



HAL
open science

Hémisynthèse de dérivés de l'acide grandiflorénique et évaluation préliminaire de leur activité biologique.

Nurby Nahiely Rios Tesch

► **To cite this version:**

Nurby Nahiely Rios Tesch. Hémisynthèse de dérivés de l'acide grandiflorénique et évaluation préliminaire de leur activité biologique.. Chimie organique. Université de Bordeaux; Universidad de los Andes (Mérida, Venezuela; 1785-..), 2017. Français. NNT : 2017BORD0904 . tel-01827248

HAL Id: tel-01827248

<https://theses.hal.science/tel-01827248>

Submitted on 2 Jul 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE EN COTUTELLE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
ET DE L'UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES
POSTGRADO EN QUIMICA DE MEDICAMENTOS
SPÉCIALITÉ : CHIMIE ORGANIQUE

Par Nurby NahIELy RIOS TESCH

**HÉMISYNTHÈSE DE DÉRIVÉS DE L'ACIDE
GRANDIFLORÉNIQUE ET EVALUATION PRELIMINAIRE DE
LEUR ACTIVITÉ BIOLOGIQUE**

Sous la direction du Dr. Denis DEFFIEUX
et du Pr. Luis ROJAS

Soutenue le 21 décembre 2017

Membres du jury:

Mme MITAINE-OFFER, Anne-Claire	Professeur, Univ. Bourgogne Franche-Comté	Rapporteur
M. CHARRIS, Jaime	Professeur, Univ. Central de Venezuela	Rapporteur, Président
M. DEFFIEUX, Denis	Maître de Conférences, Univ. Bordeaux	Co-directeur
M. ROJAS, Luis	Professeur, Univ. de Los Andes	Co-directeur

Titre : Hémisynthèse de dérivés de l'acide grandiflorénique et évaluation préliminaire de leur activité biologique.

Résumé : Ces travaux de thèse décrivent l'hémisynthèse de dérivés de l'acide grandiflorénique (AG). Ce produit naturel a dans un premier temps été converti en *ent*-kaur-9(11),16-dien-19-ol, composé qui a ensuite été estérifié dans les conditions de Steglich par une série d'acides benzoïques diversement substitués. Aux douze nouveaux composés ainsi obtenus a été ajoutée la synthèse du 9(11),16-dien-19-(2-méthyl-5-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)éthyl-*ent*-kaurène. Ces dérivés de l'AG ont été soigneusement purifiés, puis complètement caractérisés (IR, SM, RMN 1D et 2D) en vue de leur évaluation biologique. L'activité antibactérienne a été testée sur différentes souches bactériennes comme *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*. Les propriétés fongicides ont été évaluées sur *Candida albicans* et *C. krusei*. L'activité anti-inflammatoire *in vivo* a été étudiée sur des souris BIO:NMRI en utilisant le test de l'œdème de l'oreille induit par le xylol. Les dérivés d'acide grandiflorénique n'ont malheureusement montré aucune activité antibactérienne, ni antifongique, mais leur activité anti-inflammatoire s'est montrée prometteuse dans le cas de l'inflammation aiguë, le 9(11),16-dien-18-[2-(4-isobutylphényl)propyl]-*ent*-kaurène se révélant être le meilleur composé.

Mots clés : acide grandiflorénique, antibactérien, fongicide, anti-inflammatoire.

Title: Hemisynthesis of grandiflorenic acid derivatives and evaluation preliminary of their biological activity.

Abstract: This thesis work describes the hemisynthesis of grandiflorenic acid (GA) derivatives. GA natural product was first converted into *ent*-kaur-9(11),16-dien-19-ol, which was next esterified under Steglich conditions with a series of diversely substituted benzoic acids. To the twelve new compounds thus obtained, was added the preparation of the 9(11),16-dien-19-(2-methyl-5-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)ethyl-*ent*-kaurene. All these new GA derivatives were carefully purified, and then fully characterized (IR, MS, 1D and 2D NMR) in the aim of their biological evaluation. The antibacterial activity was tested against several bacteria strains, such as *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Escherichia coli*. The fungicide properties were evaluated against *Candida albicans* and *C. krusei*. The *in vivo* anti-inflammatory activity was studied on BIO:NMRI mice using the xylol-induced ear-edema test. Unfortunately, no antibacterial nor antifungal activity was exhibited by the grandiflorenic acid derivatives, but their anti-inflammatory activity revealed promising against acute inflammation, with the 9(11),16-dien-18-[2-(4-isobutylphenyl)propyl]-*ent*-kaurene being the best compound.

Keywords: grandiflorenic acid, antibacterial, fungicide, anti-inflammatory.

Institut des Sciences Moléculaires – Université de Bordeaux

ISM (CNRS–UMR 5255), Bât. A12, 351 cours de la Libération, 33405 Talence Cedex

Dedicatoria

A mi familia, pilar fundamental en mi vida, especialmente a mi esposo Carlos y mis bellos hijos Estefany Paola y Carlos Daniel, quienes son el motor que me obligan a funcionar y a ser cada día mejor, los amo.

“El mundo está en las manos de aquellos que tienen el coraje de soñar y correr el riesgo de vivir sus sueños”

Paulo Coelho

Agradecimientos

A Dios por siempre acompañarme y guiar cada paso que doy en mi vida.

A la Universidad de los Andes por permitirme nuevamente alcanzar otra meta que complementa mi formación académica, ilustre casa de estudios que me abrió sus puertas y depósito su confianza como estudiante y también como docente.

A mi esposo Carlos, mis hijos Estefany Paola y Carlos Daniel, por su paciencia, comprensión, y apoyo incondicional para alcanzar este logro, son mi vida, mi energía, los amo.

