
*Búsqueda de modelos QSAR para la actividad repelente de sesquiterpenos naturales frente al mosquito de la Fiebre Amarilla, *Aedes aegypti**

Ramón García-Domenech*, Pablo García-Mujica, Úrsula Gil, Cristina Casanova, Joycelyna Mireilli Beltrán, Jorge Gálvez.

Departamento de Química Física, Facultad de Farmacia, Universitat de València, Avda. V.A. Estellés, s/n, 46100- Burjassot, Valencia, España.

*Search of QSAR models for natural sesquiterpenes repellent activity against the Yellow Fever mosquito, *Aedes aegypti**

*Cerca de models QSAR per a l'activitat repel·lent de sesquiterpens naturals front al mosquit de la Febre Groga, *Aedes aegypti**

Recibido: 26 de julio de 2010; revisado: 15 de septiembre de 2010; aceptado: 17 de septiembre de 2010

RESUMEN

El objetivo de este trabajo ha sido desarrollar modelos QSAR aplicando la topología molecular y el análisis de regresión multilíneal para la predicción de la repelencia espacial frente al mosquito de la Fiebre Amarilla, *Aedes aegypti* de un grupo de sesquiterpenos naturales. Validados los modelos, se realiza un cribado molecular y se seleccionan nuevos sesquiterpenos potencialmente activos.

Palabras clave: Sesquiterpenos, repelentes de mosquitos, índices topológicos, análisis de regresión multilíneal, relaciones cuantitativas estructura-actividad, RCEA

SUMMARY

The aim of this study was to develop QSAR models using molecular topology and multilinear regression analysis for predicting the spatial repellency against the Yellow Fever mosquito, *Aedes aegypti* from a group of natural sesquiterpenes. Validated models, molecular screening is performed and selected new sesquiterpenes potentially active.

Key words: Sesquiterpenes, mosquito repellency, topological descriptors, multilinear regression analysis, quantitative structure-activity relationships, QSAR

RESUM

L'objectiu d'aquest treball consisteix en desenvolupar models QSAR aplicant la topologia molecular i l'anàlisi de regressió multilíneal per a la predicció de l'activitat repel·lent espacial front al mosquit de la Febre Groga, *Aedes aegypti*, d'un grup de sesquiterpens naturals. Un cop validats els models, es realitza un cribatge molecular i es seleccionen nous sesquiterpens potencialment actius.

Mots clau: Sesquiterpens, Repel·lents de mosquits, Índexs topològics, Anàlisi de regressió multilíneal, Relacions quantitatives estructura-activitat, RCEA

* Correspondencia autor:
Tel. +34 963544291 E-mail: ramon.garcia@uv.es

1. INTRODUCCIÓN

Extensas, y cada vez más numerosas, son las regiones del planeta en las que las enfermedades vectorizadas por mosquitos, tales como la malaria, el dengue, la fiebre amarilla o el virus del Nilo occidental, representan una realidad que genera en materia de investigación una frenética actividad por parte de los investigadores en cuanto a la búsqueda de medidas paliativas frente a estas.

Los mosquitos, a través del olor corporal y la exhalación de dióxido de carbono, localizan a sus huéspedes [1]. Partiendo de esta base la protección personal frente a las picaduras de mosquito es una de las más importantes medidas de prevenir la transmisión de las enfermedades transmitidas por ellos [2].

El uso de un repelente por parte de una persona, presenta a esta como no atractiva o inapetente para el mosquito, siendo este consecuentemente repelido [3]. El repelente de mosquitos más usado hasta el momento es un producto químico de origen sintético denominado N,N-dietil-3-metilbenzamida (DEET).

El DEET es un repelente efectivo, pero se han dado casos de toxicidad baja-moderada en humanos, tales como irritación de mucosas [4, 5]. Además se han presentado resistencias en *Drosophila melanogaster* [6]. Debido a estos efectos indeseables, la investigación de repelentes de origen natural se presenta como una opción plausible en la búsqueda de medidas, seguras, eficaces y económicas, en una época, esta en que vivimos, donde las exigencias en los marcos legislativos y la opinión pública no dejan más que ver una negativa conjunta cada vez mayor hacia los compuestos de síntesis [7, 8].

