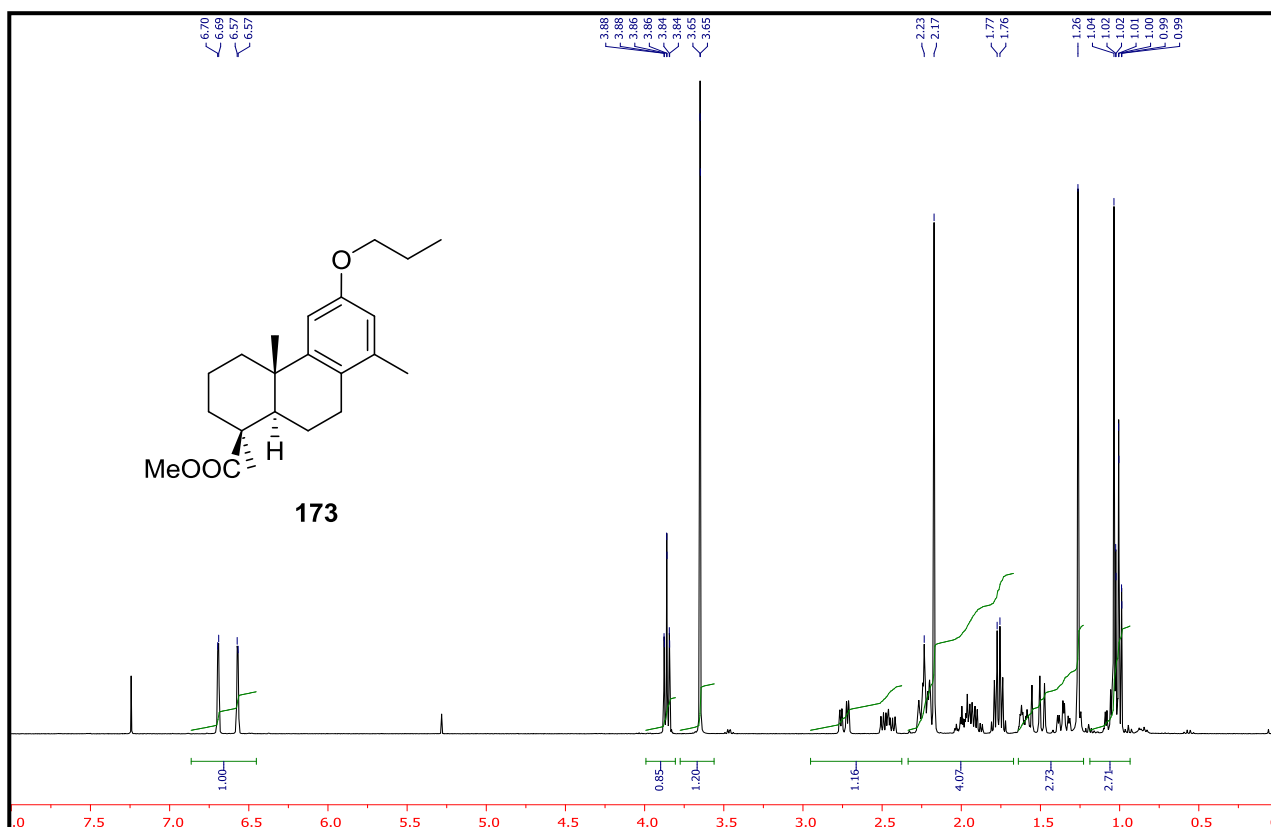
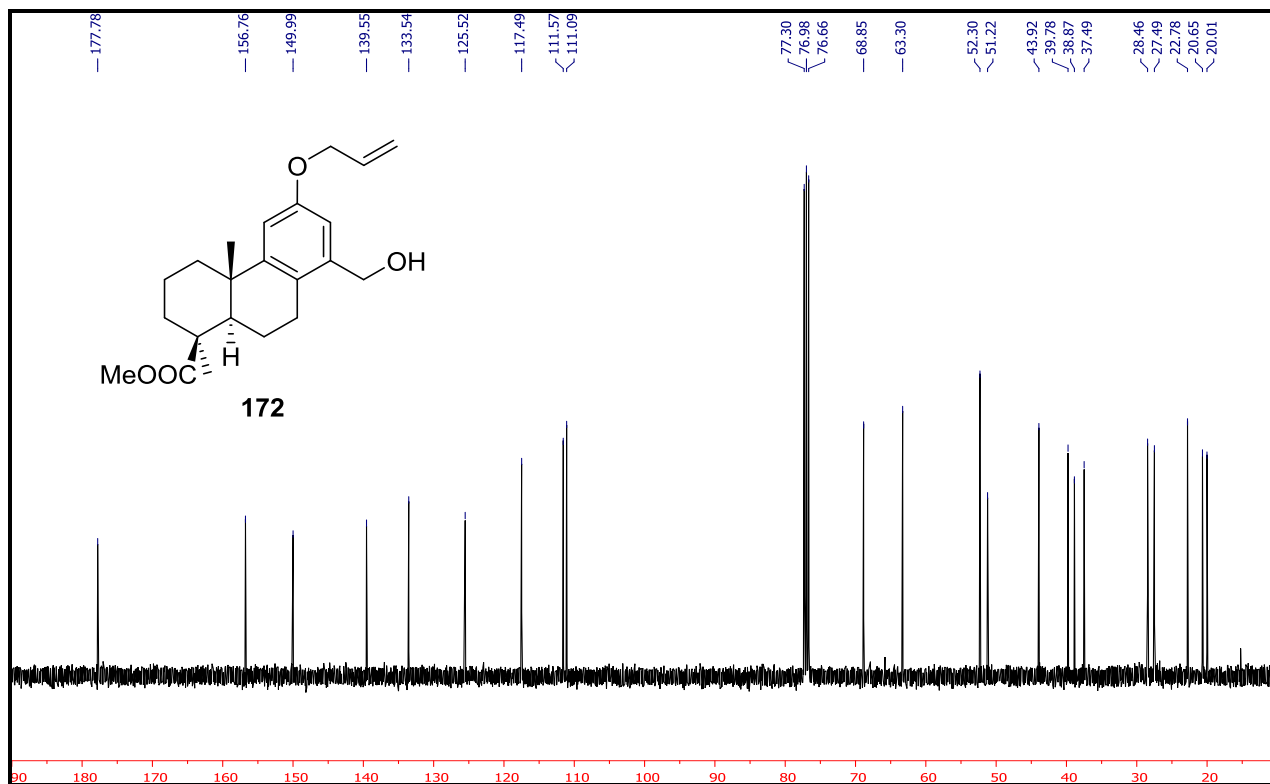


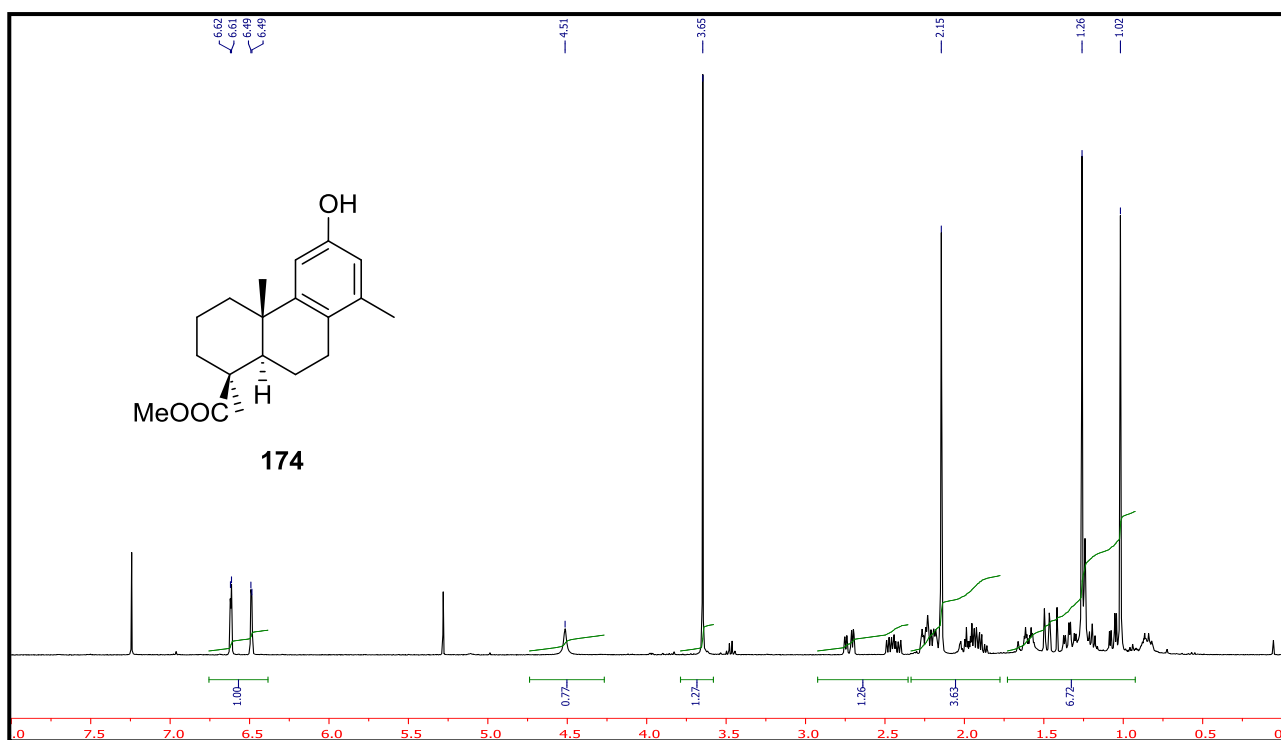
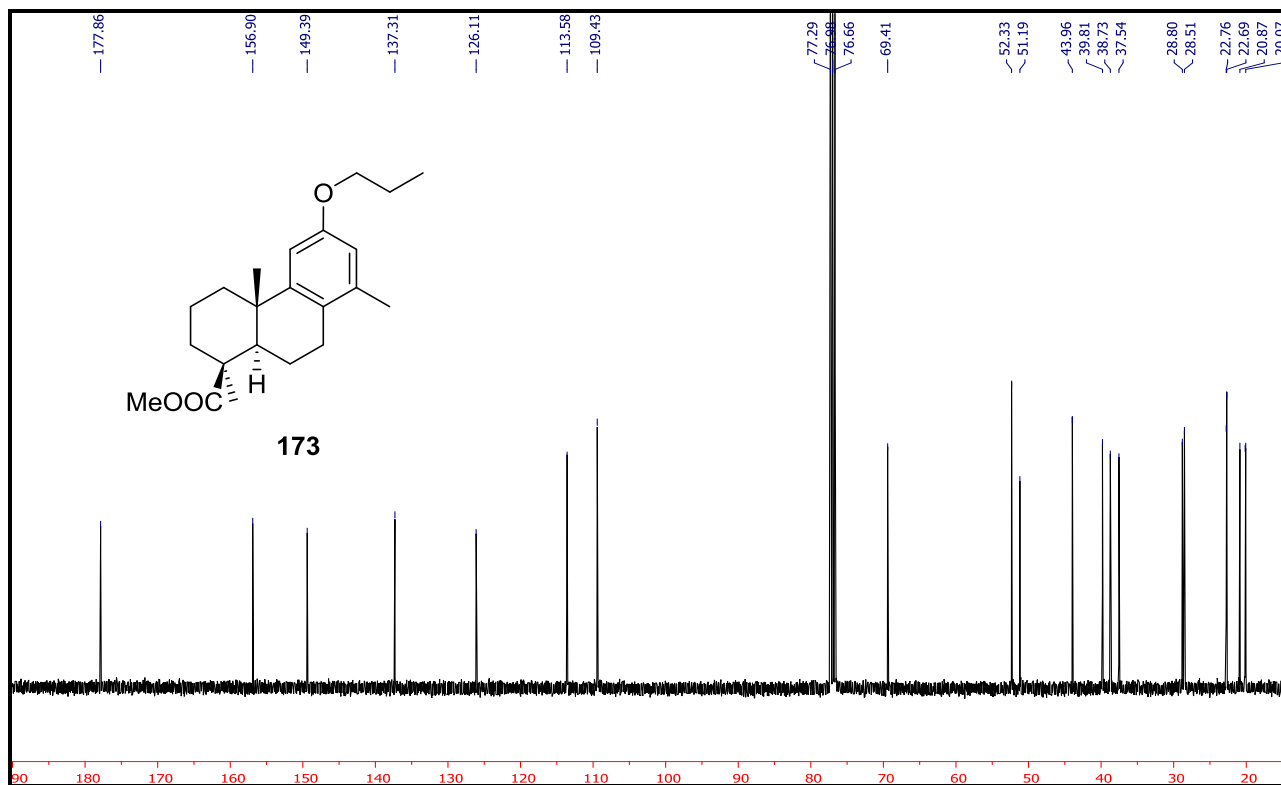