A mi padres, por apoyarme incondicionalmente en cada momento, sin ustedes nunca hubiera alcanzado esta meta, gracias por existir, son simplemente únicos, los adoro.

Al Prof. Luis Rojas por depositar su confianza en mí, por sus consejos y orientaciones.

A los Profesores Laurent Pouységu, Dennis Deffieux, Stéphane Quideau y Philippe Peixoto por su hospitalidad y por sus asesorías académicas.

A mis amigos Pablo y Miguel, por brindarme su apoyo incondicional, por su mano amiga durante los meses que estuve lejos de mi familia.

A las profesoras María Eugenia Lucena y Clara Díaz por dedicarme parte de su tiempo, enseñarme y orientarme durante esta investigación.

Al Bioterio de la Universidad de los Andes por permitirme trabajar en sus instalaciones, así como a su personal por orientarme durante el desarrollo de la actividad antiinflamatoria.

A mis amigas Diolimar y Darly por su amistad, sus valiosos consejos, y sugerencias durante está etapa de mi vida.

A la Dra. Rosa Aparicio por su ayuda incondicional, sus consejos, y contribuciones durante el desarrollo de está investigación.

A la Universidad de Bordeaux (Francia) por albergarme en sus espacios y permitirme desarrollar esta investigación.

Al programa de Cooperación de Post-graduados (PCP) Francia-Venezuela, por su financiamiento para el desarrollo de este proyecto de investigación, especialmente a Madame Marina Hild por su atención y colaboración.

ÍNDICE GENERAL

Dedicatoria.....	i
Agradecimiento.....	ii
Índice general.....	iii
Abreviaturas y símbolos.....	ix
Índice de figuras.....	xiv
Índice de tablas.....	xxi
Índice de esquemas.....	xxiv
Índice de ecuaciones.....	xxvii
Resume.....	xxix
I. Introducción.....	1
II. Antecedentes.....	5
II.1 Plantas medicinales.....	6
II.1.1 Definición.....	6
II.2 Productos naturales o metabolitos secundarios.....	7
II.2.1 Definición.....	7
II.3 Diterpenoides.....	13
II.3.1 Ácido <i>ent</i> -kaur-9(11)-16-dieno-19-oico.....	18
II.3.1.1 Distribución natural del ácido <i>ent</i> -kaur-9(11)-16-dieno-19-oico.....	20
II.3.1.2 Biosíntesis del ácido <i>ent</i> -kaur-9(11)-16-dieno-19-oico.....	23
II.3.1.3 Modificaciones estructurales del ácido grandiflorénico reportados en la literatura.....	27
a. Oxidación.....	27
a.1 Epoxidación con el ácido <i>m</i> -cloro-peroxibenzoico (MCPBA)...	27
a.2 Hidroxilación con tetraóxido de osmio.....	28
a.3 Oxidación con dióxido de selenio (SeO ₂).....	30
a.4 Ozonólisis.....	32
b. Reducción.....	33
b.1 Hidrogenación.....	33

b.2 Reducción con tetrahidruro de aluminio y litio (LiAlH ₄).....	35
c. Esterificación.....	37
d. Formación de amidas.....	39
II.3.1.4 Transformaciones microbiológicas realizadas al ácido grandiflorénico.....	40
II.3.1.5 Actividades biológicas y relación estructura actividad reportadas para el ácido grandiflorénico.....	42
a. Actividad antiinflamatoria.....	42
b. Actividad cicatrizante.....	44
c. Actividad antibacteriana.....	45
d. Actividad antifúngica.....	46
e. Actividad tripanomicida.....	46
f. Actividad antimalárica.....	46
g. Actividad antialimentaria e insecticida.....	48
h. Actividad alelopática.....	48
i. Actividad antineoplásica.....	49
j. Actividad sobre el sistema cardiovascular.....	50
k. Toxicidad.....	51
III. Hipótesis.....	53
IV. Objetivos.....	55
IV.1 Objetivo general.....	56
IV.2 Objetivos específicos.....	56
V. Técnicas generales.....	57
V.1 Reacción de esterificación de Steglich.....	58
V.2 Técnicas cromatográficas.....	59
V.2.1 Cromatografía en capa fina (CCF).....	59
V.2.2 Cromatografía en columna (CC).....	60
V.3 Técnicas espectroscópicas.....	61

V.3.1 Espectroscopia de Infrarrojo (IR).....	61
V.3.1.1 Preparación de la muestra en IR.....	62
V.3.2 Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	62
V.3.2.1 Resonancia Magnética Nuclear de Protón (¹ H-RMN).....	63
V.3.2.2 Resonancia Magnética Nuclear de Carbono (¹³ C-RMN).....	65
V.4 Espectroscopia de Masas.....	65
V.5 Determinación del punto de fusión.....	66
V.6 Actividad antibacteriana.....	66
V.6.1 Método de difusión en agar (Método de Kirby Bauer).....	67
V.6.2 Método de microdilución.....	68
V.7 Actividad antifúngica.....	69
V.7.1 Método de difusión en disco.....	69
V.7.2 Método de microdilución.....	69
V.8 Actividad antiinflamatoria.....	70
V.8.1 Edema auricular inducido por xilol.....	72
VI. Parte experimental.....	73
VI.1 Obtención del ácido grandiflorénico.....	74
VI.2 Procedimiento experimental general para la síntesis de ésteres derivados	74
VI.2.1 Procedimiento para la síntesis del <i>ent</i> -kaura-9(11),16-dieno-19-ol.....	74
VI.2.2 Procedimiento para la síntesis de los ésteres derivados [III-XIV].....	75
VI.2.3 Obtención del 9(11),16-dieno-19-(2-metil-5-nitro-1 <i>H</i> -imidazol-1-il)etil- <i>ent</i> -kaureno [XVI].....	76
VI.2.4 Obtención del 2-(2-metil-5-nitro-1 <i>H</i> -imidazol-il)etilmétanosulfonato [XV].....	77
VI.3 Determinación del punto de fusión del ácido grandiflorénico y ésteres derivados.....	78
VI.4 Espectroscopía de infrarrojo (IR).....	79
VI.5 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	79
VI.6 Espectrometría de masas.....	80