Las propiedades repelentes de ciertas plantas frente a artrópodos plaga eran ya bien conocidas antes de la aparición de compuestos químicos de síntesis. Aunque la búsqueda de nuevos compuestos naturales sea prometedora, el número de plantas por estudiar resultaría verdaderamente abrumador, ya no sólo en cuanto a la cantidad sino que también en cuanto al esfuerzo en tiempo y dinero. Es

en esta perspectiva donde los métodos QSAR constituyen una alternativa que evita o reduce considerablemente tan costosos esfuerzos.

La búsqueda de modelos QSAR para la predicción de propiedades físicas, fisicoquímicas o biológicas es un área de investigación de gran interés [9-10]. El grado de conocimiento de la estructura de una molécula es un aspecto imprescindible para encontrar eficientes relaciones estructura-actividad. En este sentido, la topología molecular se ha convertido en una herramienta útil en la búsqueda de modelos QSAR. A partir de ella se puede caracterizar de una forma rápida y sencilla la estructura de una molécula a través de los correspondientes descriptores topológicos [11].

La aplicación de la topología molecular en la búsqueda de modelos de predicción QSAR se ha utilizado con éxito en el campo del diseño de fármacos antiparasitarios [12-14] y compuestos activos frente a diversos vectores transmisores de enfermedades parasitarias [15-18].

El objetivo del presente trabajo es la búsqueda de modelos topológico-matemáticos para la predicción de la actividad repelente frente al mosquito de la Fiebre Amarilla de un grupo de sesquiterpenos de origen natural utilizando el análisis de regresión multilínea, y su aplicación a la búsqueda de nuevos compuestos potencialmente activos.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Compuestos analizados

En este estudio hemos seleccionado un grupo de 13 sesquiterpenos de origen vegetal que han sido aislados, purificados y ensayados en función de su estructura química y su repelencia espacial contra el mosquito de La Fiebre Amarilla, *Aedes aegypti*. Todos los compuestos estudiados fueron extraídos de las plantas *Amirys balsamifera* y *Fokienia hodginsii* [19]. La figura 1 muestra las estructuras químicas de los sesquiterpenos utilizados en el análisis QSAR.

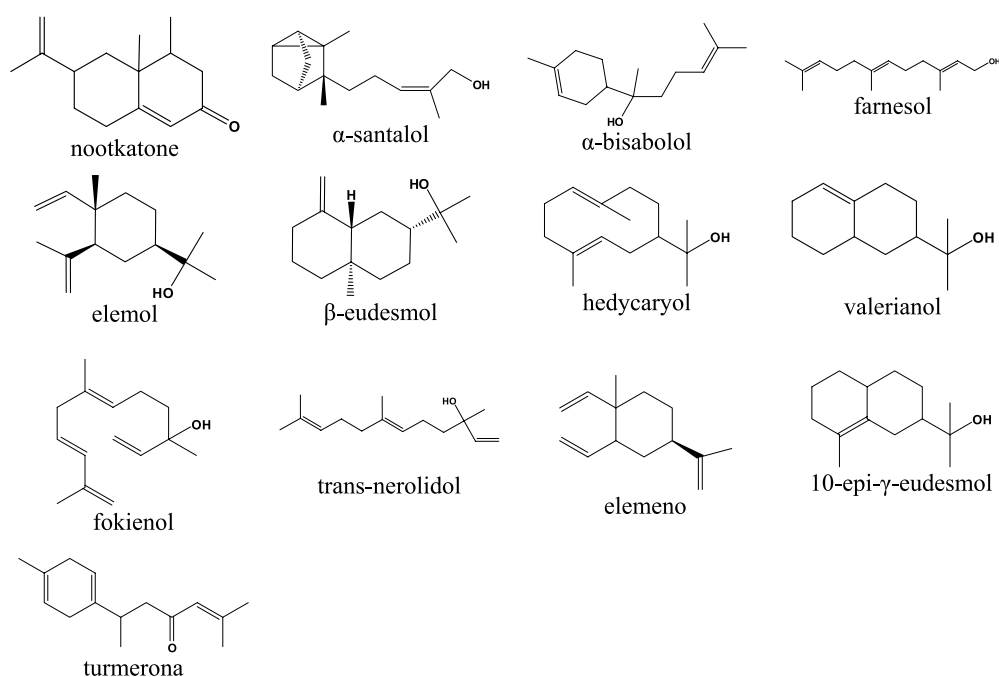


Figura 1 Estructuras químicas de los sesquiterpenos utilizados en el análisis QSAR.