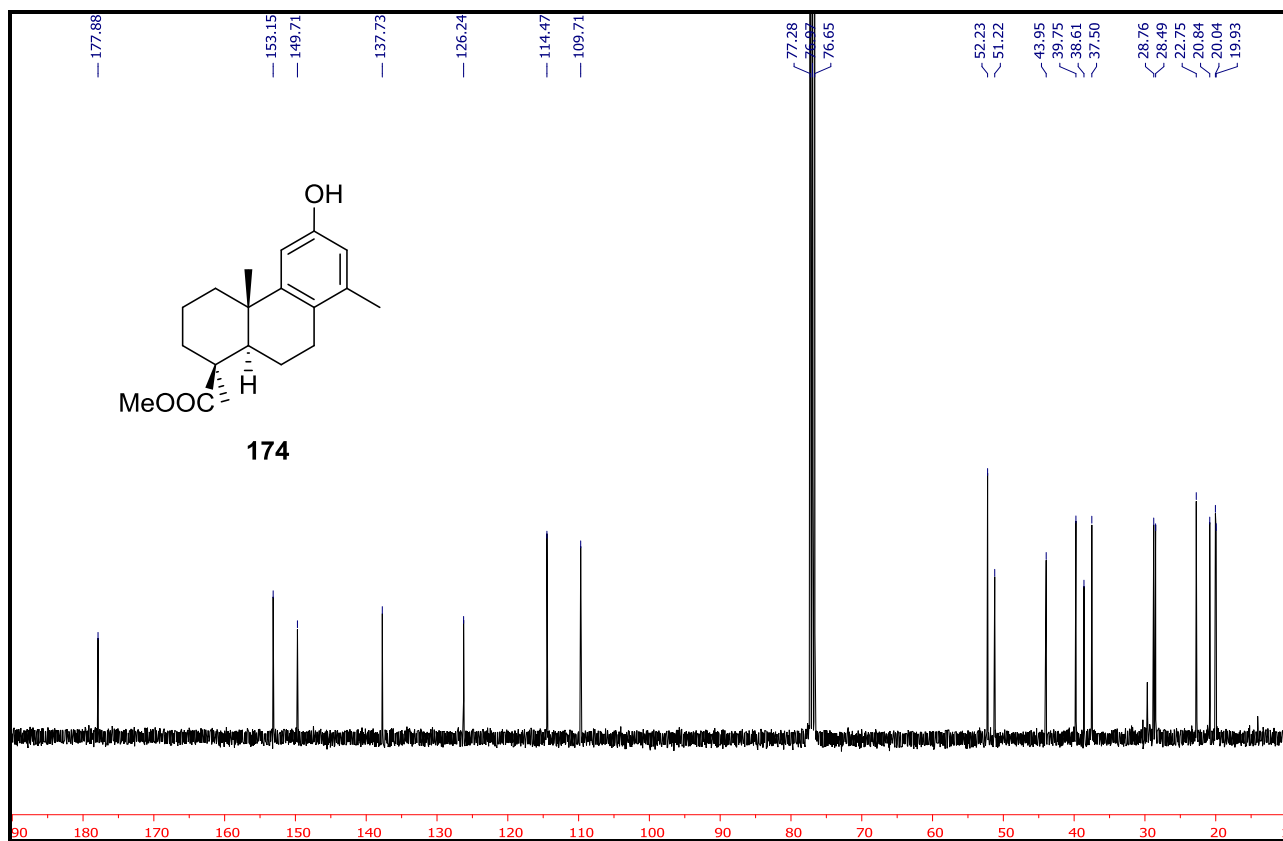


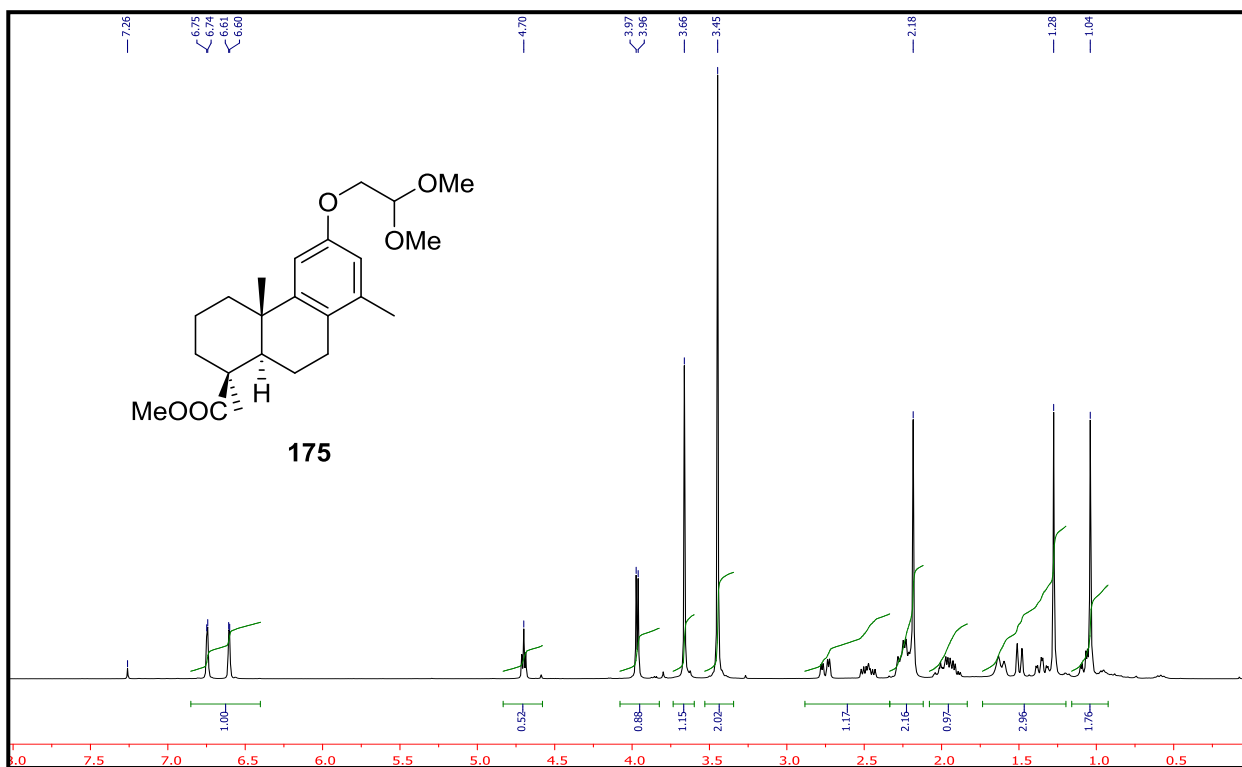


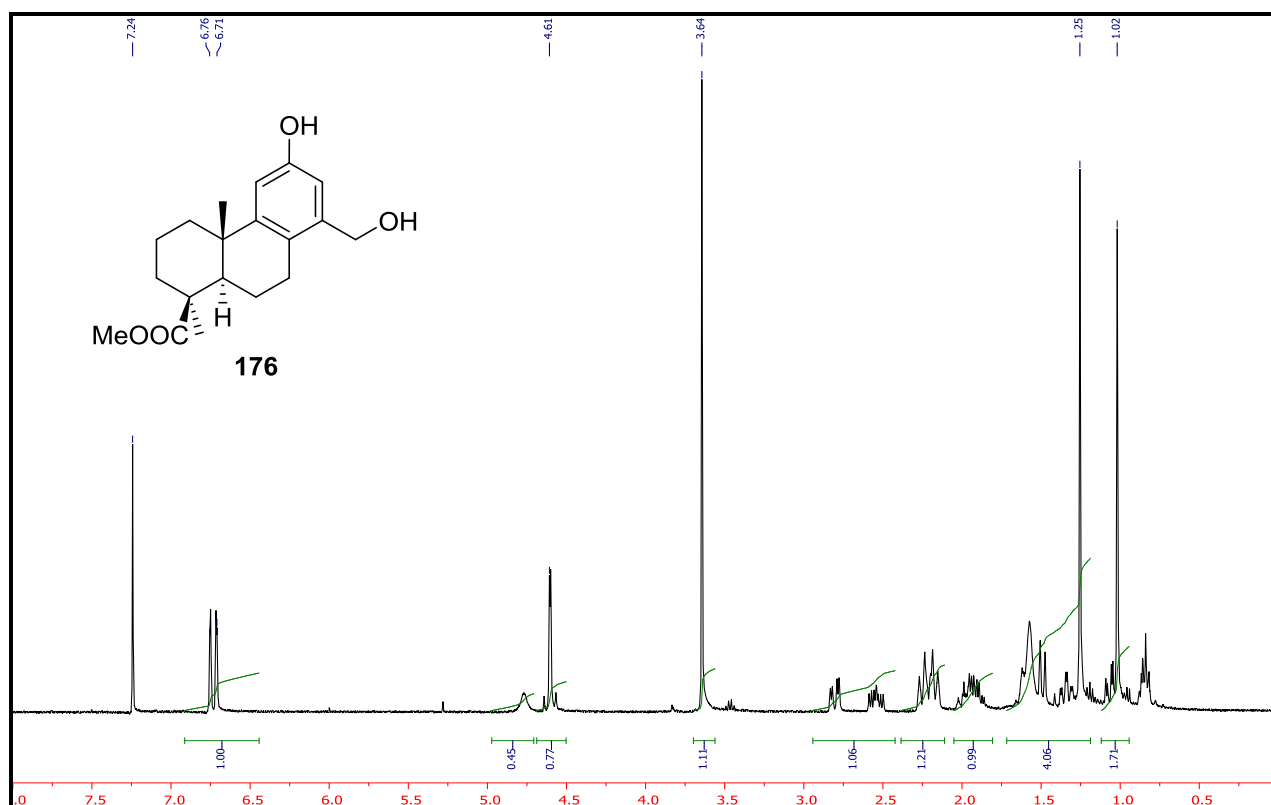
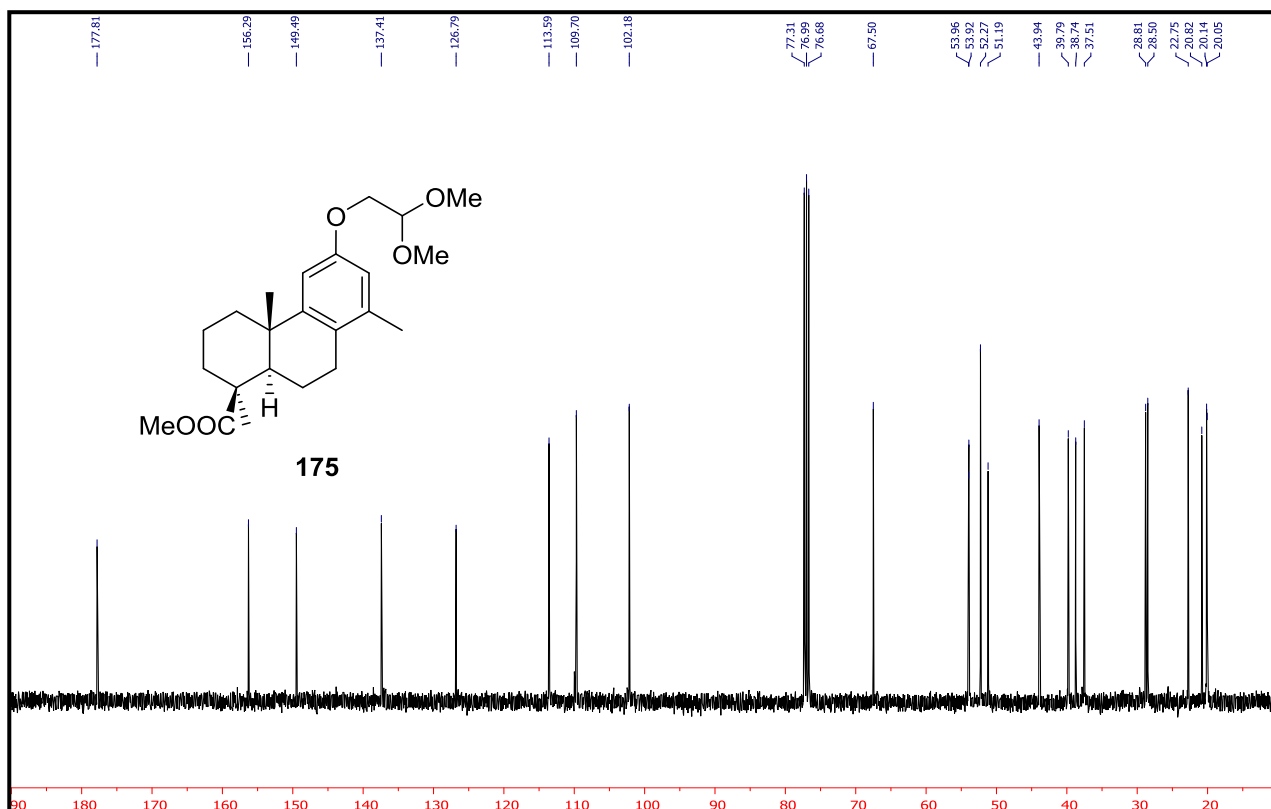


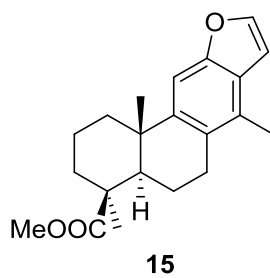
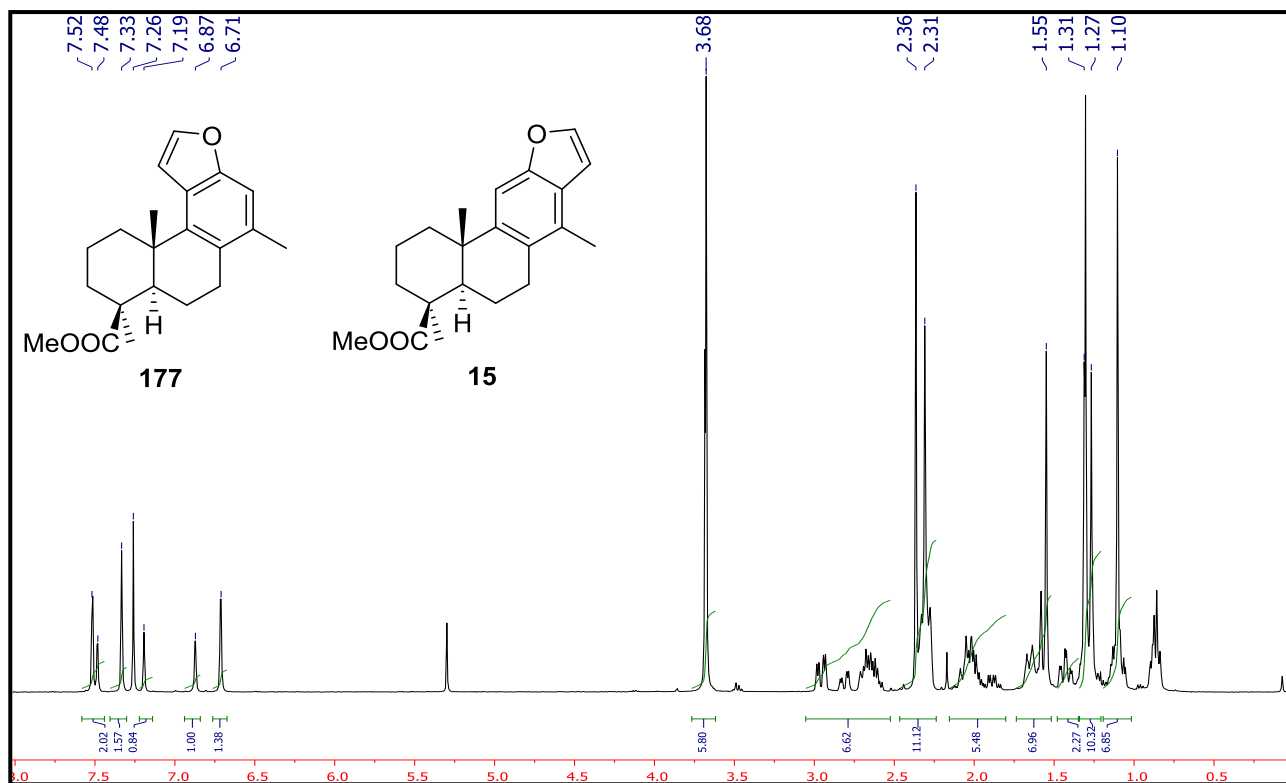
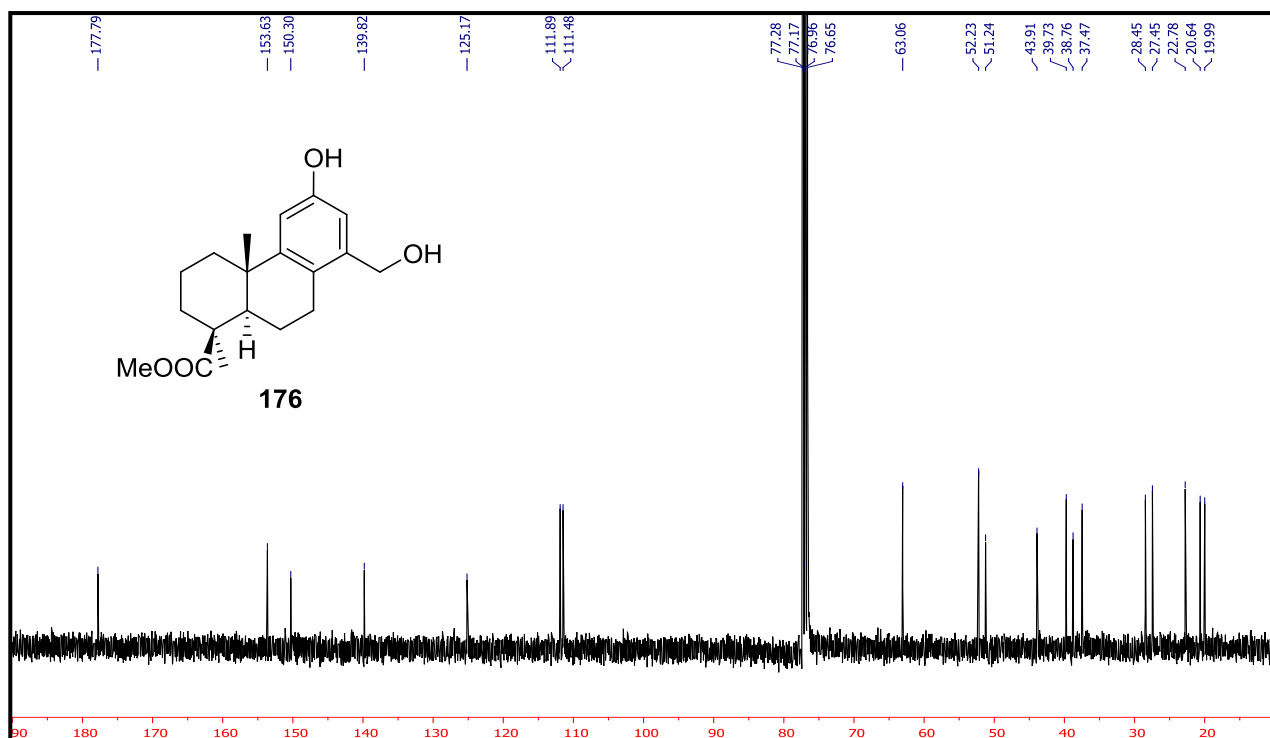


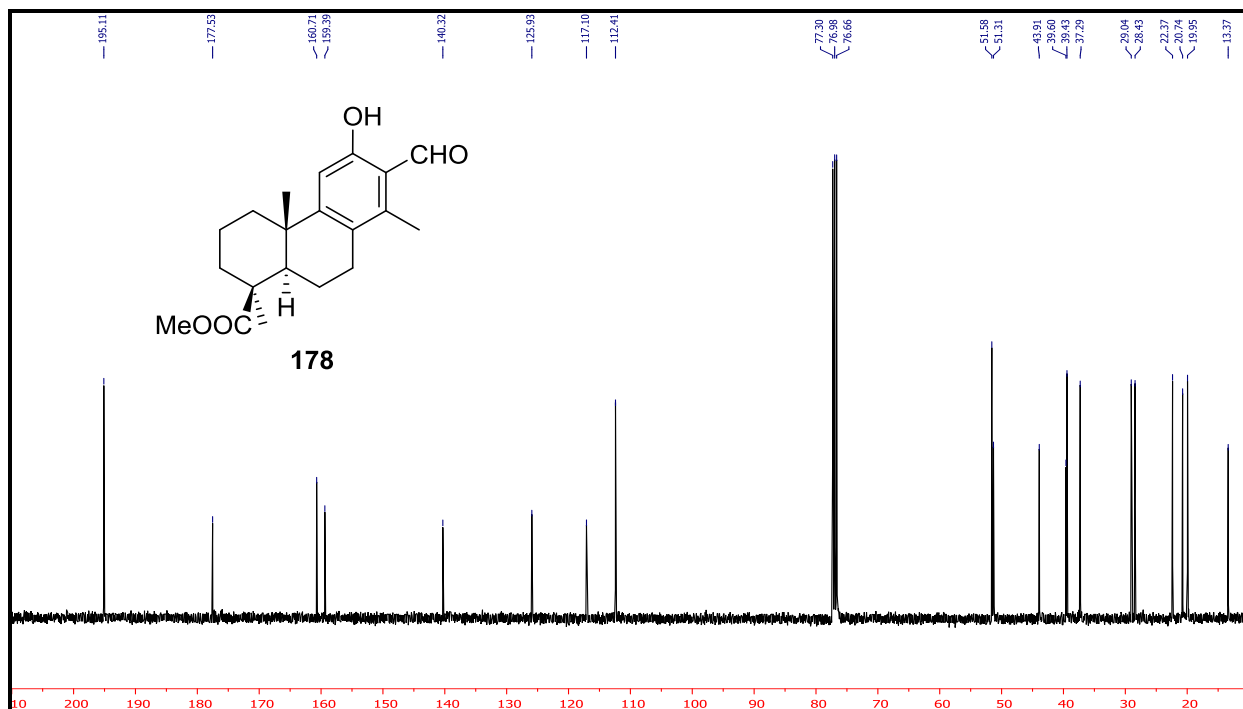
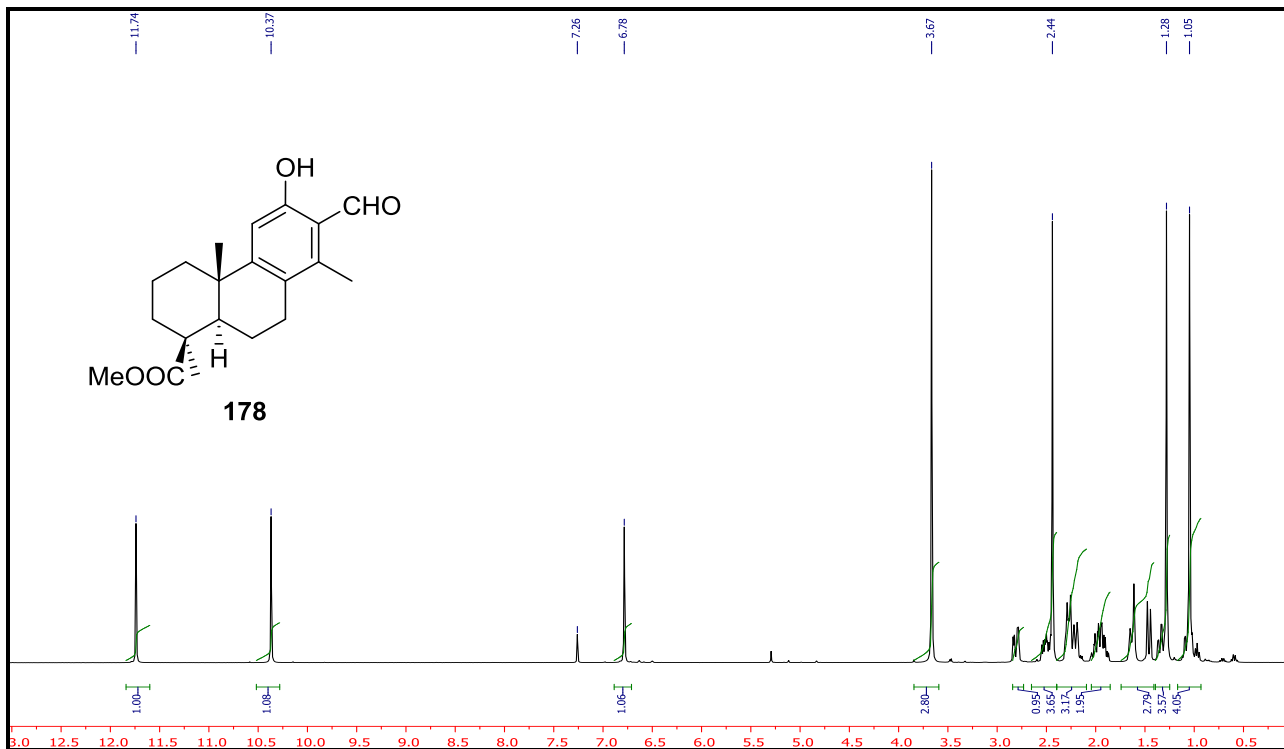