VI.7 Actividad antibacteriana.....	81
VI.7.1 Método de microdilución.....	81
VI.7.1.1 Microorganismos.....	81
VI.7.1.2 Preparación de la suspensión del inóculo.....	81
VI.7.1.3 Preparación de las muestras.....	82
VI.7.1.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y mínima bactericida (CMB).....	83
VI.8 Actividad antifúngica.....	84
VI.8.1 Método de difusión en disco.....	84
VI.8.1.1 Microorganismos.....	84
VI.8.1.2 Preparación de la suspensión del inóculo.....	84
VI.8.1.3 Preparación de las placas.....	85
VI.8.1.4 Preparación de las muestras.....	85
VI.8.1.5 Preparación de los discos.....	85
VI.8.1.6 Controles positivos.....	85
VI.8.1.7 Lectura e interpretación de los resultados.....	85
VI.8.1.8 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)...	85
VI.9 Actividad antiinflamatoria.....	86
VI.9.1 Método de edema auricular inducido por xilol.....	86
VI.9.1.1 Animales de experimentación.....	86
VI.9.1.2 Preparación de las muestras.....	86
VI.9.1.3 Preparación de controles positivos.....	86
VI.9.1.4 Preparación del control negativo.....	86
VI.9.1.5 Agente irritante.....	87
VI.9.6 Protocolo de experimentación.....	87
VII. Resultados y discusión.....	89
VII.1 Ácido grandiflorénico [I].....	90
VII.2 <i>ent</i> -kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II].....	97

VII.3 Ésteres derivados del <i>ent</i> -kaur-9(11),16-dieno-19-ol [III-XIV].....	104
VII.3.1 9(11),16-dieno-19-(4-metoxibenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [III].....	104
VII.3.2 9(11),16-dieno-19-(2-metoxibenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [IV].....	110
VII.3.3 9(11),16-dieno-19-(4-trifluorometilbenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [V].....	116
VII.3.4 9(11),16-dieno-19-(2,3-dimetoxibenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [VI].....	122
VII.3.5 9(11),16-dieno-19-(2,4-dimetoxibenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [VII].....	128
VII.3.6 9(11),16-dieno-19-(2,5-dimetoxibenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [VIII].....	134
VII.3.7 9(11),16-dieno-19-(3,4,5-trimetoxibenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [IX].....	140
VII.3.8 9(11),16-dieno-19-(2,4,5-trimetoxibenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [X].....	146
VII.3.9 9(11),16-dieno-19-(3,5-dimetilbenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [XI].....	152
VII.3.10 9(11),16-dieno-19-(5-metil-2-nitrobenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [XII].....	158
VII.3.11 9(11),16-dieno-18-[2-(4-isobutilfenil)propil]- <i>ent</i> -kaureno [XIII].....	164
VII.3.12 9(11),16-dieno-19-[2-(3-benzofenil)propil]- <i>ent</i> -kaureno [XIV].....	170
VII.3.13 9(11),16-dieno-19-(2-metil-5-nitro-1- <i>H</i> -imidazol-1-il)etil- <i>ent</i> -kaureno [XVI].....	177
VII.4 Estudios de actividad biológica de los ésteres derivados del <i>ent</i> -kaur- 9(11),16-dieno-19-ol [III-XIV].....	185
VII.4.1 Actividad antibacteriana.....	185
VII.4.2 Actividad antifúngica.....	186
VII.4.3 Actividad antiinflamatoria.....	187
VIII. Conclusiones.....	196
IX. Recomendaciones.....	200
X. Bibliografía.....	202
XI. Anexos.....	218

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

AA	Ácido araquidónico
AG	Ácido grandiflorénico
AGM	Ácido grandiflorénico metilado
AK	Ácido kaurénico
Ar	Argón
ATCC	Colección Americana de cultivos tipo (American Type Culture Collection)
ATB	Antibiótico
ATP	Adenosin trifosfato
BrCH ₂ Ph	Bromuro de bencilo
CAS	Chemical Abstracts Service
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CH ₂ N ₂	Diazometano
CH ₂ N ₂ ⁺	Ión metildiazonio
CCl ₄	Tetracloruro de carbono
CFM	Concentración fungicida mínima
CG	Cromatografía de gases
CL ₅₀	Concentración letal 50
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CMB	Concentración mínima bactericida
CMI	Concentración mínima inhibitoria
COX	Ciclooxigenasa
DCC	Diciclohexilcarboimida
DCM ó CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
DL ₁₀₀	Dosis letal 100
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMAPF	Dimetilalilpirofosfato
DMF	Dimetilformamida

DMSO	Dimetilsulfóxido
DXP	1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato
EDCI	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carboimida
EM	Espectrometría de masas
EUCAST-AFST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing- Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing
ERO	Especies reactivas de oxígeno
Et ₂ O ó (CH ₃ CH ₂) ₂ O	Éter etílico
Et ₃ N	trietilamina
EtOAc	Acetato de etilo
FPF	Farnesilpirofosfato
GC-MS	Gas chromatography-Mass spectrometry (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas)
GI ₅₀	Concentración inhibitoria del 50% de proliferación celular
GPF	Geranilpirofosfato
GGPF	Geranilgeranilpirofosfato
H ₂	Hidrógeno
H _{ef}	Campo magnético efectivo
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
IC ₅₀	Concentración inhibitoria 50
IL	Interleuquina
IM	Intramuscular
IPPF	Isopentenilpirofosfato
IRA	Activador natural del receptor de interleuquina 1
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
LiAlH ₄	Tetrahidruro de aluminio y litio
LPS	Lipopolisacárido
MgSO ₄	Sulfato de magnesio