2.2 Ensayos de repelencia

Los bioensayos se realizaron conforme a la metodología de Paluch *et al* [19] durante un período de 5 días. Se trabajó con grupos de 20 mosquitos *Aedes aegypti*, (cepa Liverpool) de una colonia establecida en el laboratorio. Sólo se utilizaron mosquitos hembra en las pruebas y tenían al menos 5 días. Después de la observación de la distribución de los mosquitos dentro del recinto en donde se utilizó el producto a ensayar, se determinó el porcentaje de repelencia a diferentes tiempos de exposición a partir de la siguiente fórmula:

Repelencia espacial promedio (%) = $[(n^{\circ} \text{ mosquitos en zona sin tratamiento} - n^{\circ} \text{ mosquitos en zona tratada})/20] \times 100$

La tabla I muestra los valores promedios (%) de la repelencia espacial experimental de cada compuesto a 60, 90, 120 y 180 minutos de exposición [19].

2.3 Descriptores topológicos

La caracterización de las estructuras de cada uno de los sesquiterpenos analizados se realizó calculando un conjunto de índices topológicos. Para ello, cada molécula se asimila a un grafo en donde cada vértice representa a un átomo y cada eje a las conexiones existentes entre ellos. A partir del grafo, se construye la matriz topológica cuyos elementos adquieren valores nulos o no en función de las conexiones existentes entre dichos elementos en el grafo. El tratamiento posterior de la matriz topológica conduce a los índices topológicos que caracterizan a ese grafo de una manera rápida y sencilla.

En este trabajo se ha utilizado el programa Dragon [11] a partir del cual se obtienen un conjunto amplio de descriptores topológicos.

2.4 Algoritmos QSAR: Análisis de regresión multilíneal

La búsqueda de los modelos topológicos QSAR desarrollados en este trabajo se ha realizado mediante análisis de regresión multilíneal, ARML, con la ayuda del programa Statistica 8.0, [20] utilizando los índices topológicos como variables independientes y la repelencia espacial promedio (%), en su transformación logarítmica, logRep, a diferentes tiempos de exposición como variables dependientes.

El programa Statistica analizó los índices topológicos y la repelencia para cada tiempo (60, 90, 120 y 180 minutos) y buscó la mejor regresión con 1, 2 y 3 variables. El estudio

estadístico de la función seleccionada se hace atendiendo al número de casos utilizados (N), el coeficiente de correlación (R), varianza de la propiedad (R^2), el error estándar de estimación, (EEE), el valor de Fisher (F) y la significación estadística (p).

La validación de los modelos de predicción seleccionados se ha hecho mediante una validación cruzada tipo "leave-one-out" [21, 22].

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La búsqueda de relaciones cuantitativas estructura-actividad con un grupo de sesquiterpenos de origen vegetal y la actividad repelente espacial frente al mosquito *Aedes aegypti* ha sido objeto de estudio recientemente por el grupo de Paluch *et al.* [19]. En dicho estudio utilizan como descriptores de la estructura molecular, parámetros fisicoquímicos y mecanocuánticos tales como el coeficiente de partición octanol/agua, logP, presión de vapor, logVP, constante de Henry, refracción molar, momento bipolar, polarizabilidad, energías LUMO y HOMO así como topológicos como el índice de Wiener y los índices de conectividad molecular χ_i . Los primeros se encuentran sujetos a un error experimental que acompaña su determinación y a un tiempo de cálculo considerable.

Con el objeto de evitar esos problemas, en este trabajo se utiliza exclusivamente índices topológicos los cuales son fáciles, rápidos y precisos de calcular.

Con la ayuda del programa Statistica y el módulo estadístico de regresión multilíneal se buscan las mejores funciones de predicción con 1, 2 o 3 variables. La tabla II recoge los mejores modelos de predicción de actividad repelente obtenidos para cada tiempo de exposición así como los parámetros estadísticos que acompañan a cada modelo. En todos ellos intervienen los índices topológicos ZM1 (primer índice del grupo de Zagreb que se obtiene como suma del cuadrado de la valencia topológica de todos los vértices del grafo molecular) y MPC05 (suma de todos los caminos de orden cinco existente en el grafo molecular). En el modelo obtenido para 180min. aparece una tercera variable, $CX4P = \chi_p^4 / \chi_p^v$ que evalúa la conectividad entre los átomos de la molécula separados por cuatro enlaces y la presencia de heteroátomos (átomos diferentes a C y H). El cálculo pormenorizado de estos índices puede consultarse en la referencia [11].