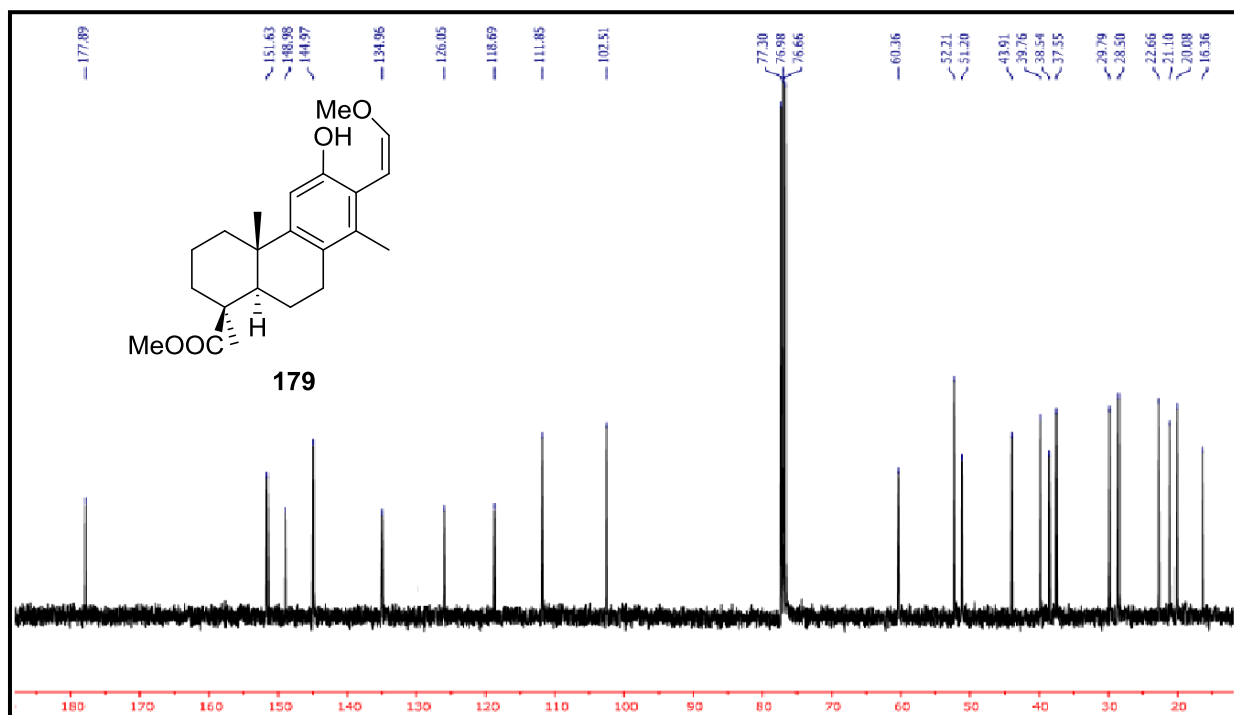
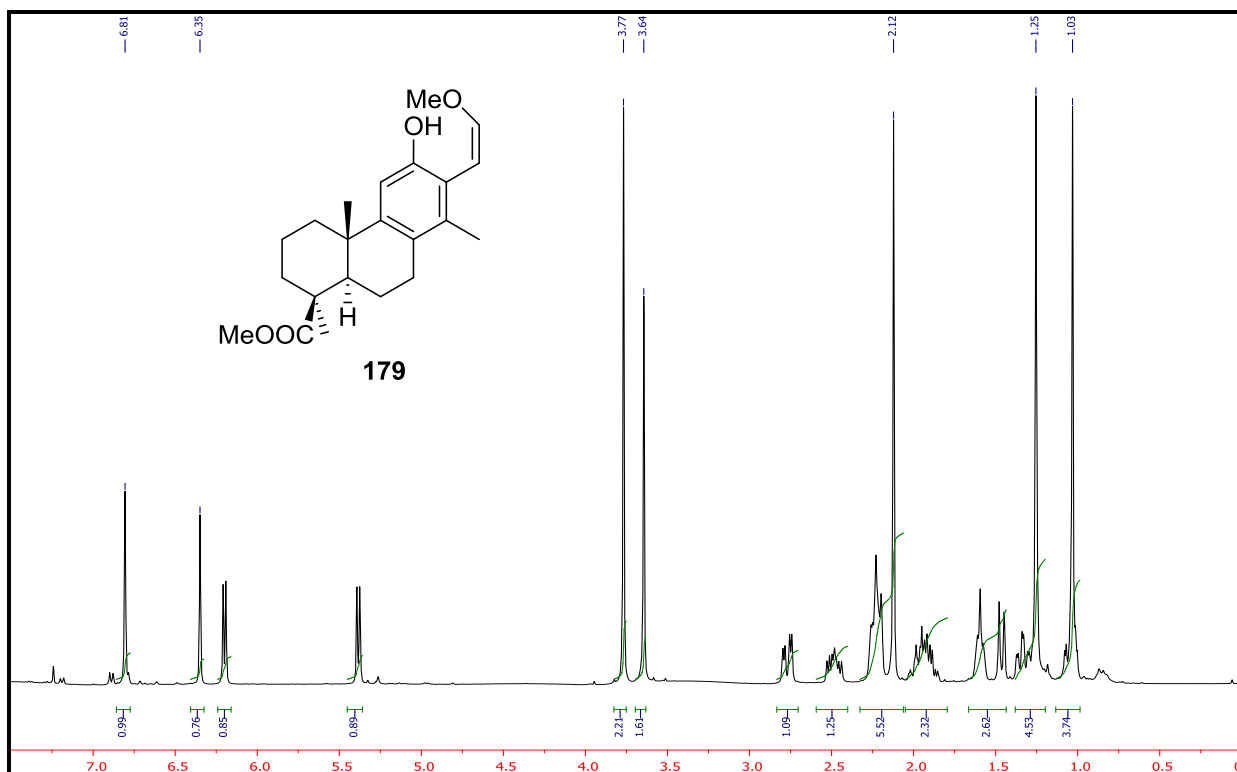