M ⁺	Ión molecular
MHz	Megahertz
MCPBA	Ácido <i>m</i> -cloro-peroxibenzoico
MVA	Mevalonato
m/z	masa/carga
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards (Comité Nacional de Estandar de Laboratorios Clínicos de los Estados Unidos de Norte América)
NF-κB	Factor nuclear <i>kappa</i> B
NaIO ₄	Peryodato de sodio
NaHSO ₃	Bisulfito de sodio
NMO	Metilmorfolina
NMR	Resonancia magnética nuclear
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetasa
OD	Oreja derecha
OI	Oreja izquierda
OMS	Organización Mundial de la Salud
-OPP	Grupo pirofosfato
OsO ₄	Tetraóxido de osmio
O ₃	Ozono
Ph ₃ P	trifenilfosfina
PGs	Prostaglandinas
Pd	Paladio
Pt	Platino
PtO ₂	Dióxido de platino
rf	Radio frecuencia
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

SDA	Sabouraud dextrose agar (agar dextrosa Sabouraud)
SeO ₂	Dióxido de selenio
TLC	Thin-Layer Chromatography (Cromatografía de capa fina)
THF	Tetrahidrofurano
TGF- β	Factor beta transformador de crecimiento
TMS	tetrametilsilano
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
UFC	Unidad formadora de colonias
UV	Ultravioleta
$[\alpha]_D$	Rotación óptica específica
Zn	Zinc
(CH ₃) ₂ S	Sulfuro de dimetilo
[RuCl ₂ (DMSO) ₄]	Diclorotetrakis (dimetilsulfóxido) de rutenio (II)
δ	delta
ΔE	Diferencia de energía
ΔEO	Grado de edema en oreja
ΔE_{ge}	Grado edema oreja del grupo ensayado
ΔE_{gc}	Grado edema oreja del grupo control
% I	Porcentaje de inflamación
% Inh	Porcentaje de inhibición de inflamación

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del isopreno [1].....	13
Figura 2. Estructura de geranilgeraniol [5].....	16
Figura 3. Estructuras de algunos diterpenos aislados de plantas.....	17
Figura 4. Esqueleto general de los diterpenos tipo kaureno.....	18
Figura 5. Estructura química del ácido <i>ent</i> -kaur-9(11),16-dieno-19-oico.....	19
Figura 6. <i>N</i> -óxido de <i>N</i> -metilmorfolina [15].....	29
Figura 7. Estructura de Lewis del ozono.....	32
Figura 8. Mecanismo de hidrogenación de alquenos.....	34
Figura 9. Compuestos evaluados sobre <i>P. falciparum</i> resistente a cloroquina. [AG] ácido grandiflorénico; [32] metil <i>ent</i> -9 β :11,16 β -diepoxi-kauran-19-ato; [33] metil <i>ent</i> -9 β :11,16 α -diepoxi-kauran-19-ato.....	47
Figura 10. Compuestos evaluados sobre líneas celulares de tumores humanos. [AG] ácido grandiflorénico; [36] ácido <i>ent</i> -16 β -epoxi-kauran-19-oico; [37] ácido <i>ent</i> -16 α -epoxi-kauran-19-oico; [32] metil <i>ent</i> -9 β :11,16 β -diepoxi-kauran-19-ato; [33] metil <i>ent</i> -9 β :11,16 α -diepoxi-kauran-19-ato.....	50
Figura 11. <i>Artemia salina</i>	51
Figura 12. 4-dimetilaminopiridina [39].....	58
Figura 13. FISATROM 430 D.....	79
Figura 14. Espectrofotómetro de infrarrojo marca Perkin Elmer, modelo Spectrum Two.....	79
Figura 15. Equipo de RMN Bruker-Avance de 300 MHz.....	80
Figura 16. Espectrómetro de masas marca Hewlett Packard modelo 5973.....	80
Figura 17. Preparación de la muestras. Método microdilución.....	82
Figura 18. Determinación de CMI y CMB. Método de microdilución.....	84
Figura 19. Espectro Infrarrojo (KBr) del ácido <i>ent</i> -kaur-9(11),16-dieno-19-oico [I].....	91
Figura 20. Espectro de RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) del ácido <i>ent</i> -kaur-9(11),16-dieno-19-oico [I].....	92
Figura 21. Espectro de RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) del ácido <i>ent</i> -kaur-9(11),16-dieno-19-oico [I]	93
Figura 22. Espectro HMQC (CDCl ₃ , 75 MHz) del ácido <i>ent</i> -kaur-9(11),16-dieno-19-oico [I]	94
Figura 23. Espectro de masas (impacto electrónico) del éster metílico del ácido 9(11),16-dieno-19- <i>ent</i> -kaureno.....	96