Tabla I Repelencia espacial experimental y calculada para cada compuesto sesquiterpénico a partir de los modelos topológicos de predicción seleccionados para cada tiempo de exposición.

	Repelencia espacial promedio (%)							
	60 min		90 min		120 min		180 min	
	Exp(%)	Calc(%)	Exp(%)	Calc(%)	Exp(%)	Calc(%)	Exp(%)	Calc(%)
nootkatone	42.1	46.6	52.3	51.9	51.7	55.5	62.9	68.1
α -santalol	65.7	60.9	67.7	69.4	80.5	70.2	87.1	79.2
α -bisabolol	61.1	74.9	70.5	81.8	83.6	83.2	84	93.1
farnesol	41.9	42.0	42.6	44.5	50.7	50.3	68.8	68.0
elemol	84.2	85.8	86.3	95.0	84.2	93.8	88.9	92.9
β -eudesmol	72.3	76.7	88.4	86.0	81.6	85.4	86.1	89.1
hedycaryol	100.0	90.1	92.9	98.5	97.7	97.7	95.3	94.8
valerianol	72.5	72.1	88.8	80.8	81.9	81.0	84.2	86.1
fokienol	81.6	69.3	88.5	74.3	90.8	77.6	93.1	77.2
trans-nerolidol	62.3	69.3	72.9	74.3	68.7	77.6	66.5	75.6
elemeno	40.4	37.9	39.2	41.0	43.3	46.2	48.2	49.1
10-epi- γ -eudesmol	82.2	76.7	88.8	86.0	82.2	85.4	93.3	88.9
turmerona	62.7	62.0	74.2	67.3	80.4	70.7	88.9	81.9

Tabla II Modelos topológicos de predicción y parámetros estadísticos seleccionados para cada tiempo.

Tiempo	Función de predicción seleccionada (Log)				Parámetros estadísticos				
	Intercepto	ZM1	MPC05	CX4P	R ²	Q ²	EEE	F	p
60 min	-1.540	0.054	-0.027	-	0.880	0.808	0.047	36.7	0.0000
90 min	-1.596	0.056	-0.027	-	0.912	0.866	0.041	51.6	0.0000
120 min	-1.039	0.047	-0.023	-	0.869	0.770	0.043	33.1	0.0000
180 min	-1.426	0.033	-0.014	1.179	0.813	0.636	0.044	13.1	0.0012

La figura 2 muestra los resultados de predicción obtenidos para cada tiempo al graficar el logaritmo del porcentaje de repelencia experimental de cada compuesto, $\log\text{Rep}_{\text{exp}}$, frente a $\log\text{Rep}_{\text{calc}}$. Todos los modelos muestran valores de $R^2 > 0.80$ lo que significa una explicación de la varianza de la propiedad del grupo de compuestos analizados superior al 80%.

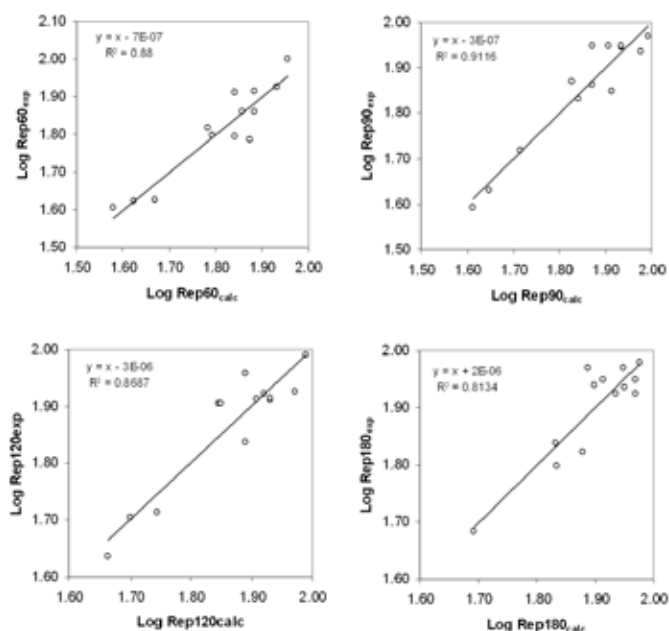


Figura 2.- Representación gráfica de la repelencia espacial experimental frente a la calculada para cada compuesto y tiempo analizado.