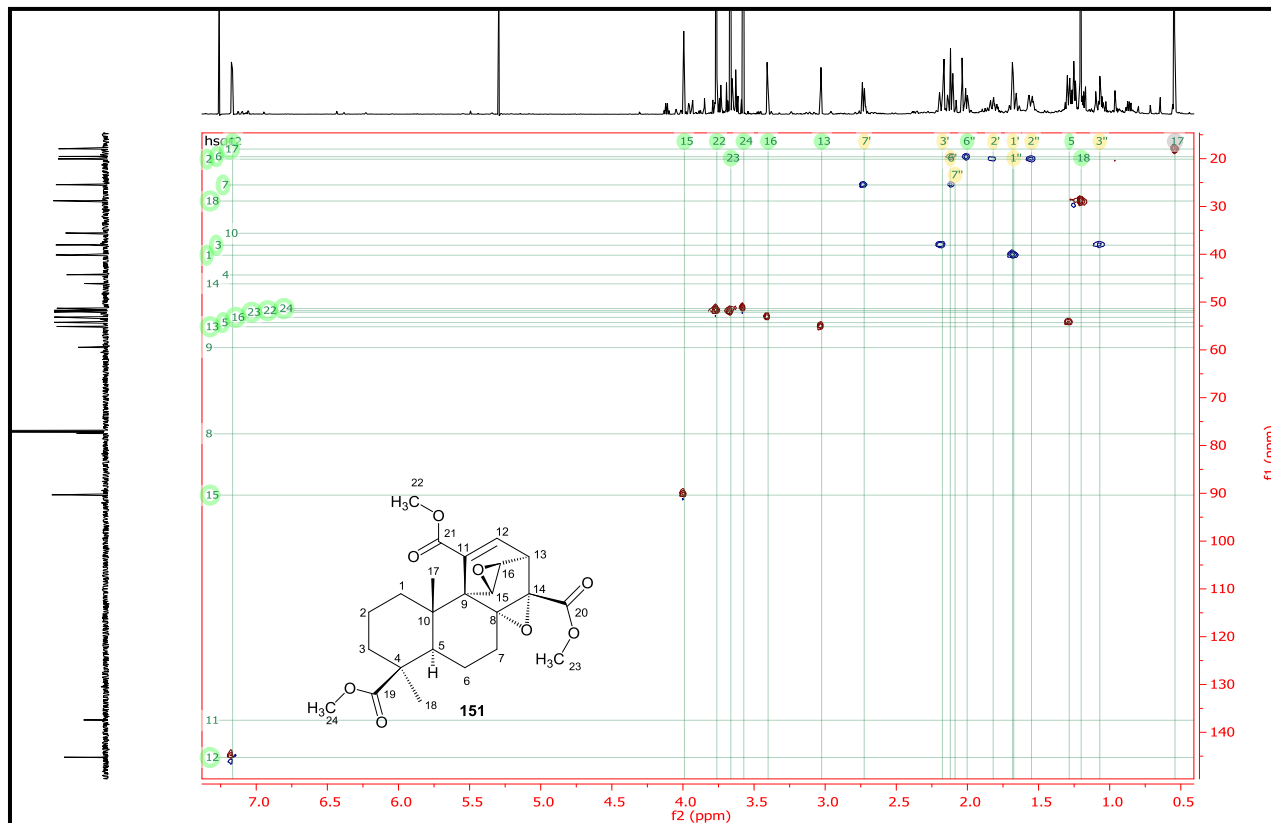




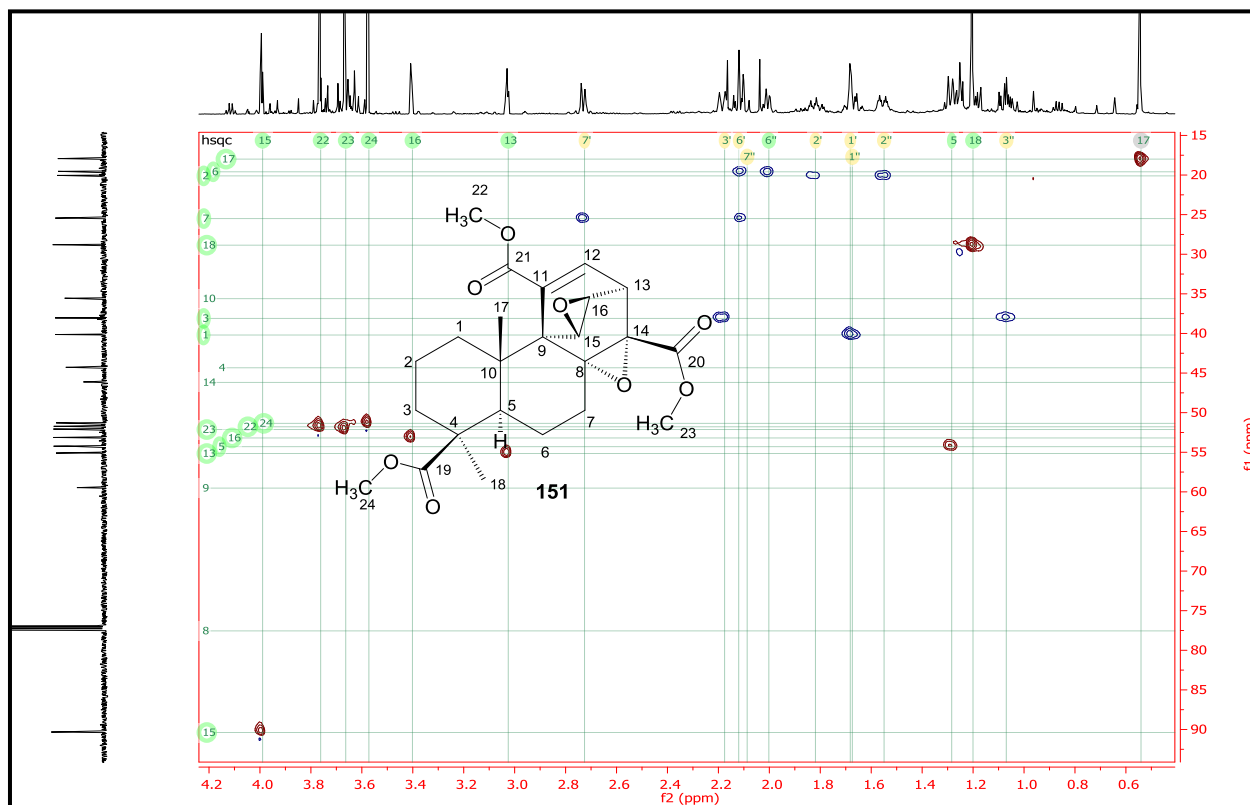




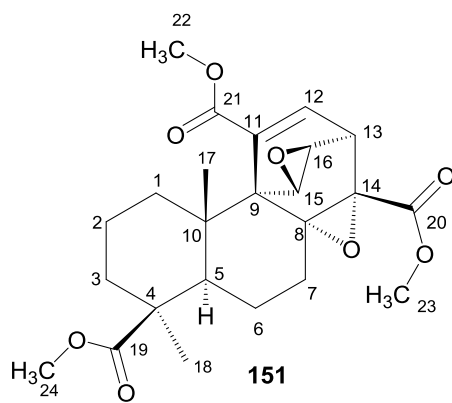


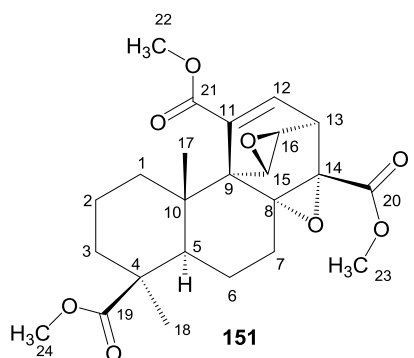
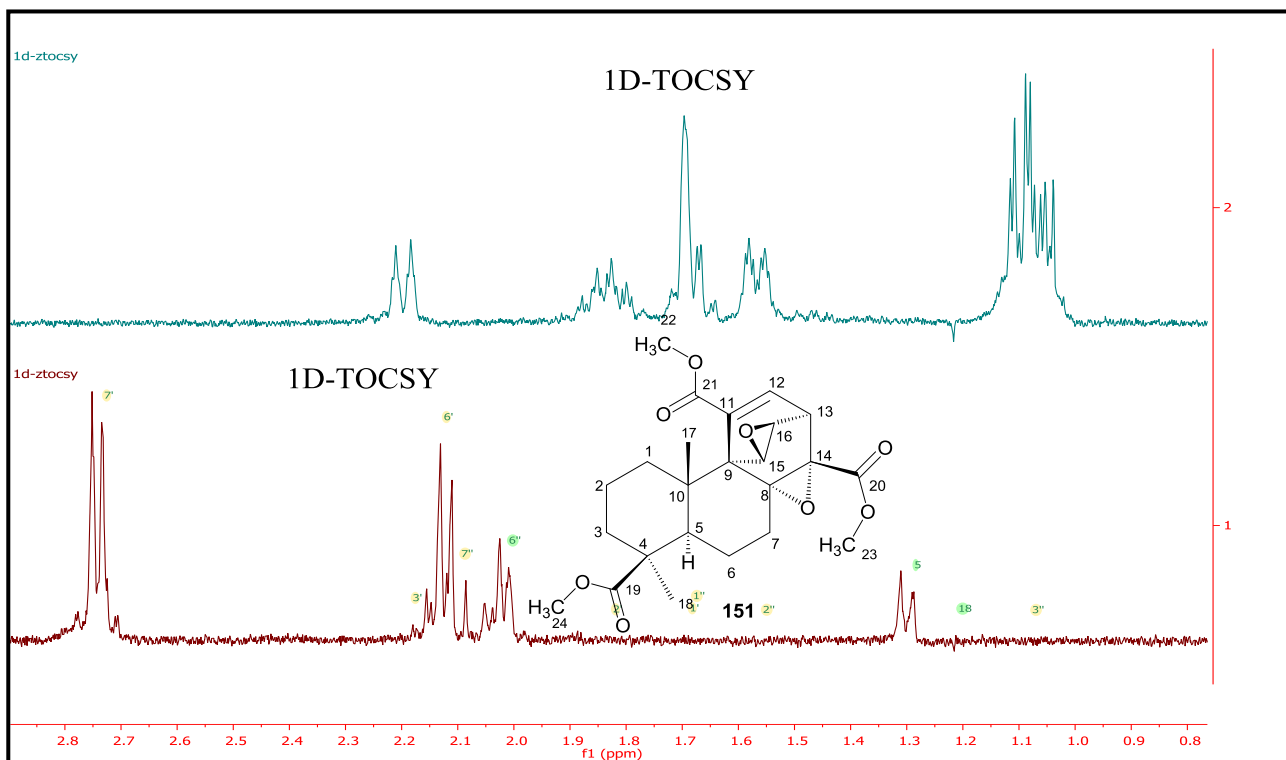
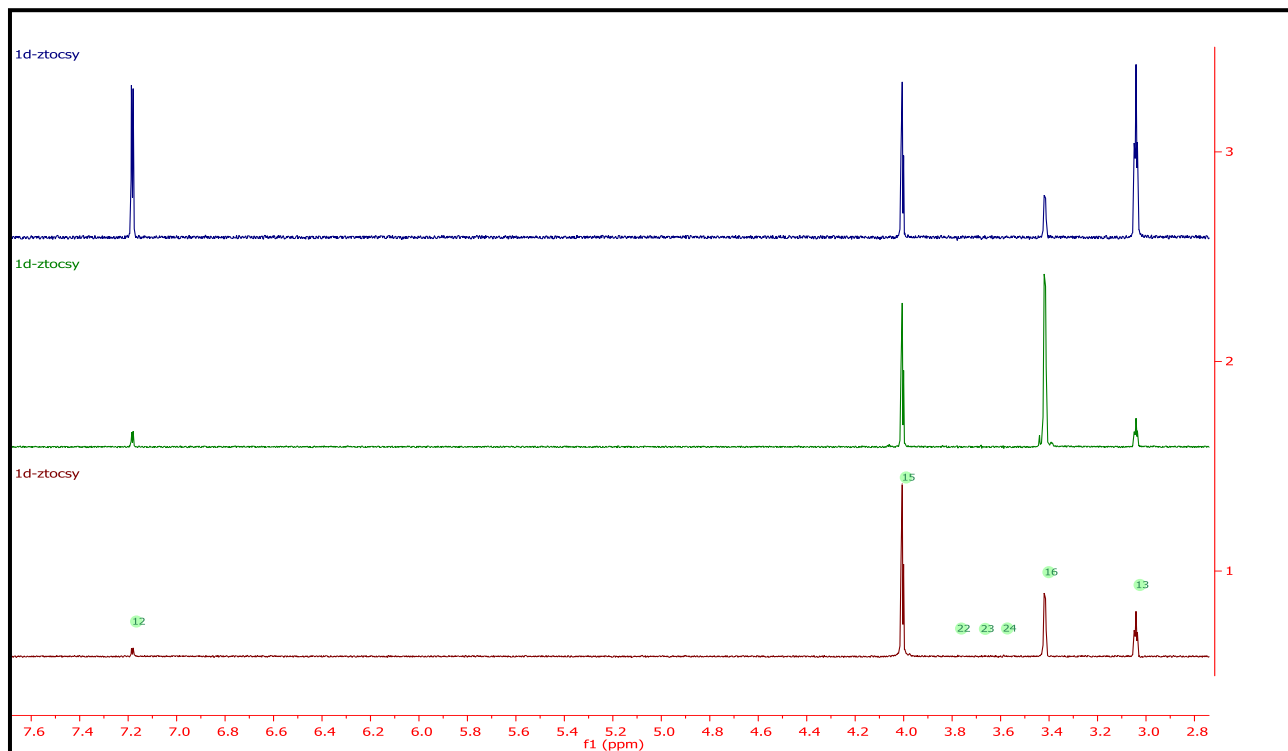


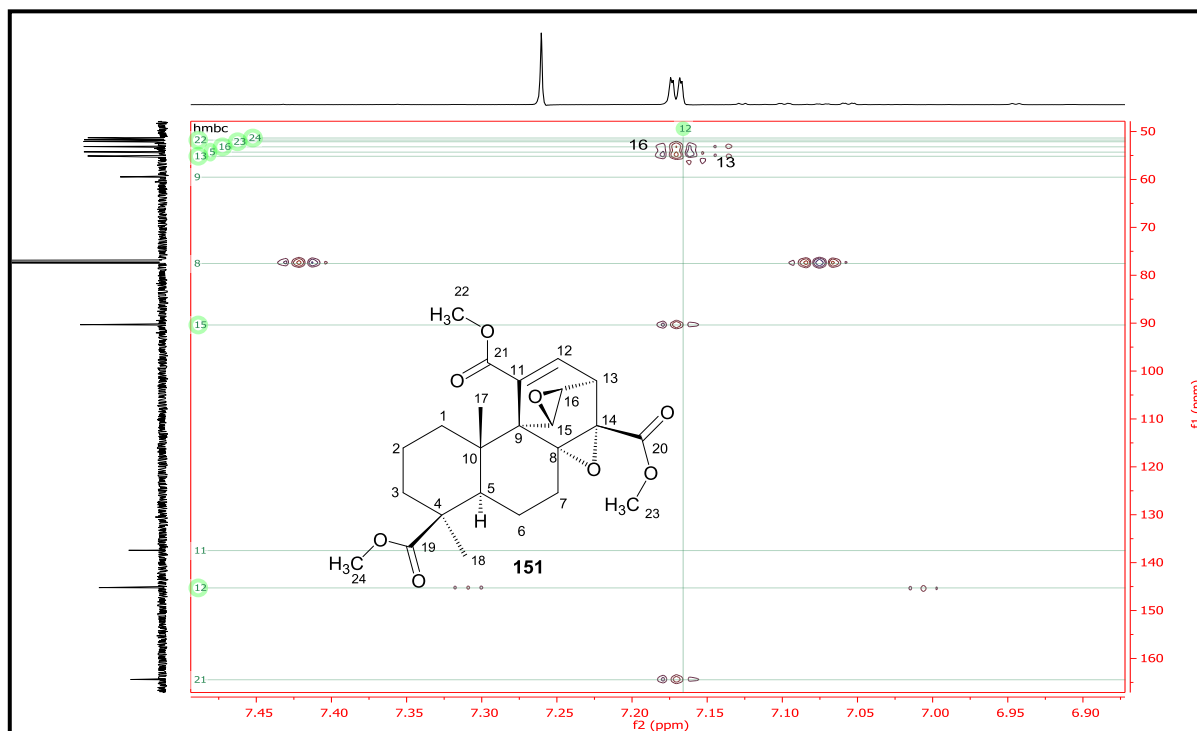
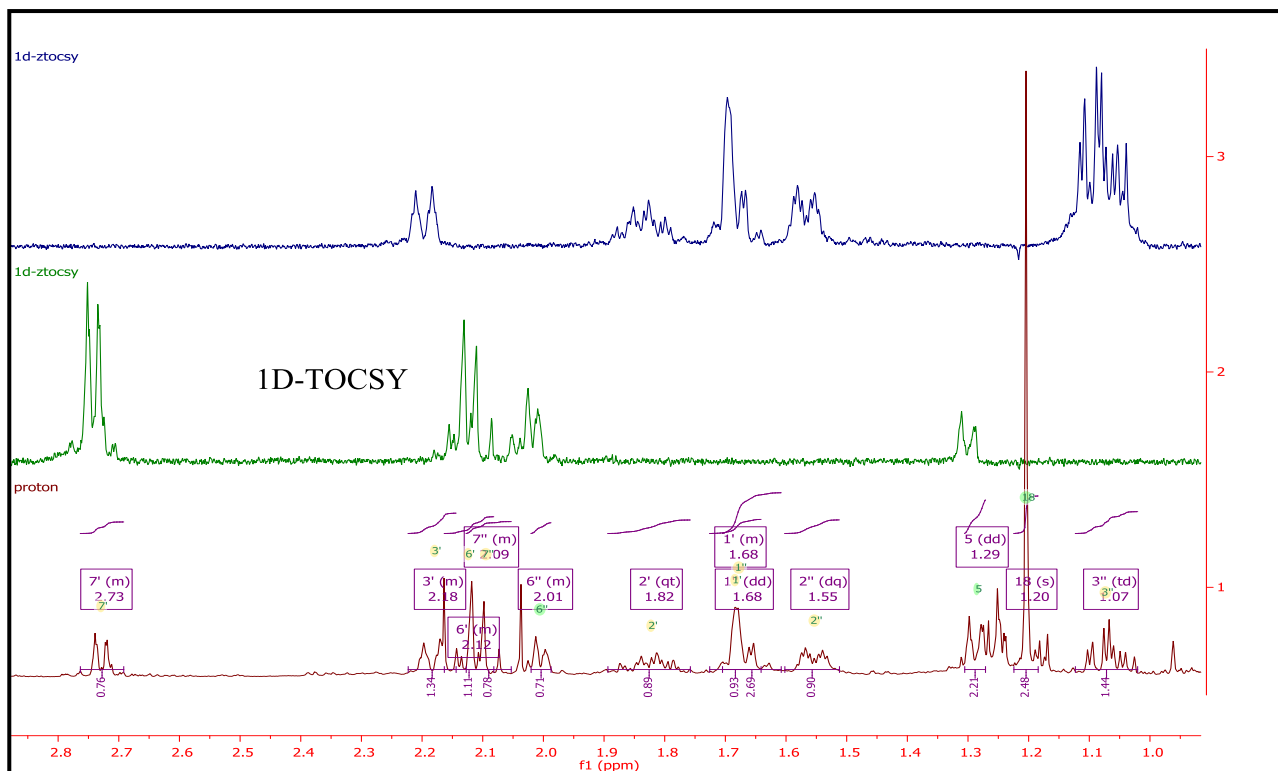
HSQC



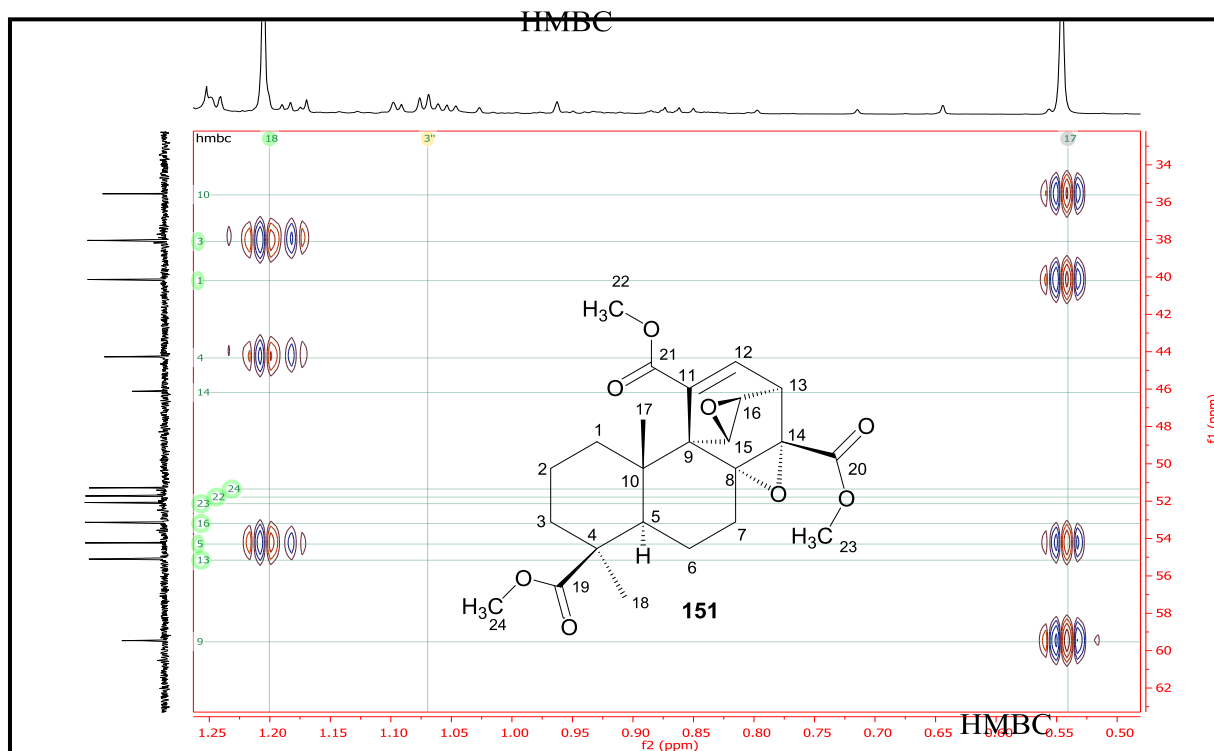
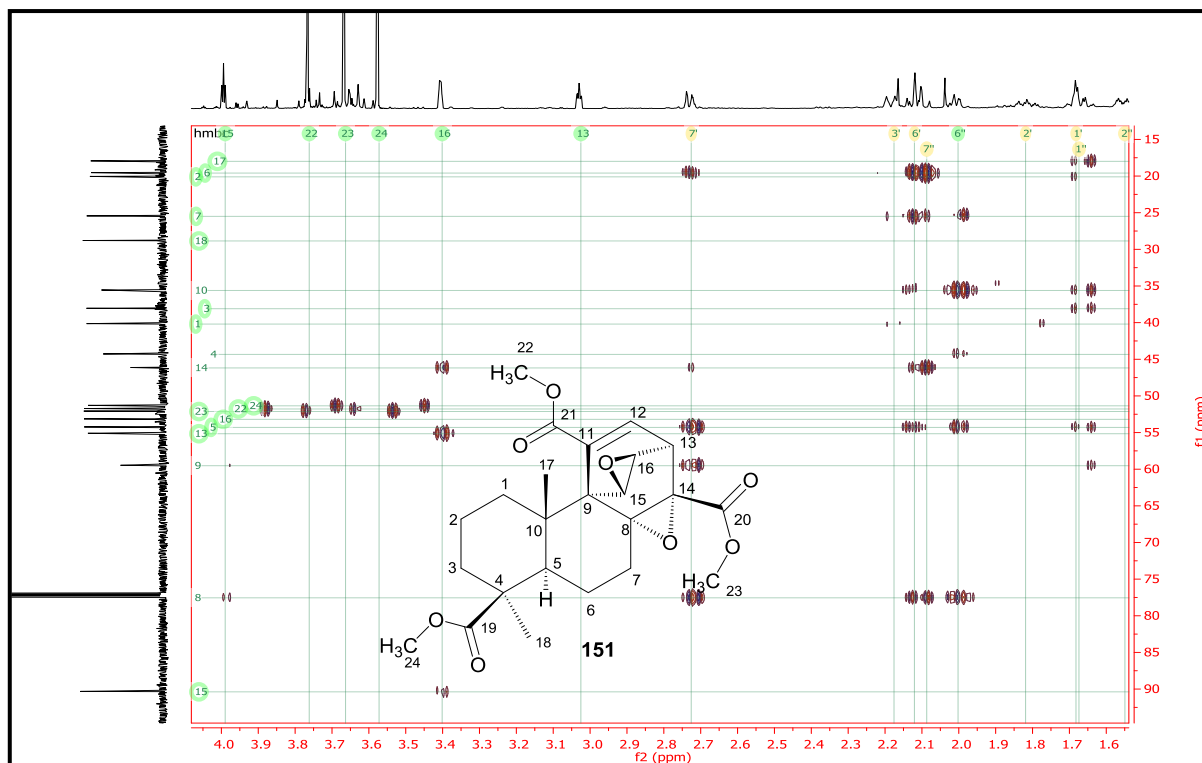
HSQC