Figura 24. Espectro Infrarrojo (KBr) del <i>ent</i> -kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II]	98
Figura 25. Espectro de RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) del <i>ent</i> -Kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II].....	99
Figura 26. Espectro de RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) del <i>ent</i> -Kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II].....	100
Figura 27. Espectro HMQC (CDCl ₃) del <i>ent</i> -Kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II].....	101
Figura 28. Espectro de Masas (impacto electrónico) del <i>ent</i> -Kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II].....	103
Figura 29. Espectro Infrarrojo (KBr) del 9(11),16-dieno-19-(4-metoxibenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [III].....	105
Figura 30. Espectro de RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(4-metoxibenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [III].....	106
Figura 31. Espectro de RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(4-metoxibenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [III].....	107
Figura 32. Correlación del espectro HMBC (CDCl ₃ , 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(4-metoxibenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [III].....	108
Figura 33. Espectro de HMBC (CDCl ₃ , 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(4-metoxibenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [III].....	109
Figura 34. Espectro Infrarrojo (KBr) del 9(11),16-dieno-19-(2-metoxibenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [IV].....	111
Figura 35. Espectro de RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(2-metoxibenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [IV].....	112
Figura 36. Espectro de RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(2-metoxibenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [IV].....	113
Figura 37. Correlación del espectro HMBC (CDCl ₃ , 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(2-metoxibenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [IV].....	114
Figura 38. Espectro de HMBC (CDCl ₃ , 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(2-metoxibenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [IV].....	115
Figura 39. Espectro Infrarrojo (KBr) del 9(11),16-dieno-19-(4-trifluorometilbenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [V].....	117
Figura 40. Espectro de RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(4-trifluorometilbenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [V].....	118
Figura 41. Espectro de RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(4-trifluorometilbenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [V].....	119

Figura 42. Correlación del espectro HMBC (CDCl ₃ , 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(4-trifluoro metilbenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [V].....	120
Figura 43. Espectro de HMBC (CDCl ₃ , 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(4-trifluorometilbenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [V].....	121
Figura 44. Espectro Infrarrojo (KBr) del 9(11),16-dieno-19-(2,3-dimetoxibenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [VI].....	123
Figura 45. Espectro de RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(2,3-dimetoxibenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [VI].....	124
Figura 46. Espectro de RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(2,3-dimetoxibenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [VI].....	125
Figura 47. Correlación del espectro HMBC (CDCl ₃ , 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(2,3-dimetoxi benzoil)- <i>ent</i> -kaureno [VI].....	126
Figura 48. Espectro de HMBC (CDCl ₃ , 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(2,3-dimetoxibenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [VI].....	127
Figura 49. Espectro Infrarrojo (KBr) del 9(11),16-dieno-19-(2,4-dimetoxibenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [VII].....	129
Figura 50. Espectro de RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(2,4-dimetoxibenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [VII].....	130
Figura 51. Espectro de RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(2,4-dimetoxibenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [VII].....	131
Figura 52. Correlación del espectro HMBC (CDCl ₃ , 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(2,4-dimetoxi benzoil)- <i>ent</i> -kaureno [VII].....	132
Figura 53. Espectro de HMBC (CDCl ₃ , 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(2,4-dimetoxibenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [VII].....	133
Figura 54. Espectro Infrarrojo (KBr) del 9(11),16-dieno-19-(2,5-dimetoxibenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [VIII].....	135
Figura 55. Espectro de RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) del del 9(11),16-dieno-19-(2,5-dimetoxibenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [VIII].....	136
Figura 56. Espectro de RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) del del 9(11),16-dieno-19-(2,5-dimetoxibenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [VIII].....	137
Figura 57. Correlación del espectro HMBC (CDCl ₃ , 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(2,5-dimetoxi benzoil)- <i>ent</i> -kaureno [VIII].....	138
Figura 58. Espectro de HMBC (CDCl ₃ , 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(2,5-dimetoxibenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [VIII].....	139

Figura 59. Espectro Infrarrojo (KBr) del 9(11),16-dieno-19-(3,4,5-trimetoxibenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [IX].....	141
Figura 60. Espectro de RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(3,4,5-trimetoxibenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [IX].....	142
Figura 61. Espectro de RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(3,4,5-trimetoxibenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [IX].....	143
Figura 62. Correlación del espectro HMBC (CDCl ₃ , 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(3,4,5-trime toxibenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [IX].....	144
Figura 63. Espectro de HMBC (CDCl ₃ , 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(3,4,5-trimetoxibenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [IX].....	145
Figura 64. Espectro Infrarrojo (KBr) del 9(11),16-dieno-19-(2,4,5-trimetoxibenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [X].....	147
Figura 65. Espectro de RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(2,4,5-trimetoxibenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [X].....	148
Figura 66. Espectro de RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(2,4,5-trimetoxibenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [X].....	149
Figura 67. Correlación del espectro HMBC (CDCl ₃ , 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(2,4,5-trime toxibenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [X].....	150
Figura 68. Espectro de HMBC (CDCl ₃ , 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(2,4,5-trimetoxibenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [X].....	151
Figura 69. Espectro Infrarrojo (KBr) del 9(11),16-dieno-19-(3,5-dimetilbenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [XI].....	153
Figura 70. Espectro de RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(3,5-dimetilbenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [XI].....	154
Figura 71. Espectro de RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(3,5-dimetilbenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [XI].....	155
Figura 72. Correlación del espectro HMBC (CDCl ₃ , 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(3,5-dimetil benzoil)- <i>ent</i> -kaureno [XI].....	156
Figura 73. Espectro de HMBC (CDCl ₃ , 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(3,5-dimetil benzoil)- <i>ent</i> -kaureno [XI].....	157
Figura 74. Espectro Infrarrojo (KBr) del 9(11),16-dieno-19-(5-metil-2-nitrobenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [XII].....	159
Figura 75. Espectro de RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(5-metil-2-nitrobenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [XII].....	160