La Tabla I muestra así mismo el valor del porcentaje de repelencia calculado para cada compuesto y tiempo de exposición utilizado a partir de las ecuaciones de predicción seleccionadas (con el $\log\text{Rep}_{\text{calc}}$ obtenido para cada tiempo y ecuación, se calcula el porcentaje de repelencia a través del valor antilogarítmico, $10^{\log\text{Rep}_{\text{calc}}}$). Como puede observarse, en términos generales, los valores calculados están en concordancia con los experimentales tanto para los compuestos con elevado porcentaje de repelencia (ver hedycaryol), como bajo (ver farnesol y elemeno). Si nos fijamos en el error estandar de estimación que acompaña a cada función de predicción, (EEE= 0.047, 0.041, 0.043 y 0.044 correspondientes a los modelos obtenidos a 60, 90, 120 y 180 min, respectivamente) observamos que es relativamente bajo en relación con el intervalo numérico en el que se mueve la propiedad estudiada, $\log\text{Rep}$, representando el 11.9%, 10.9%, 12.1% y 14.8% de dicha variabilidad. Si tenemos en cuenta que estamos

trabajando con una propiedad biológica sujeta a un discreto error experimental en su determinación, estos resultados avalan los modelos de predicción seleccionados. Para validar las funciones seleccionadas, se realizó una validación cruzada tipo *leave-one-out* a cada una de ellas. La validación consiste en reservar un caso (compuesto) del grupo, obtener el modelo con los restantes N-1 compuestos y predecir el valor de la propiedad del caso eliminado. El proceso se repite tantas veces como compuestos hay en el grupo. Con los valores de predicción obtenidos de esta forma, se calcula el coeficiente de predicción, Q^2 , de forma similar a como se obtiene R^2 con el grupo completo. El valor de Q^2 es indicativo de la calidad del modelo seleccionado. Valores de $Q^2 > 0.7$ son considerados como aceptables. En nuestro caso se obtuvieron $Q^2 = 0.808, 0.866, 0.770$ y 0.636 para 60, 90, 120 y 180 min, respectivamente. Todos los modelos, excepto el obtenido a 180 min mostraron valores de $Q^2 > 0.7$, lo cual nos indica que este último es menos estable que los demás y, por tanto, los valores de predicción obtenidos con el mismo, se han de tomar con cierta reserva. La figura 3 muestra los valores de los residuales ($\log\text{Rep}_{\text{exp}} - \log\text{Rep}_{\text{calc}}$) obtenidos con la función seleccionada frente a los residuales de la validación cruzada para cada compuesto y tiempo de exposición. En todos los casos existe una excelente correlación entre ambos residuales ($R^2 > 0.973$) lo cual es indicativo de que los modelos son de utilidad para la predicción de todos los compuestos que forma el grupo de sesquiterpenos analizados.

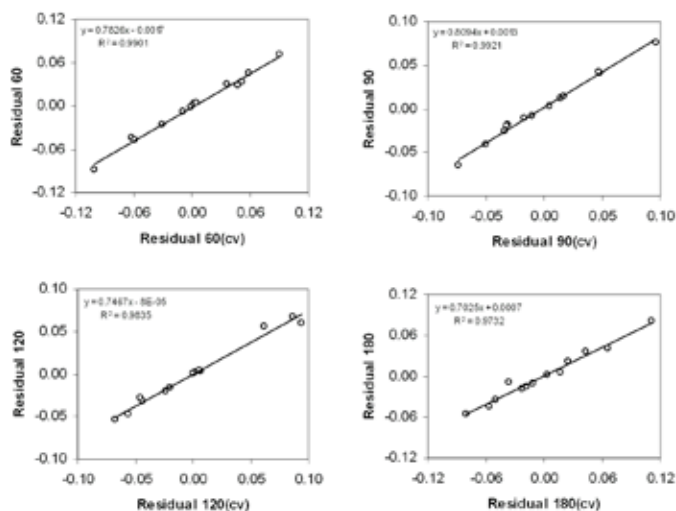


Figura 3.- Representación gráfica de los residuales obtenidos con cada compuesto frente a los residuales de la validación cruzada.