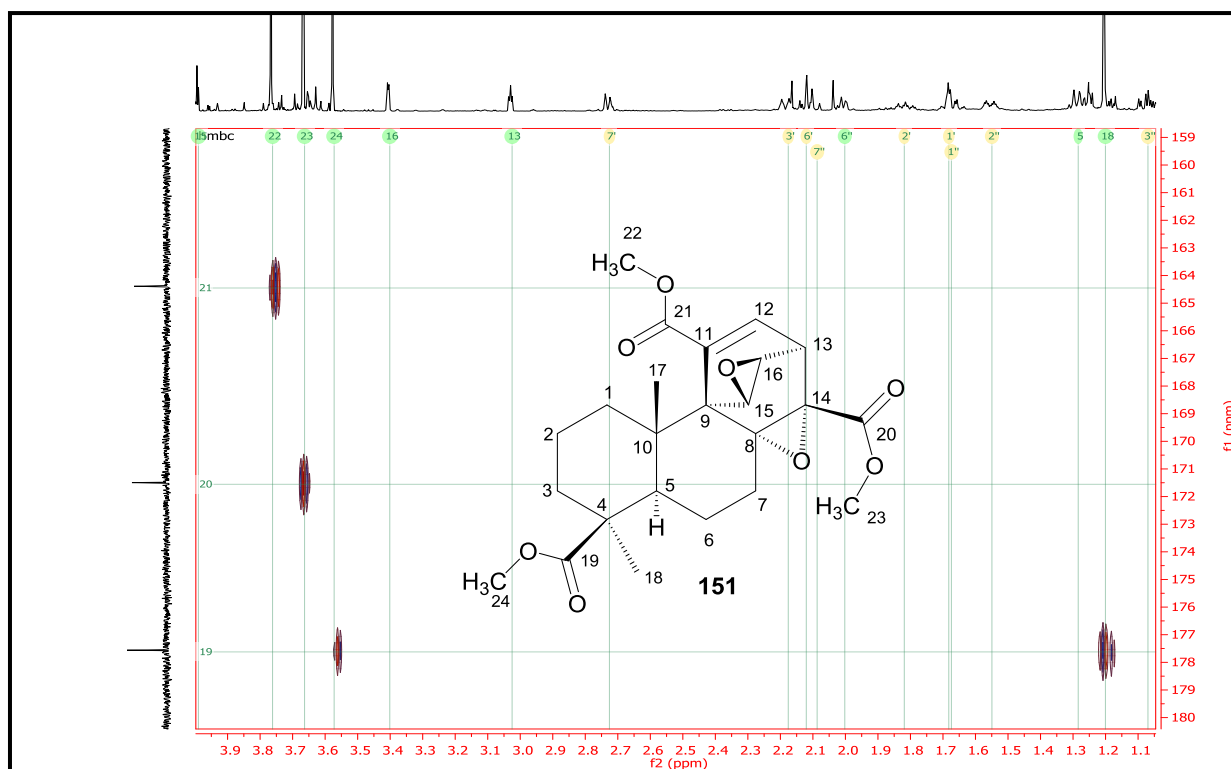




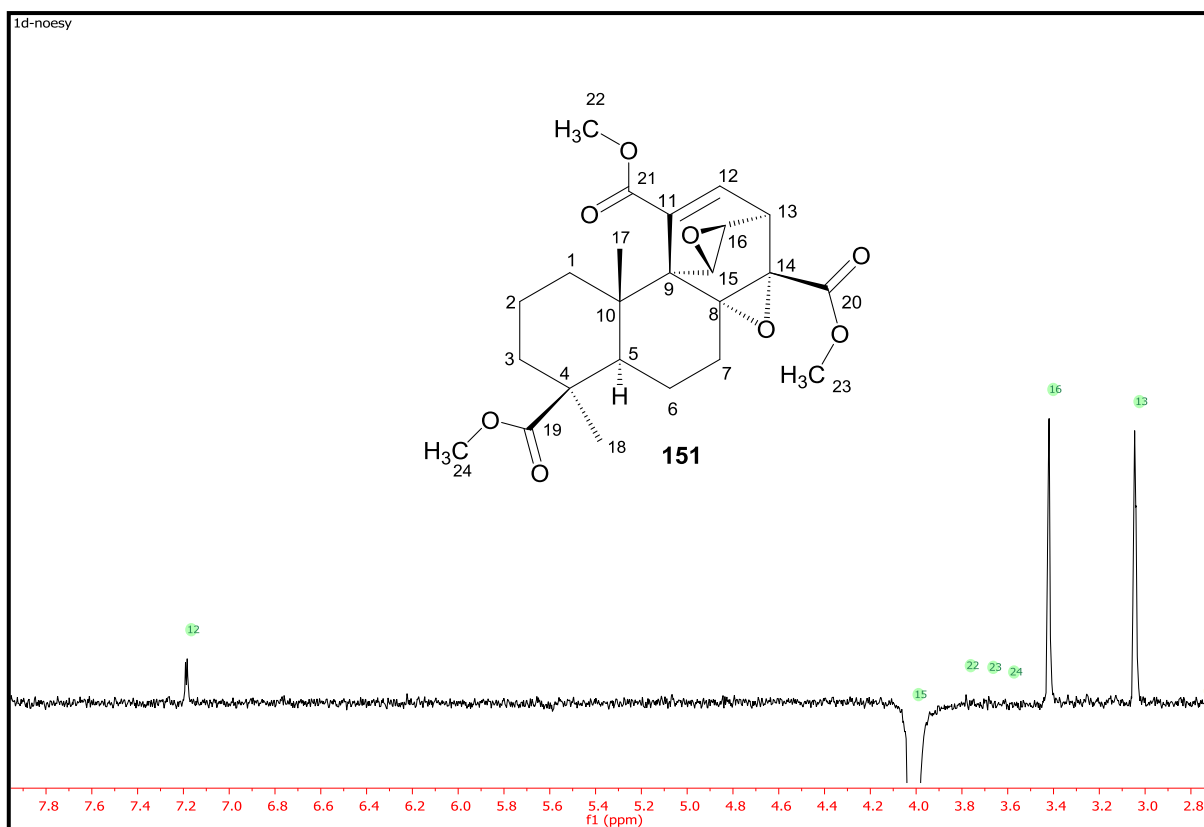
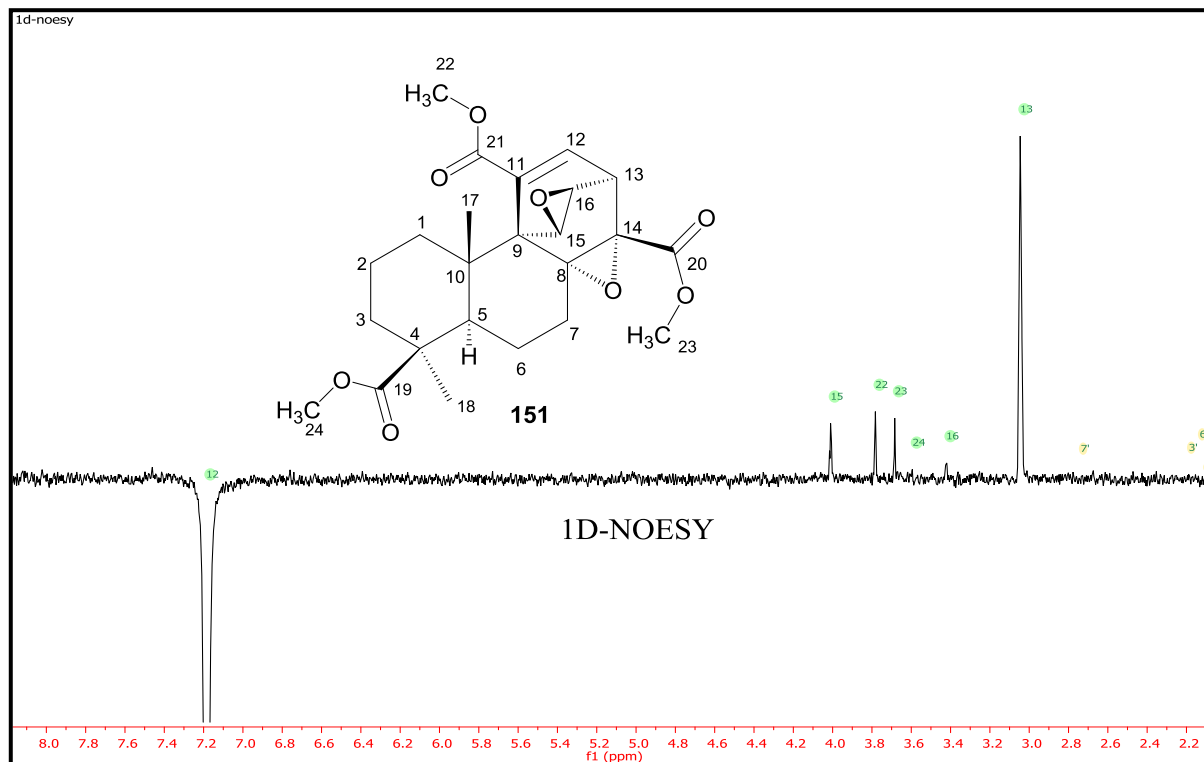


HMBC

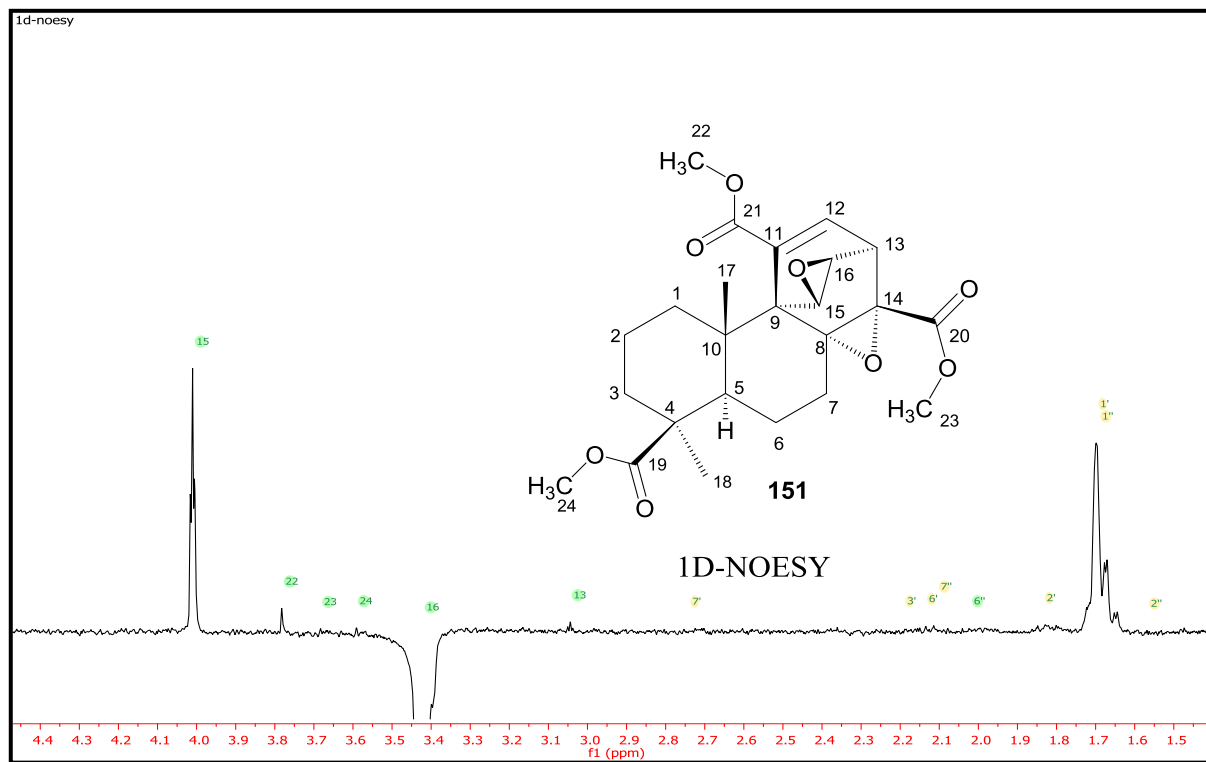


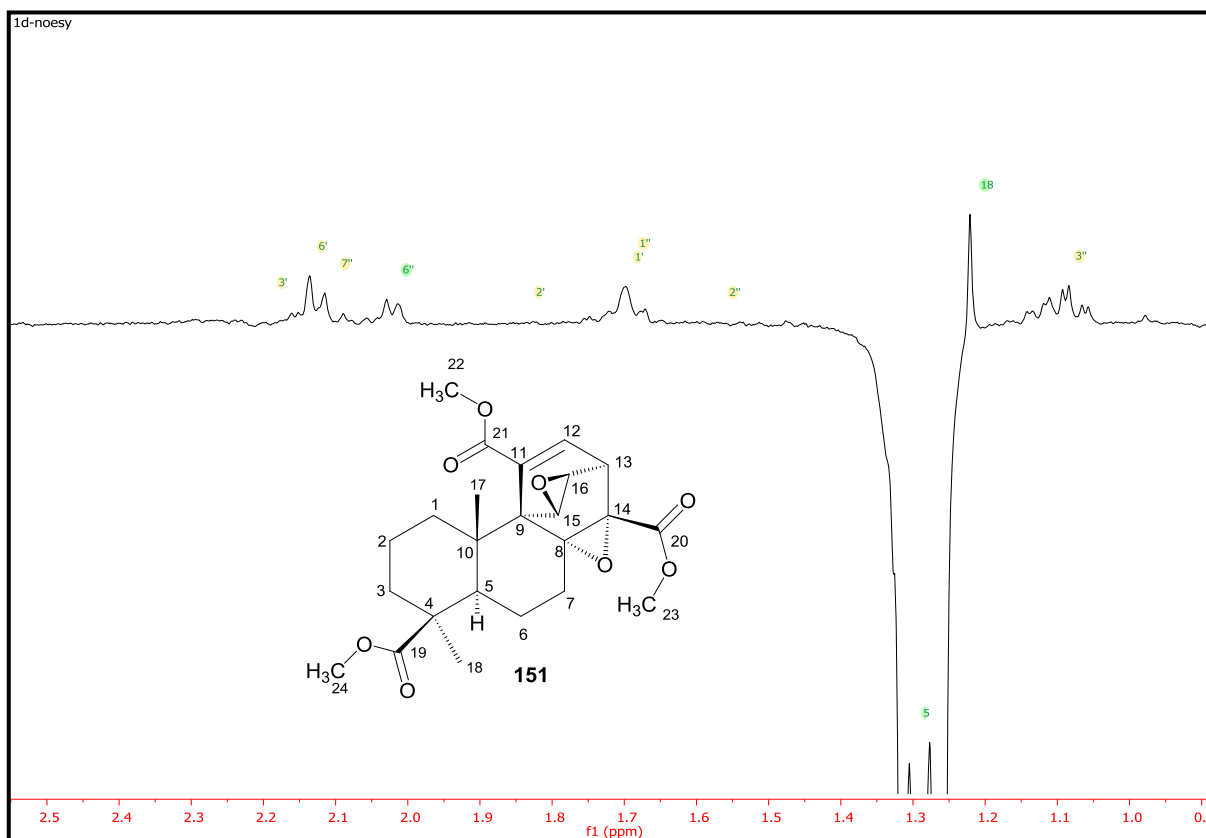
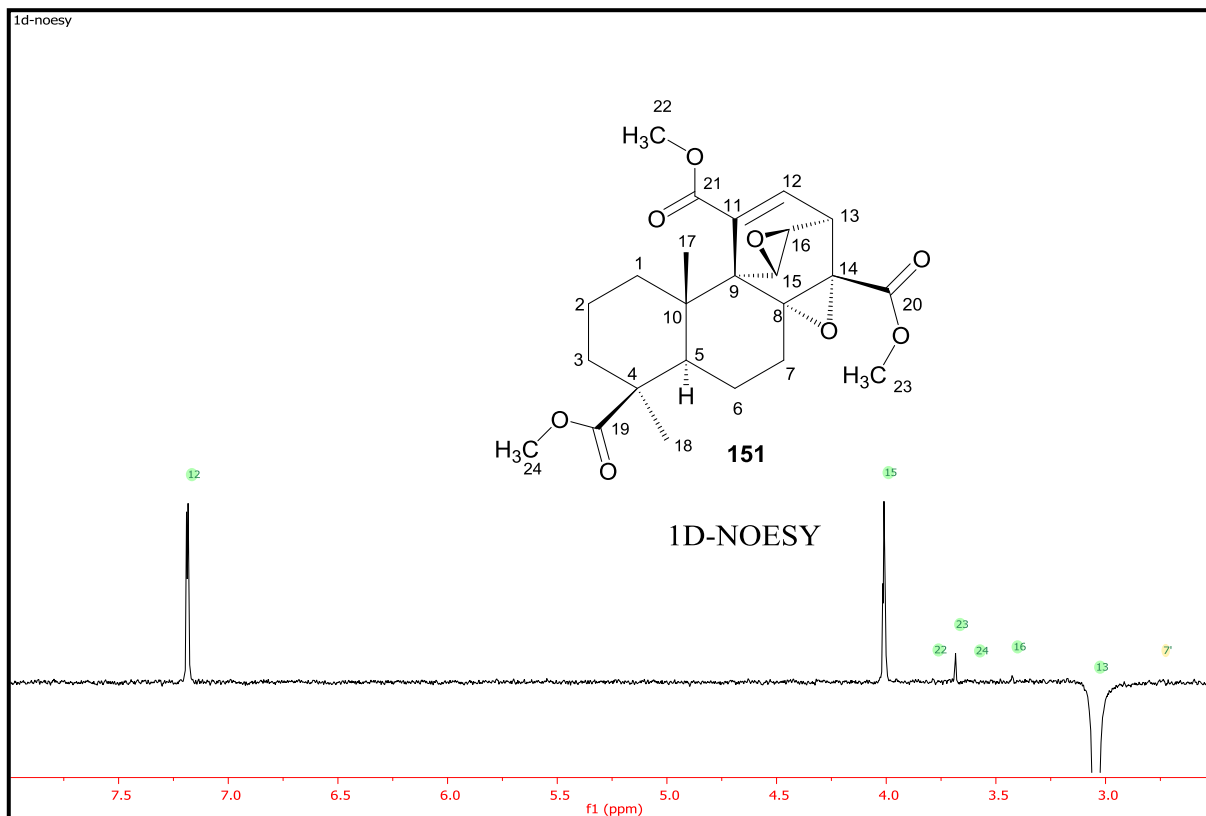