Figura 76. Espectro de RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(5-metil-2-nitrobenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [XII].....	161
Figura 77. Correlación del espectro HMBC (CDCl ₃ , 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(5-metil-2-nitrobenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [XII].....	162
Figura 78. Espectro de HMBC (CDCl ₃ , 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(5-metil-2-nitrobenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [XII].....	163
Figura 79. Espectro Infrarrojo (KBr) del 9(11),16-dieno-18-[2-(4-isobutilfenil)propil]- <i>ent</i> -kaureno [XIII].....	165
Figura 80. Espectro de RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) del 9(11),16-dieno-18-[2-(4-isobutilfenil)propil]- <i>ent</i> -kaureno [XIII].....	166
Figura 81. Espectro de RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) del 9(11),16-dieno-18-[2-(4-isobutilfenil)propil]- <i>ent</i> -kaureno [XIII].....	167
Figura 82. Espectro de HMBC (CDCl ₃ , 75 MHz) del 9(11),16-dieno-18-[2-(4-isobutilfenil)propil]- <i>ent</i> -kaureno [XIII].....	169
Figura 83. Espectro Infrarrojo (KBr) del 9(11),16-dieno-19-[2-(3-benzofenil)propil]- <i>ent</i> -kaureno [XIV].....	171
Figura 84. Espectro de RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) del 9(11),16-dieno-19-[2-(3-benzofenil)propil]- <i>ent</i> -kaureno [XIV].....	172
Figura 85. Espectro de RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-[2-(3-benzofenil)propil]- <i>ent</i> -kaureno [XIV].....	173
Figura 86. Correlación del espectro HMBC (CDCl ₃ , 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-[2-(3-benzofenil)propil]- <i>ent</i> -kaureno [XIV].....	175
Figura 87. Espectro de HMBC (CDCl ₃ , 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-[2-(3-benzofenil)propil]- <i>ent</i> -kaureno [XIV].....	176
Figura 88. Espectro Infrarrojo (KBr) del 9(11),16-dieno-19-(2-metil-5-nitro-1 <i>H</i> -imidazol-1-il)- <i>ent</i> -kaureno [XVI].....	178
Figura 89. Espectro de RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(2-metil-5-nitro-1 <i>H</i> -imidazol-1-il)- <i>ent</i> -kaureno [XVI].....	179
Figura 90. Espectro de RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(2-metil-5-nitro-1 <i>H</i> -imidazol-1-il)- <i>ent</i> -kaureno [XVI].....	180
Figura 91. Espectro de HMQC (CDCl ₃) del 9(11),16-dieno-19-(2-metil-5-nitro-1 <i>H</i> -imidazol-1-il)- <i>ent</i> -kaureno [XVI].....	182
Figura 92. Correlación del espectro HMBC (CDCl ₃ , 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(2-metil-5-nitro-1 <i>H</i> -imidazol-1-il)- <i>ent</i> -kaureno [XVI].....	183

Figura 93. Espectro de HMBC (CDCl ₃ , 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(2-metil-5-nitro-1 <i>H</i> -imidazol-1-il)- <i>ent</i> -kaureno [XVI].....	184
Figura 94. Efecto del ácido grandiflorénico [I] y ácido kaurénico [41] sobre el edema auricular inducido por xilol.....	190

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fuentes naturales del ácido grandiflorénico.....	22
Tabla 2. Monoaminas y diaminas empleadas para formar las monoamidas del esquema 26.....	40
Tabla 3. Ácidos carboxílicos que reaccionan con el <i>ent</i> -kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II] para formar los ésteres derivados [III-XIV].....	76
Tabla 4. Bandas de absorción en el espectro IR del ácido <i>ent</i> -kaur-9(11),16-dieno-19-oico [I].....	91
Tabla 5. Datos de RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 300 MHz y 75 MHz) del ácido <i>ent</i> -kaur-9(11),16-dieno-19-oico [I].....	95
Tabla 6. Fragmentos <i>m/z</i> más notables en el espectro de masas del éster metílico del ácido 9(11),16-dieno- <i>ent</i> -kaureno	96
Tabla 7. Bandas de absorción en el espectro IR del <i>ent</i> -Kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II]... ..	98
Tabla 8. Datos de RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 300 MHz y 75 MHz) del <i>ent</i> -Kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II].....	102
Tabla 9. Fragmentos <i>m/z</i> más notables en el espectro de masas del <i>ent</i> -Kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II].....	103
Tabla 10. Bandas de absorción en el espectro IR del 9(11),16-dieno-19-(4-metilbenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [III].....	105
Tabla 11. Desplazamientos Químicos (δ) en los Espectros de RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 300 y 75 MHz), del fragmento que corresponde al 4-metoxibenzoato del éster [III].....	108
Tabla 12. Bandas de absorción en el espectro IR del 9(11),16-dieno-19-(2-metoxibenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [IV].....	111
Tabla 13. Desplazamientos Químicos (δ) en los Espectros de RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 300 MHz y 75 MHz), del fragmento que corresponde al del 2-metoxibenzoato del éster [IV].....	113
Tabla 14. Bandas de absorción en el espectro IR del 9(11),16-dieno-19-(9-trifluorometilbenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [V].....	117
Tabla 15. Desplazamientos Químicos (δ) en los Espectros de RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 300 MHz y 75 MHz), del fragmento que corresponde al 4-trifluorobenzoato del éster [V].....	119
Tabla 16. Bandas de absorción en el espectro IR del 9(11),16-dieno-19-(2,3-dimetoxibenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [VI].....	123
Tabla 17. Desplazamientos Químicos (δ) en los Espectros de RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 300 MHz y 75 MHz), del fragmento que corresponde al 2,3-dimetoxibenzoato del éster [VI].....	125
Tabla 18. Bandas de absorción en el espectro IR del 9(11),16-dieno-19-(2,4-dimetoxibenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [VII].....	129
Tabla 19. Desplazamientos Químicos (δ) en los Espectros de RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 300 MHz y 75 MHz), del fragmento que corresponde al 2,5-metoxibenzoato del éster [VII].....	132
Tabla 20. Bandas de absorción en el espectro IR del 9(11),16-dieno-19-(2,5-dimetoxibenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [VIII].....	135
Tabla 21. Desplazamientos Químicos (δ) en los Espectros de RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 300 MHz y 75 MHz), del fragmento que corresponde al 2,5-dimetoxibenzoato del éster [VIII].....	138
Tabla 22. Bandas de absorción en el espectro IR del 9(11),16-dieno-19-(3,4,5-trimetoxibenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [IX].....	141