Además, los parámetros estadísticos que acompañan a cada función son equiparables, incluso mejores que los obtenidos por Paluch et al. Si comparamos sus coeficientes de regresión y de predicción, R^2 y Q^2 , (a 60 min: $R^2=0.82$ y $Q^2=0.73$; 90 min: $R^2=0.85$ y $Q^2=0.69$; 120 min: $R^2=0.83$ y $Q^2=0.72$; 180 min: $R^2=0.89$ y $Q^2=0.75$) [19] todos ellos con funciones de tres variables, salvo a 180 min, los modelos obtenidos en este trabajo y con sólo dos variables topológicas son más predictivos.

El interés más importante de cualquier modelo QSAR es poder aplicarlo a la predicción de la propiedad estudiada a compuestos diferentes al grupo de trabajo. En nuestro caso se podrían seleccionar nuevos compuestos potencialmente repelentes y con estructura preferentemente sesquiterpénica.

En este sentido hemos realizado un pequeño estudio de predicción con los compuestos naturales recogidos en la base molecular MicroSource Discovery Systems, [23] y centrándonos en los sesquiterpenos presentes en dicha base (alrededor de sesenta). La Tabla III recoge algunos

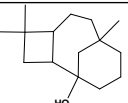
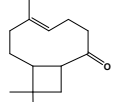
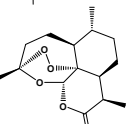
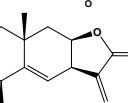
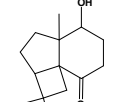
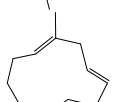
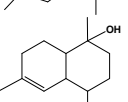
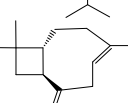
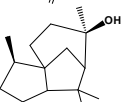
de estos compuestos y los valores estimados de la repelencia espacial a cada tiempo aplicando las ecuaciones de predicción seleccionadas. Algunos de los compuestos seleccionados poseen además actividad antiparasitaria (artemisinina como antimalárico [24], helenina como anti-helmíntico [25] o el cedrol como acaricida [26]) lo que favorecería aún más su utilidad como antiparasitarios.

La siguiente etapa, lógicamente debe ser la realización de los correspondientes ensayos experimentales de repelencia para corroborar las predicciones obtenidas con los modelos aquí presentados.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido financiada por el Master Internacional en Enfermedades Parasitarias Tropicales (Universitat de Valencia, Curso 2009-2010) y el Ministerio de Educación e Innovación (proyecto SAF2009-13059-C03-02).

Tabla 3.- Cribado molecular y selección de potenciales sesquiterpenos con actividad repelente.

Sesquiterpeno	Estructura	Repelencia espacial estimada (%)			
		60 min	90 min	120 min	180 min
β -CARYOPHYLLENO ALCOHOL		78.2	89.7	87.2	85.4
15-NORCARYOPHYLLEN-3-ONE		59.0	64.9	67.8	73.4
ARTEMISININA		64.1	77.5	74.2	-
HELENINA		73.6	84.3	82.7	-
3-NOR-3-OXOPANASINSAN-6-OL		35.2	40.4	43.8	76.1
α -HUMULENO		51.1	54.9	59.7	55.9
CADIN-4-EN-10-OL		43.8	48.8	52.6	70.6
CARYOPHYLLENO [t(-)]		35.7	38.8	43.9	48.4
CEDROL		37.5	43.0	46.2	70.3