HMBC

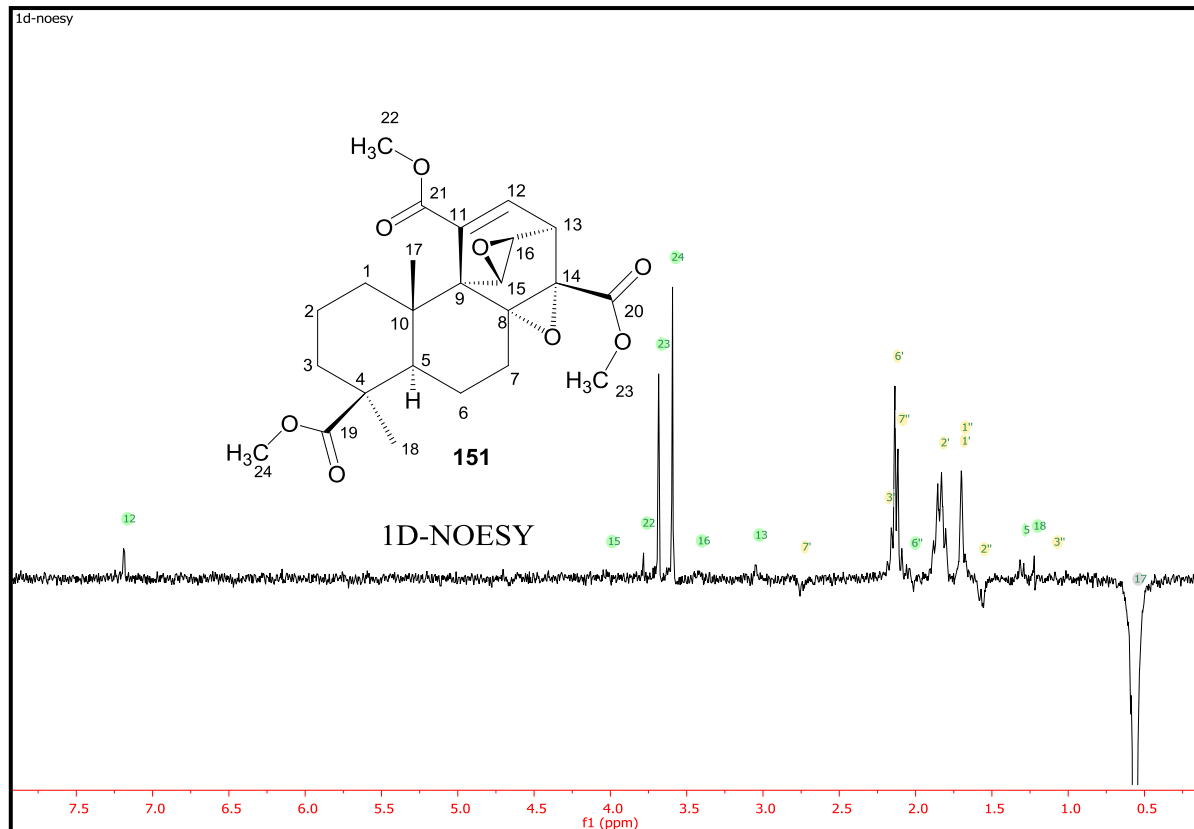
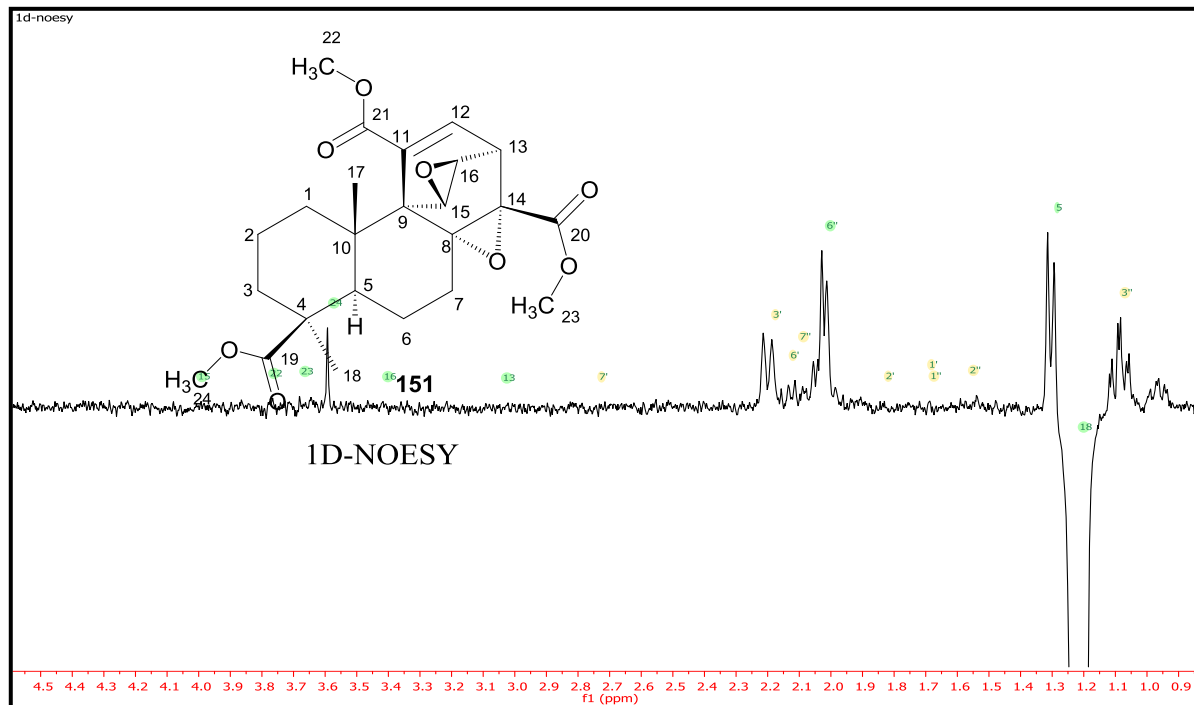


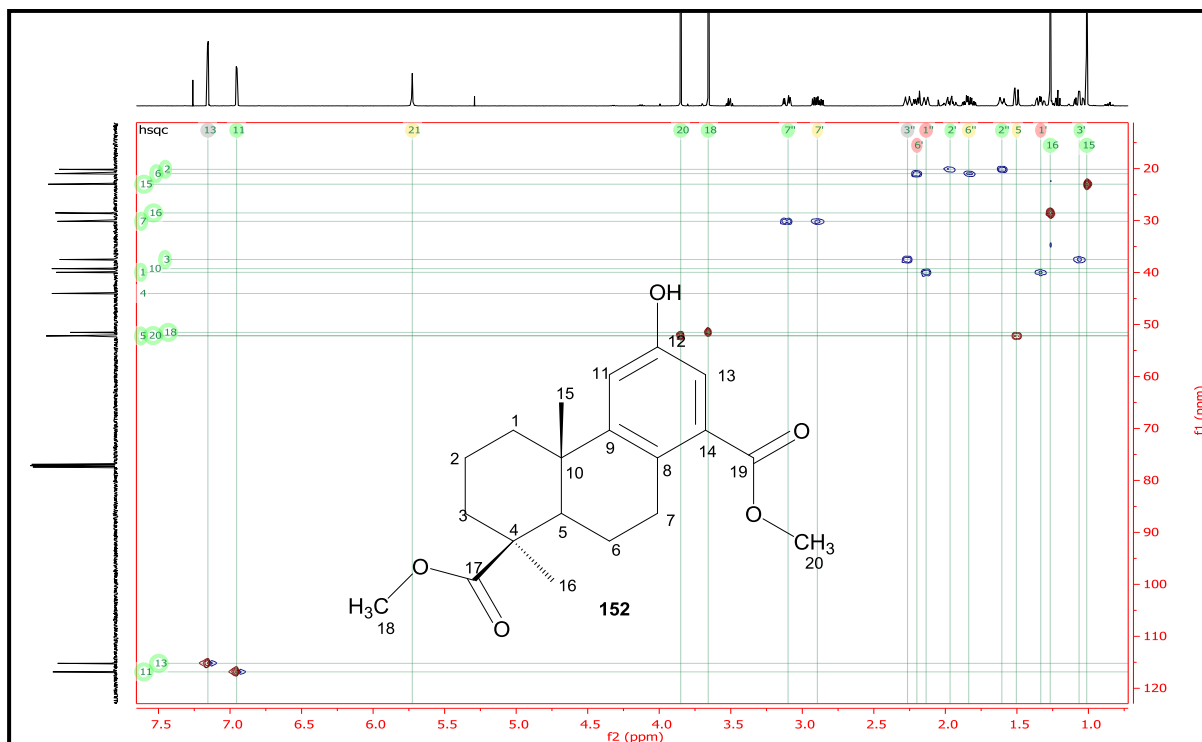
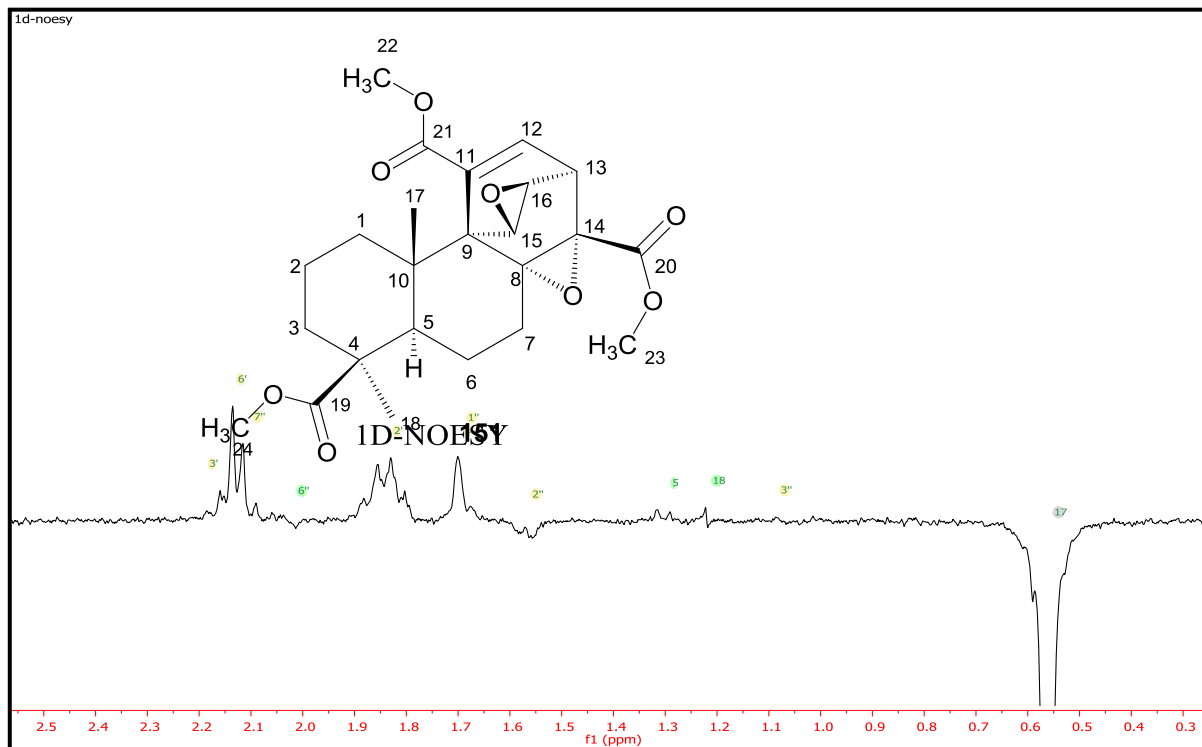
1D-NOESY

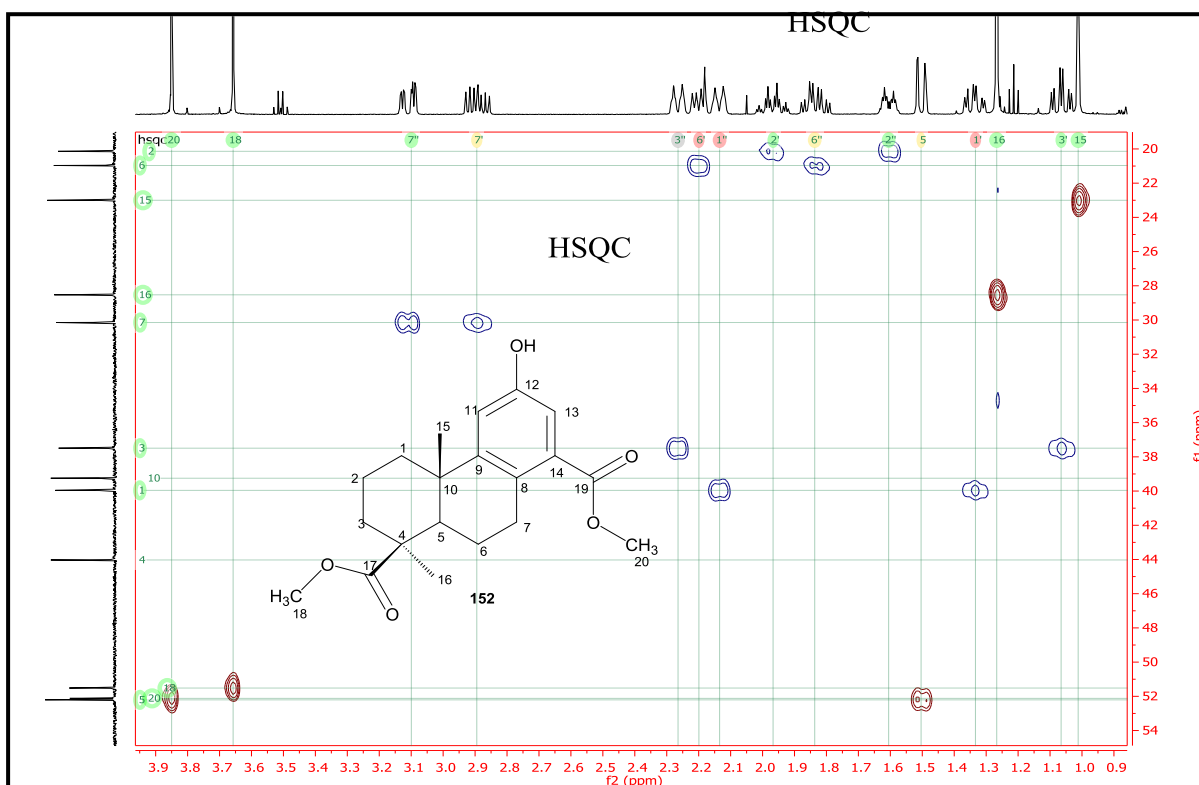
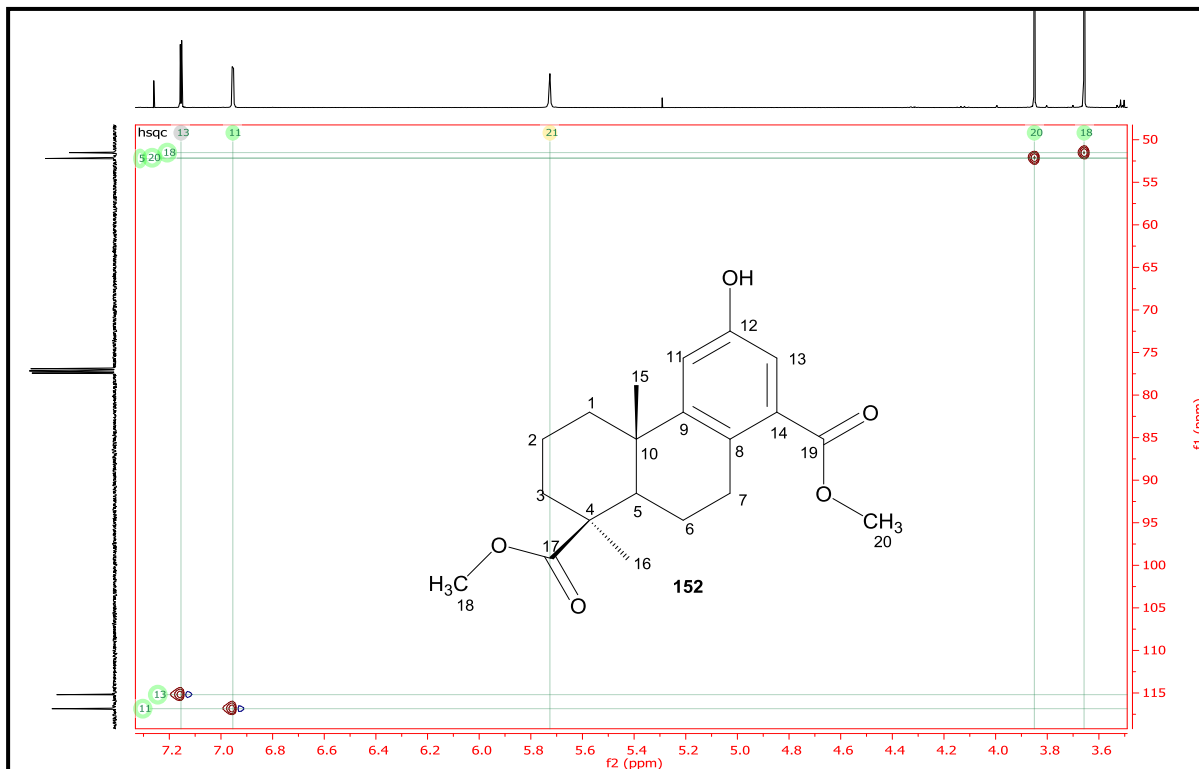