Tabla 23. Desplazamientos Químicos (δ) en los Espectros de RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 300 y 75 MHz), del fragmento que corresponde al 3,4,5-trimetoxibenzoato del éster [IX].....	144
Tabla 24. Bandas de absorción en el espectro IR del 9(11),16-dieno-19-(4,5-trimetoxibenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [X].....	147
Tabla 25. Desplazamientos Químicos (δ) en los Espectros de RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 300 MHz y 75 MHz), del fragmento que corresponde al 2,4,5-dimetilbenzoato del éster [X].....	150
Tabla 26. Bandas de absorción en el espectro IR del 9(11),16-dieno-19-(3,5-dimetilbenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [XI].....	153
Tabla 27. Desplazamientos Químicos (δ) en los Espectros de RMN- ¹ H y MN- ¹³ C (CDCl ₃ , 300 y 75 MHz), del fragmento que corresponde al 3,5 dimetilbenzoato del éster [XI].....	156
Tabla 28. Bandas de absorción en el espectro IR del 9(11),16-dieno-19-(5-metil-2-nitrobenzoil)- <i>ent</i> -kaureno [XII].....	159
Tabla 29. Desplazamientos Químicos (δ) en los Espectros de RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 300 MHz y 75 MHz), del fragmento que corresponde al (5-metil-2-nitrobenzoil) del éster [XII].....	162
Tabla 30. Bandas de absorción en el espectro IR del 9(11),16-dieno-18-[2-(4-isobutilfenil)propil]- <i>ent</i> -kaureno [XIII].....	165
Tabla 31. Desplazamientos Químicos (δ) en los Espectros de RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 300 MHz y 75 MHz), del fragmento que corresponde al 2-(4-isobutilfenil)propanoato del éster [XII].....	168
Tabla 32. Bandas de absorción en el espectro IR del 9(11),16-dieno-19-[2-(3-benzofenil)propil]- <i>ent</i> -kaureno [XIV].....	171
Tabla 33. Desplazamientos Químicos (δ) en los Espectros de RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 300 MHz y 75 MHz), del fragmento que corresponde al 2-(3-benzoilfenil)propanoato del éster [XIV].....	174
Tabla 34. Bandas de absorción en el espectro IR del 9(11),16-dieno-19-(2-metil-5-nitro-1 <i>H</i> -imidazol-1-il)etil- <i>ent</i> -kaureno [XVI].....	178
Tabla 35. Desplazamientos Químicos (δ) en los Espectros de RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 300 y 75 MHz), del fragmento que corresponde al (2-metil-5-nitro-1 <i>H</i> -imidazol-1-il)etil del éster [XVI].....	181
Tabla 36. Evaluación <i>in vivo</i> de la actividad antiinflamatoria <i>por el</i> método edema auricular inducido por xilol. Grupos control.....	188
Tabla 37. Evaluación <i>in vivo</i> de la actividad antiinflamatoria del ácido grandiflorénico y derivados hemisintéticos por el método edema auricular inducido por xilol a dosis de 16 mg/kg.....	193
Tabla 38. Evaluación <i>in vivo</i> de la actividad antiinflamatoria del ácido grandiflorénico y derivados hemisintéticos por el método edema auricular inducido por xilol a dosis de 32 mg/kg.....	194
Tabla 39. Evaluación <i>in vivo</i> de la actividad antiinflamatoria del ácido grandiflorénico y derivados hemisintéticos por el método edema auricular inducido por xilol a dosis de 64 mg/kg.....	195

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Pasos para la obtención de principios activos a partir de plantas.....	7
Esquema 2. Biosíntesis general de metabolitos secundarios.....	9
Esquema 3. Biosíntesis de terpenos en plantas.....	11
Esquema 4. Formación del ácido mevalónico.....	14
Esquema 5. Transformación del ácido mevalónico a IPPF: isopentenilpirofosfato y DMAPP: dimetilalilpirofosfato. –OPP: grupo pirofosfato.....	15
Esquema 6. Formación del Geraniol.....	15
Esquema 7. Formación del Farnesol.....	16
Esquema 8. Ciclación del GGPP bajo catálisis ácida: diterpenos de la serie “normal” y “enantio”.....	25
Esquema 9. Biosíntesis del ácido grandiflorénico.....	26
Esquema 10. Mecanismo de epoxidación de alquenos con ácidos percarboxílicos.....	27
Esquema 11. Epóxidos formados a partir del ácido grandiflorénico.....	28
Esquema 12. Mecanismo de hidroxilación de alquenos con tetraóxido de osmio (OsO ₄)...	28
Esquema 13. Hidroxilación con OsO ₄ del éster metílico del 9(11),16-dien- <i>ent</i> -kaureno.....	29
Esquema 14. Oxidación del <i>ent</i> -kaur-9(11),16-dien-19-ato de etilo con NaIO ₄ y OsO ₄	30
Esquema 15. Hidroxilación de alquenos con SeO ₂	30
Esquema 16. Mecanismo de oxidación alílica de alquenos con dióxido de selenio (SeO ₂)...	31
Esquema 17. Hidroxilación alílica del éster metílico del 9(11)-16-dien- <i>ent</i> -kaureno con SeO ₂	32
Esquema 18. Mecanismo para la reacción de ozonólisis.....	33
Esquema 19. Reacción de ozonólisis para el ácido grandiflorénico.....	33
Esquema 20. Hidrogenación catalítica del ácido grandiflorénico.....	35
Esquema 21. Reducción del ácido grandiflorénico con LiAlH ₄	37
Esquema 22. Mecanismo general de esterificación de Fischer.....	38
Esquema 23. Reacción de esterificación con diazometano.....	38
Esquema 24. Mecanismo general de esterificación con diazometano.....	38
Esquema 25. Ésteres formados a partir del ácido grandiflorénico.....	39