BIBLIOGRAFIA

1. Bowen, M.F. The sensory physiology of host-seeking behavior in mosquitoes. *Annu Rev Entomol*, **36**, 139-158, 1991.
2. Fradin, M. Mosquitoes and Mosquito Repellents: A Clinician's Guide. *Annals of Internal Medicine*, **128**, 931-940, 1998.
3. Maibach, H.; Skinner, W.; Strauss, W. and Khan, A. Factors that attract and repel mosquitoes in human skin. *Journal Of the American Medical Association*, **196**, 263-266, 1966.
4. Briassoulis, N. and Hatzis, T. Toxic encephalopathy associated with use of DEET insect repellents: a case analysis of its toxicity in children. *Human Experimental Toxicology*, **20**, 8-14, 2001.
5. Bell, J.; Veltri, J. and Page, B. Human exposures to N, N-diethyl-m-toluamide insect repellents reported to the American Association of Poison Control Center, 1993-1997. *Int J Toxicol*, **21**, 341-352, 2002.
6. Reeder, N. L.; Ganz, P. H.; Carlson, J. R. and Saunders, C. W. Isolation of a DEET-insensitive mutant of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *J Econ Entomol*, **94**, 1584-1588, 2001.
7. Coats, J. R. Risks from natural versus synthetic insecticides. *Annu Rev Entomol*, **39**, 489-515, 1994.
8. Isman, M. B. Botanical insecticides, deterrents and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu Rev Entomol*, **51**, 45-66, 2006.
9. Kier, L. B. and Hall, L. H. Molecular Connectivity In Structure-Activity Analysis. *Research Studies Press, Letchworth, UK*, 1986.
10. Devillers, J. and Balaban, A.T. Eds. Topological Indices and Related Descriptors in QSAR and QSPR; Gordon and Breach Science Publishers: Singapore 1999.
11. Todeschini, R. and Consonni, V., Molecular Descriptors for Chemoinformatics, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Second Edition, 2009.
12. Gozalbes, R.; Brun-Pascaud, M.; Garcia-Domenech, R.; Galvez, J.; Girard, P. M.; Doucet, J. P.; et al. Anti-Toxoplasma activities of 24 quinolones and fluoroquinolones in vitro: prediction of activity by molecular topology and virtual computational techniques. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **44(10)**, 2771-6, 2000.
13. Mahmoudi, N.; Garcia-Domenech, R.; Galvez, J.; Farhati, K.; Franetich, J.F.; Sauerwein, R.; Hannoun, L.; Derouin, F.; Danis, M. and Mazier, D. New active drugs against liver stages of Plasmodium predicted by molecular topology, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **52(4)**, 1215-1220, 2008.
14. Garcia-Domenech, R.; Galvez, J.; De Julian-Ortiz, J.V. and Pogliani, L. Some New Trends In Chemical Graph Theory. *Chemical Reviews*, **108**, 1127-1169, 2008.
15. García-Domenech, R., Bernués, A., Santos-Berrido, E., Diaz, D. and Galvez, J. Application of molecular topology in the prediction of vapor pressure and mosquito repellent activity of a group of compounds derived from N, N-diethyl-m-toluamide, *Afinidad*, **66**, 439-444, 2009.
16. Galvez, J.; de Julian-Ortiz, J. V. and Garcia-Domenech, R. Application of molecular topology to the prediction of potency and selection of novel insecticides active against malaria vectors. *Theochem*, **727(1-3)**, 107-13, 2005.
17. Grodnitzky, J. A. and Coats, J. R. QSAR evaluation of monoterpenoids insecticidal activity. *J Agric Food Chem*, **50**, 4576-4580, 2002.
18. García-Domenech, R.; Aguilera, J.; El Moncef, A.; Pocovi, S. and Gálvez J. Application of molecular topology to the prediction of mosquito repellents of a group of terpenoid compounds, *Molecular Diversity*, **14**, 321-329, 2010.
19. Paluch, G.; Grodnitzky, J.; Bartholomay, L. and Coats, J. R. Quantitative Structure-Activity Relationship of Botanical Sesquiterpenes: Spatial and Contact Repellency to the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *J Agric Food Chem*, **57**, 7618-7625, 2009.
20. STATISTICA version 8.0, Statsoft I.
21. Besalu, E. Fast Computation Of Cross-validated Properties In Full Linear Leavemany-out Procedures. *Journal Mathematical Chemistry*, **29**, 191-204, 2001.
22. Gramatica, P. Principles of QSAR models validation: internal and external. *QSAR Comb Sci*, **26**, 694-701, 2007.
23. MicroSource Discovery Systems, <http://www.msdiscovery.com/index.html>
24. Klayman, D.L., Qinghaosu (Artemisinin): An Antimalarial Drug from China. *Science*, **228**, 1049, 1985.
25. Tsuda, K.; Tanabe, K.; Iwai, I.; Funakoshi, K., The Structure of Alantolactone. *J Am Chem Soc*, **79**, 5721-5724, 1957.
26. Breitholle, E.G. and Fallis, A.G. Total synthesis of (+,+-)-cedrol and (+,+-)-cedrene via an intramolecular Diels-Alder reaction. *J Org Chem*, **43**, 1964-1968, 1978.