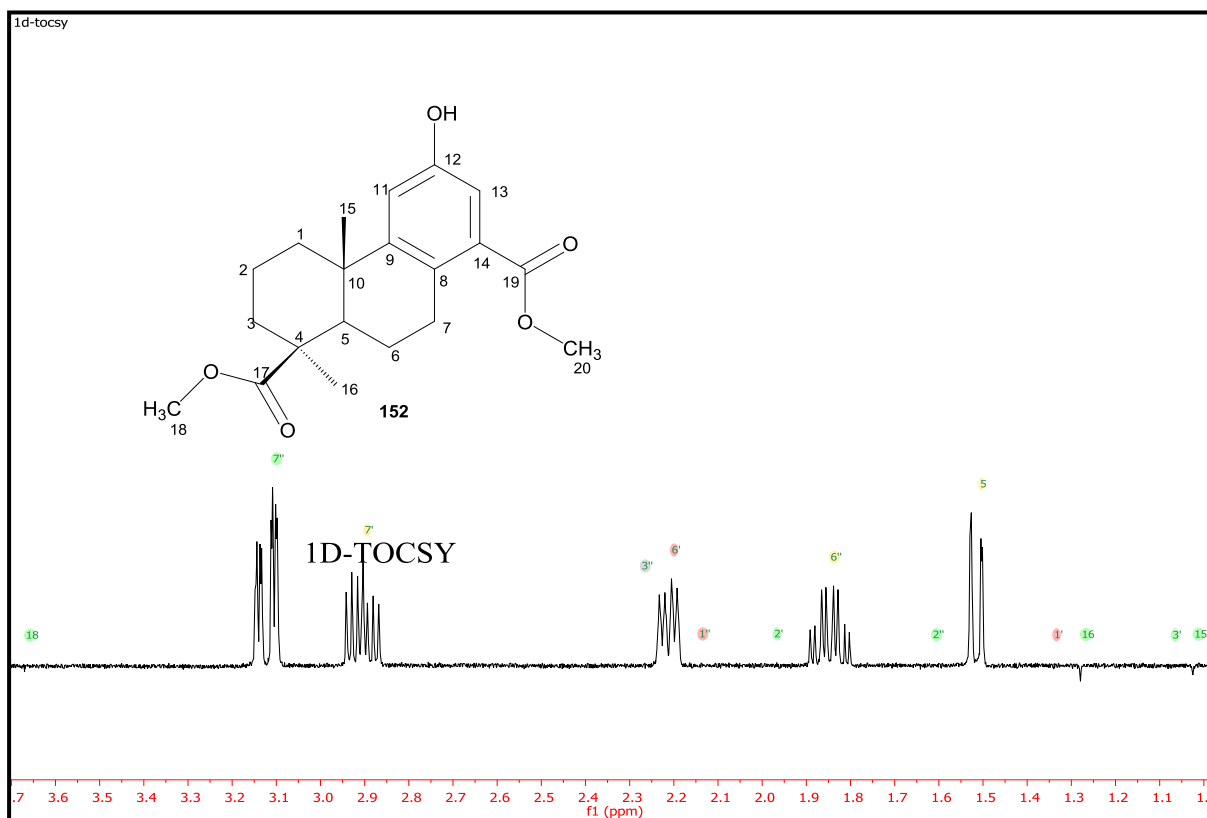
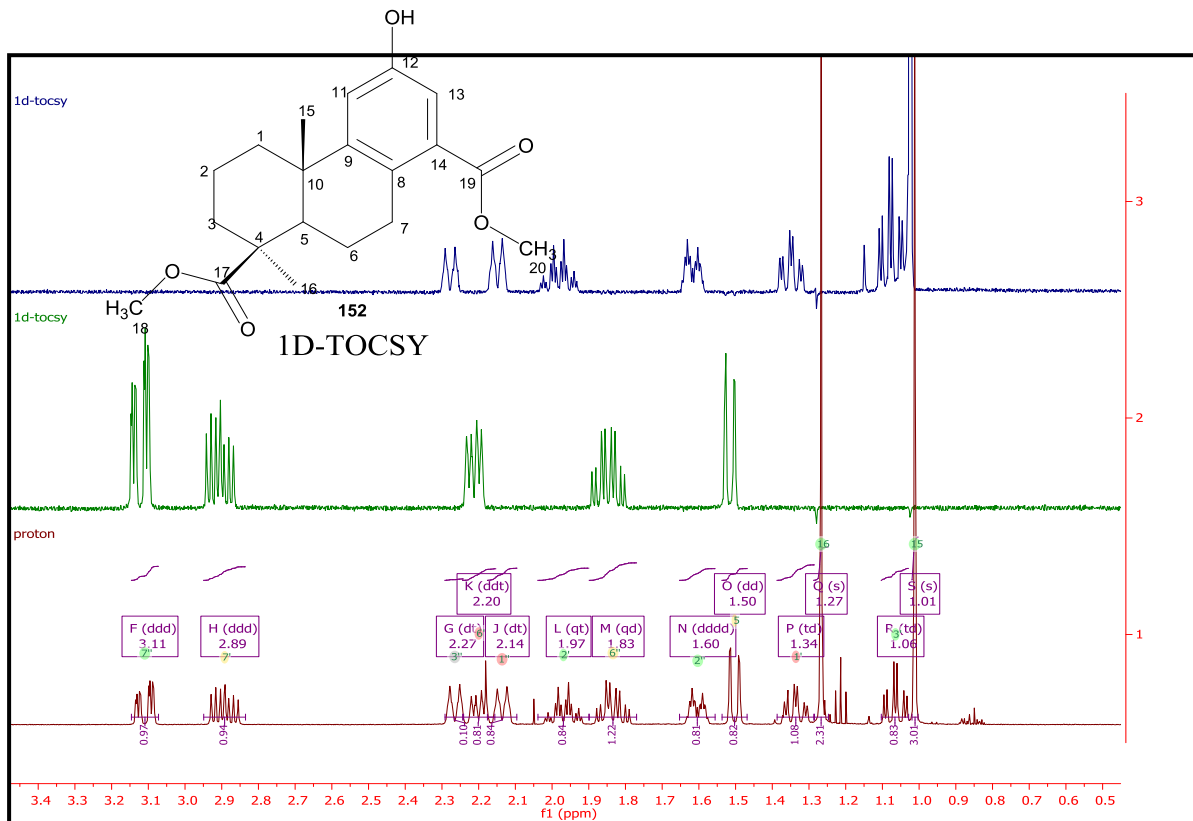


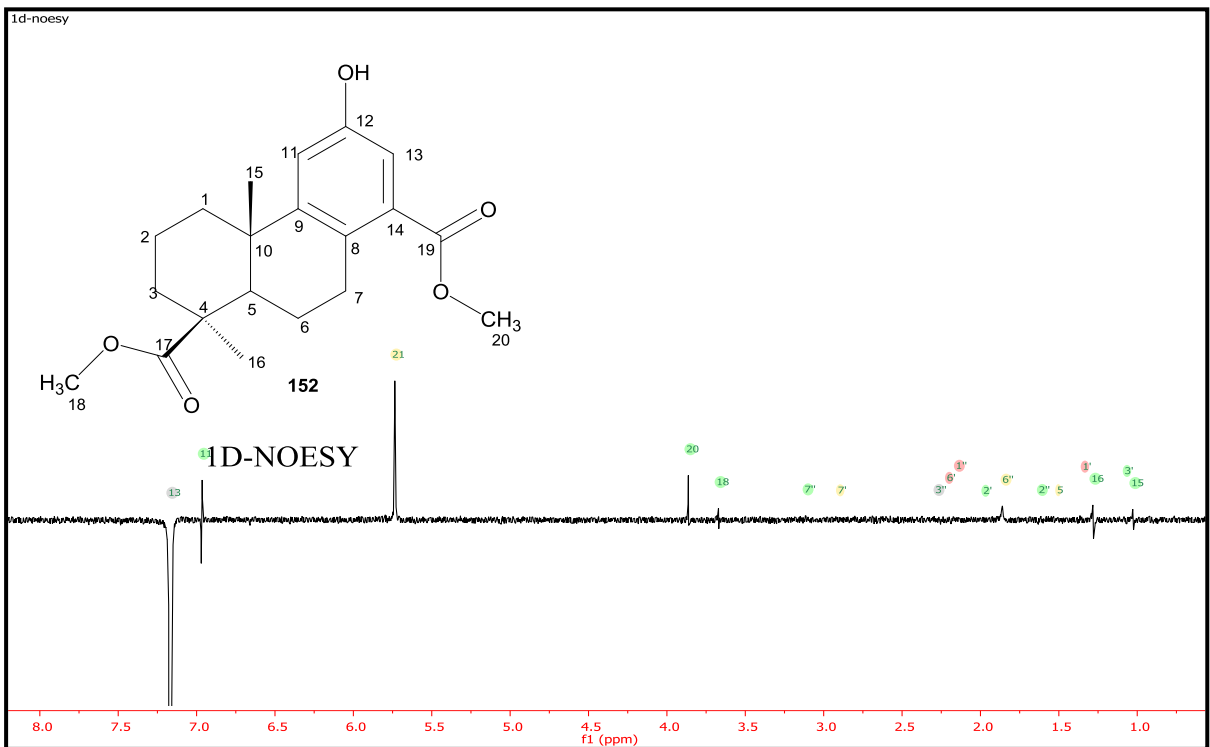
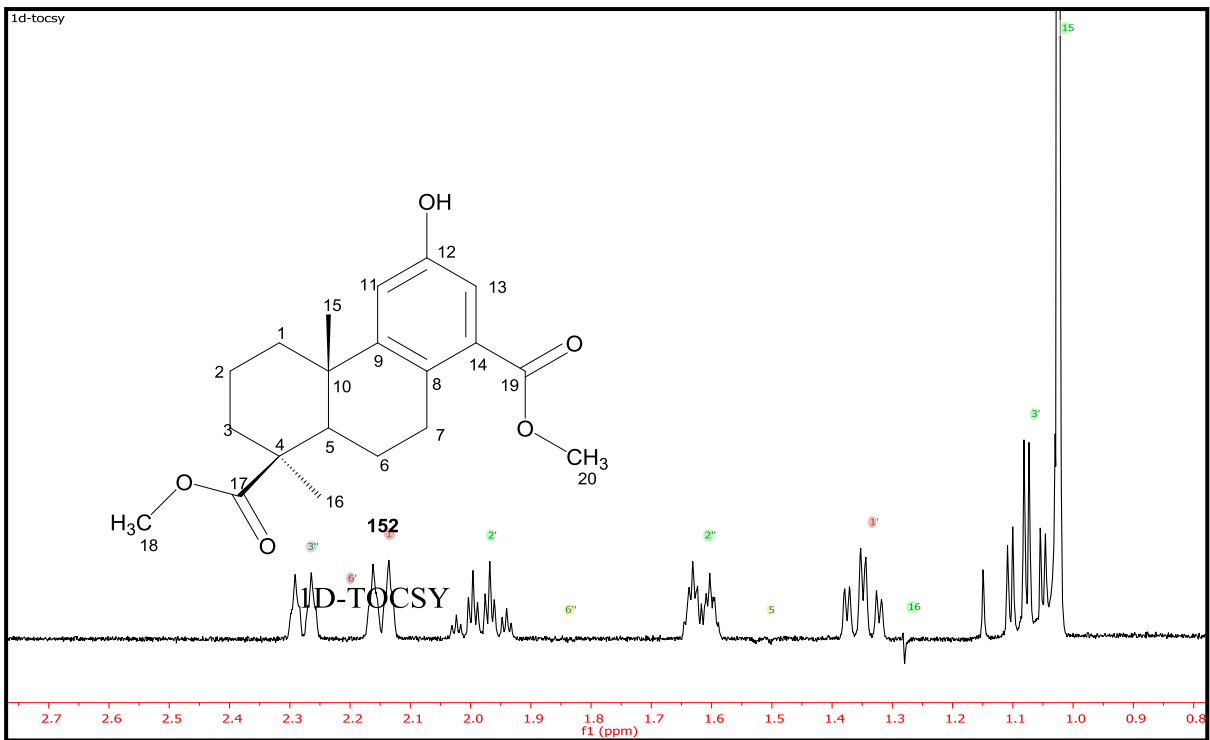
1D-NOESY

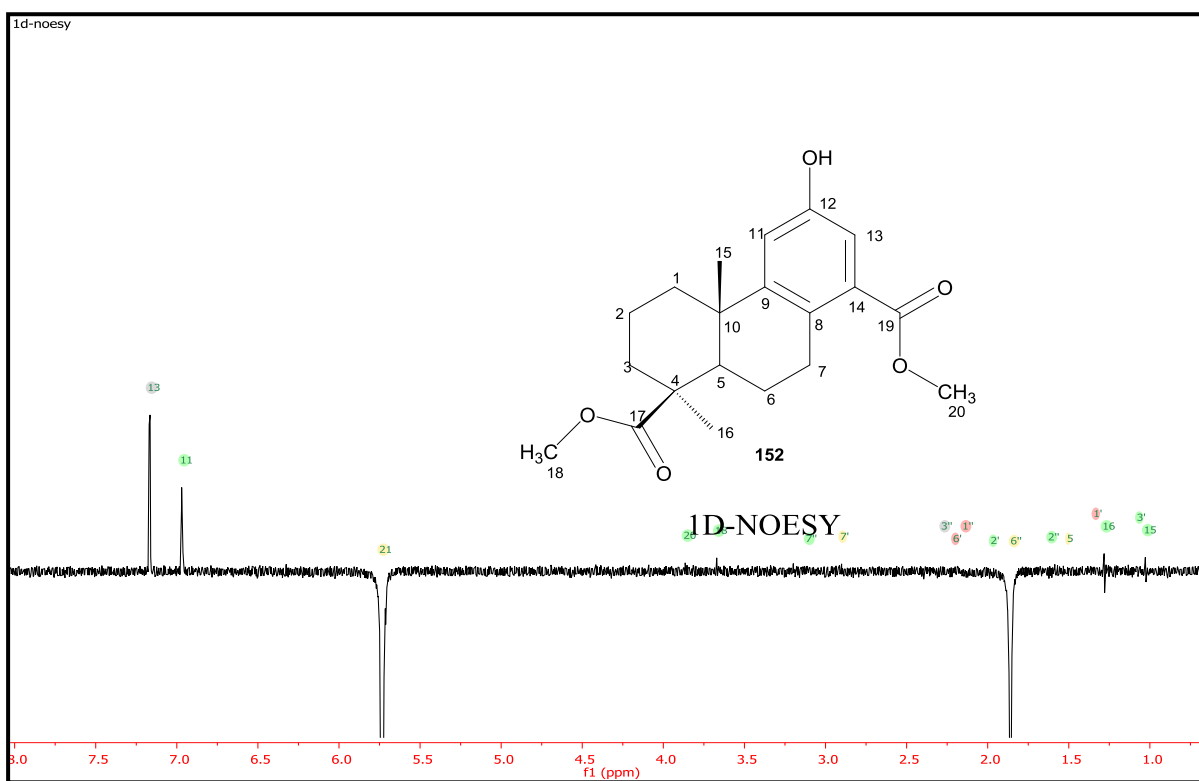
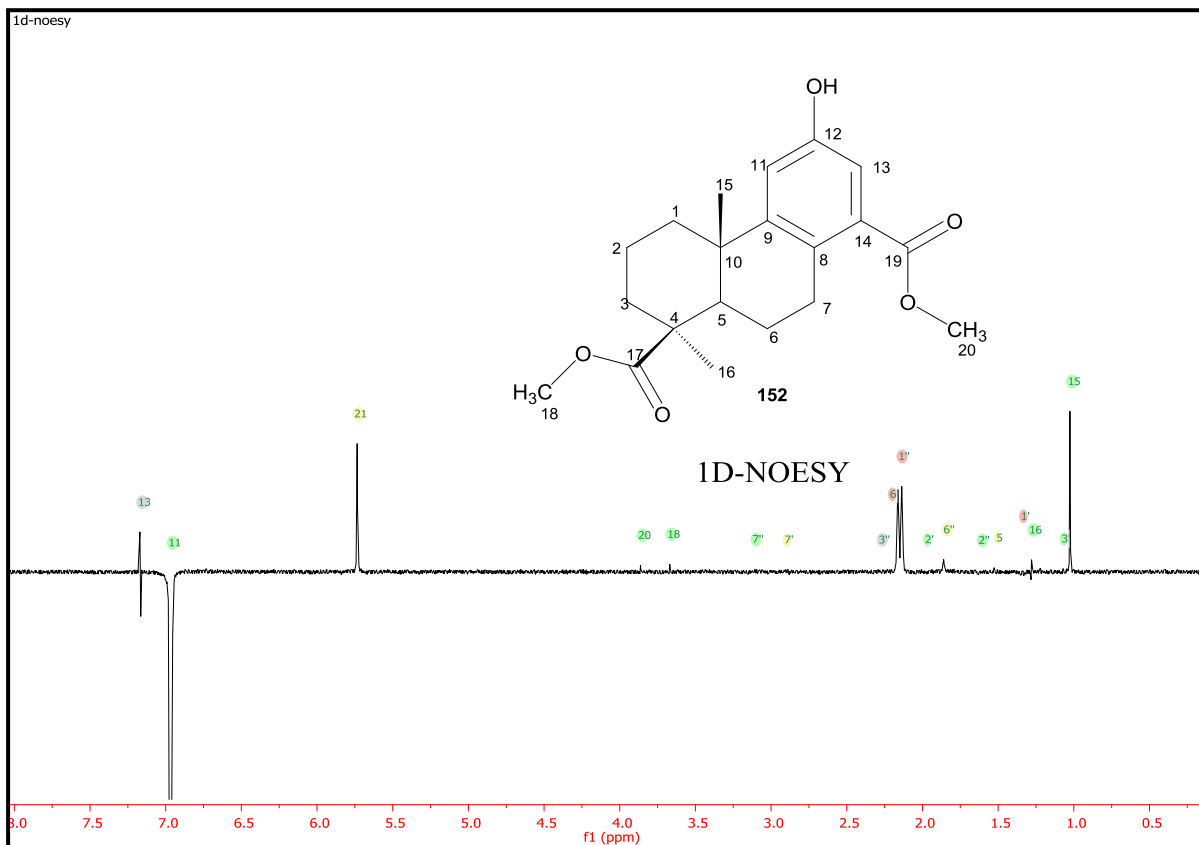


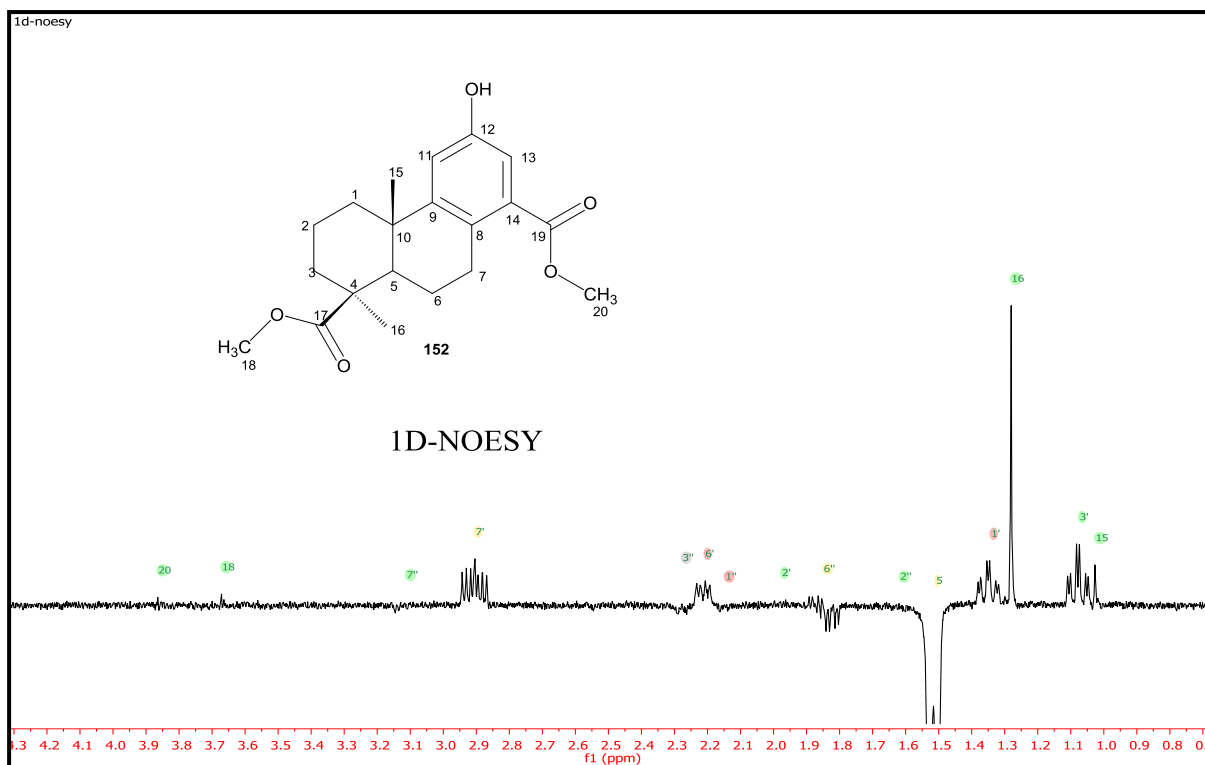
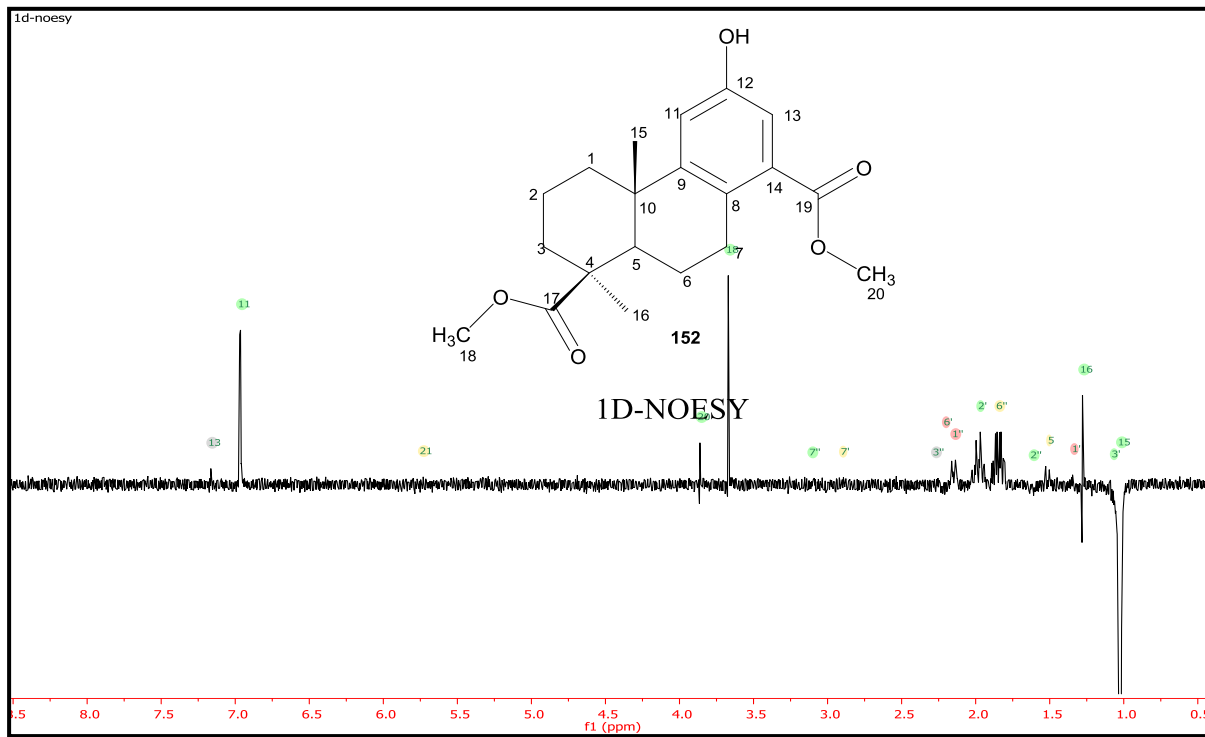


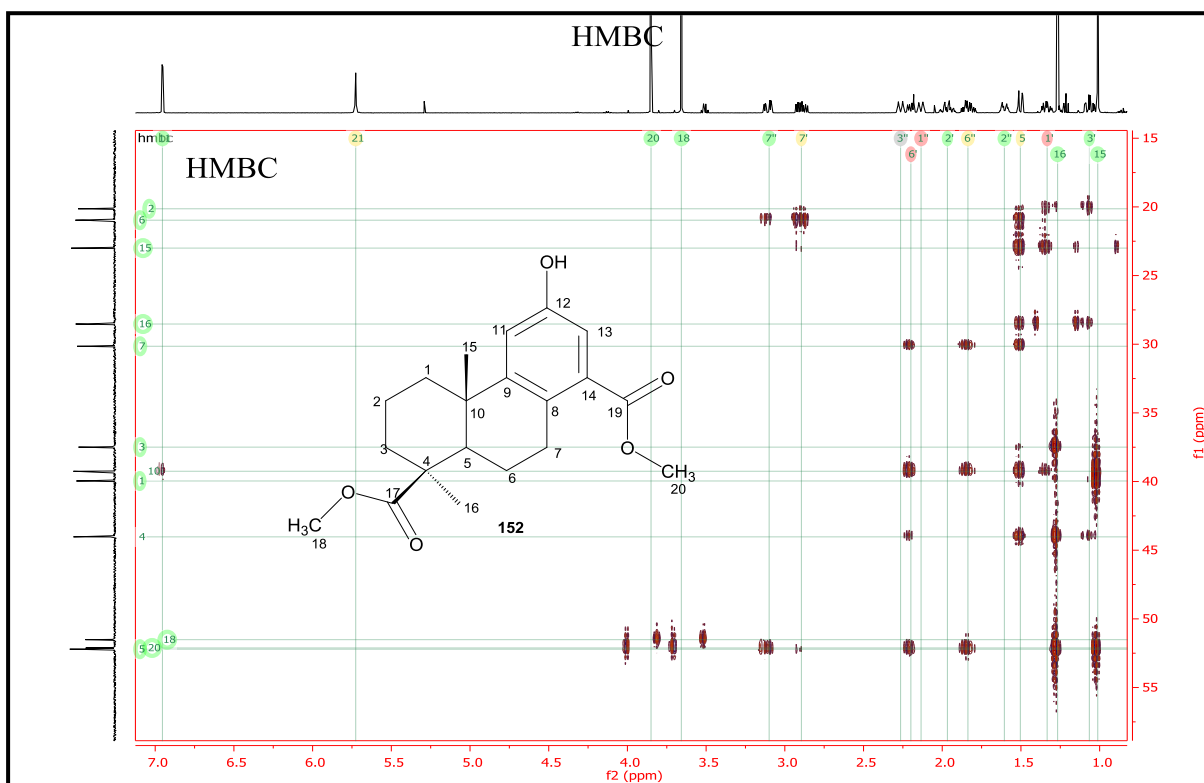
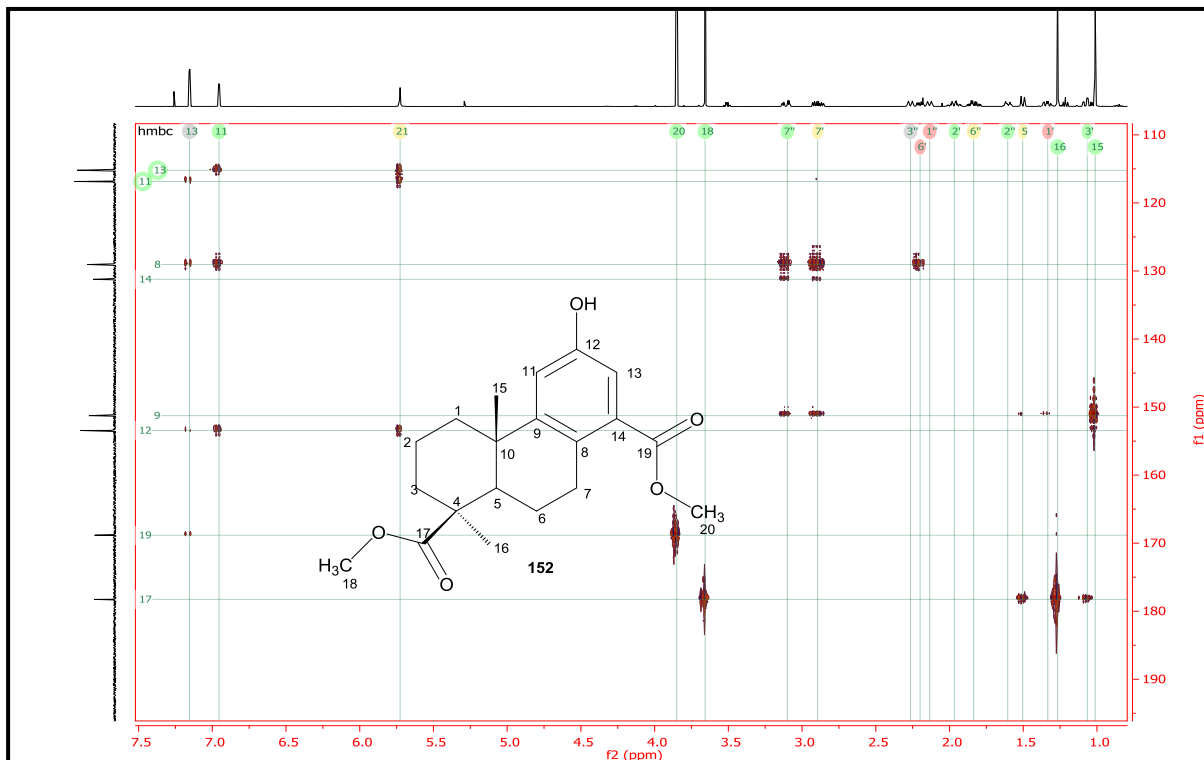






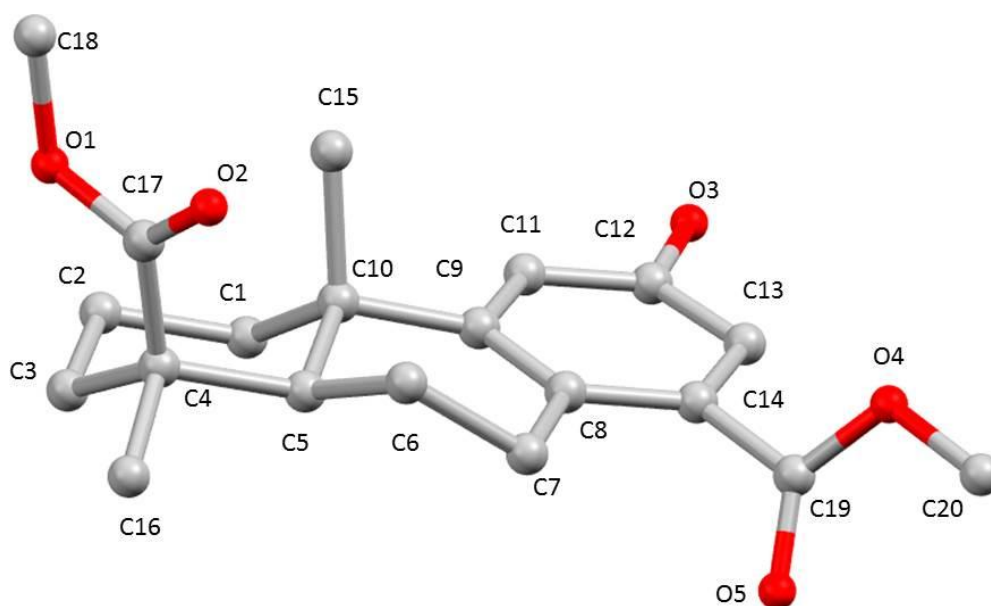






X-Ray Crystallographic Data

X-Ray crystal structure of compound **152** (CCDC 1510683)



Mercury perspective of compound **152**. Hydrogen atoms have been omitted for clarity.

Crystallographic Table

Prismatic white crystals of compound **152** suitable for X-ray experiments were obtained. In all cases a crystal was resin epoxy coated and mounted on a on a Bruker D8 Venture with Photon 100 detector equipped with graphite monochromated CuK α radiation ($\lambda=1.5405\text{\AA}$), operating at 50kV and a temperature of 150 K. The cell parameters were determined and refined by least-squares fit of all reflections collected. The data reduction was performed with

the APEX2ⁱ software and corrected for absorption using SADABS.ⁱⁱ Crystal structures were solved by direct methods using the SIR97 programⁱⁱⁱ and refined by full-matrix least-squares on F^2 including all reflections using anisotropic displacement parameters by means of the WINGX crystallographic package.^{iv} In all cases, the hydrogen atoms were included with at their calculated positions determined by molecular geometry and refined riding on the corresponding bonded atom. Final $R(F)$, $wR(F^2)$ and goodness of fit agreement factors, details on the data collection and analysis can be found in Table S1. CCDC 1510683 contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge from The Cambridge Crystallographic Data Centre via Crystallographic Data Centre via www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif.

Table S1. Crystal data and structure refinement for compound 152

Compound 26	
CCDC number	1510683
Formula	C ₂₀ H ₂₆ O ₅
<i>M</i>	346.41
Crystal System	Orthorhombic
Space group	$P2_12_12_1$
<i>T</i> [K]	150
<i>a</i> [Å]	16.4591(19)
<i>b</i> [Å]	7.2887(18)
<i>c</i> [Å]	14.371(2)
α [deg]	90
β [deg]	90
γ [deg]	90
<i>V</i> [Å ³]	1724.1(5)
<i>Z</i>	4
Density [gcm ⁻³]	1.335
μ [mm ⁻¹]	0.095

Observed reflections	23339
R_{int}	0.043
$R_1 [I > 2\sigma(I)]^a$	0.028
$wR_2 [all\ data]^b$	0.068
GoF	1.082

$$^a \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o| \quad ^b \left\{ \sum [w(F_o^2 - F_c^2)^2] / \sum [w(F_o^2)^2] \right\}^{1/2}$$

ⁱ.- A. Bruker, Inc. APEX2 (Version 1.08), SAINT (Version 7.03), SADABS (Version 2.11), SHELXTL (Version 6.12), Bruker Advanced X-ray Solutions, Madison, DOI (2004).

ⁱⁱ.- G. Sheldrick, Sadabs, University of Göttingen, Germany Program for Empirical Absorption Correction of Area Detector Data 1996.

ⁱⁱⁱ.- A. Altomare, M.C. Burla, M. Camalli, G.L. Cascarano, C. Giacovazzo, A. Guagliardi, A.G.G. Moliterni, G. Polidori, R. Spagna, SIR97: a new tool for crystal structure determination and refinement, J. Appl. Crystallog., 32 (1999) 115-119.

^{iv}.- (a) G.M. Sheldrick, Program for Crystal Structure Refinement, University of Göttingen, Göttingen, Germany, 2014. (b) L.J. Farrugia, WinGX suite for small-molecule single-crystal crystallography, J. Appl. Crystallog., 32 (1999) 837-838.