Esquema 26. Diterpenos kaurenos monoamidas sintetizados a partir del ácido grandiflorénico Ph ₃ P: trifenilfosfina; CCl ₄ : tetracloruro de carbono.....	40
Esquema 27. Biotransformación del ácido grandiflorénico por <i>F. graminearum</i>	41
Esquema 28. Biotransformación del ácido <i>ent</i> -15 α -hidroxi-kaur-9(11),16-dieno-19-oico por el hongo <i>Fusarium proliferatum</i>	49
Esquema 29. Esterificación de Steglich.....	58
Esquema 30. Mecanismo de esterificación de Steglich.....	59
Esquema 31. Síntesis del <i>ent</i> -kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II].....	75
Esquema 32. Acoplamiento del <i>ent</i> -kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II] con ácidos carboxílicos.	75
Esquema 33. Síntesis del <i>ent</i> -kaur-9(11),16-dien-19-(2-metil-5-nitro-1 <i>H</i> -imidazol-1-il)etil- <i>ent</i> -kaureno [XVI].....	77
Esquema 34. Síntesis del 2-(2-metil-5-nitro-1 <i>H</i> -imidazol-1-il) etilmetanosulfonato [XV]...	78
Esquema 35. Preparación de suspensión del inóculo: Método microdilución.....	82
Esquema 36. Método de edema auricular inducido por xilol.....	88

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Grado del edema en oreja (ΔE). Peso de la oreja derecha (OD); Peso de oreja izquierda (OI).....	87
Ecuación 2. Porcentaje de inflamación (%I). Grado de edema oreja del grupo ensayado (ΔE_{ge}); Grado de edema oreja del grupo control (ΔE_{gc}).....	87
Ecuación 3. Porcentaje de inhibición de inflamación (% Inh).....	87

RESUME

Depuis que l'homme existe, il utilise la Nature pour se nourrir et pour se soigner. Il a ainsi progressivement appris à connaître les plantes sans lesquelles il n'aurait pas survécu, notamment les plantes médicinales.

L'utilisation de plantes à propriétés médicinales tient une place importante en Amérique latine en raison de la grande diversité des espèces végétales présentes. Les peuples primitifs ont su tirer profit de ces nombreuses ressources et ont acquis au fil du temps des informations sur les propriétés médicinales des plantes, parfois par nécessité et souvent par hasard. Une légende raconte qu'un soldat espagnol a découvert que la quinine présente dans *Cinchona* pouvait guérir des fièvres intermittentes : il semble qu'il ait bu dans une flaque où une branche de cet arbre était tombée et que, quand il s'est réveillé, sa fièvre avait disparu. Cette connaissance des plantes médicinales s'est accumulée et a été transmise oralement. Aujourd'hui, les méthodes modernes d'analyse permettent de vérifier les propriétés découvertes de manière empirique par les populations locales.

D'autre part, l'isolement et l'identification structurale de produits naturels issus de plantes ont permis le développement de réactions d'hémisynthèse visant la production de dérivés. La diosgénine, par exemple, est largement utilisée dans l'industrie pharmaceutique pour la synthèse de la plupart des hormones stéroïdiennes utilisées en médecine comme agents contraceptifs. Les structures des produits naturels fournissent aussi des lignes directrices pour la synthèse d'analogues, comme dans le cas de la cocaïne, molécule isolée de *Erythroxylon coca* qui a servi de modèle pour la production de la procaine et d'autres anesthésiques locaux. Il est donc très important d'isoler les principes actifs des plantes médicinales, de déterminer leur localisation dans

les différentes parties de la plante ou dans différents extraits, pour ensuite effectuer les tests biologiques appropriés.

Tous les organismes vivants synthétisent et utilisent des composés chimiques dont la fonction est essentielle et qui sont appelés métabolites primaires : c'est le cas des sucres, des acides aminés, des lipides et des nucléotides. Une autre série de composés plus spécifiques, appelés métabolites secondaires ou produits naturels, sont en général caractéristiques d'une espèce ou d'un nombre limité d'espèces apparentées et remplissent d'importantes fonctions de communication et de défense. Parmi les métabolites secondaires, différentes classes de composés peuvent être différenciées. Les plus nombreux sont constitués de terpènes ou de terpénoïdes que l'on peut trouver dans les plantes, les animaux, les insectes ou les micro-organismes.

Les terpènes représentent, parmi les produits naturels, l'une des classes de métabolites secondaires les plus larges en termes de nombre de composés et de diversité structurelle et fonctionnelle. C'est aussi l'une des classes les plus intéressantes du point de vue biologique et pharmacologique. Les terpènes sont dérivés biogénétiquement de l'acide mévalonique (cytoplasme) et du méthyl-érythritol (chloroplastes). Ils sont classés selon le nombre d'unités isoprène C5 qui composent leur structure : les hémiterpènes (C5, une unité isoprène), les monoterpènes (C10, deux unités isoprène), les sesquiterpènes (C15), les diterpènes (C20), les sesterpènes (C25), les triterpènes (C30), les tétraterpènes (C40) et les polyterpènes.

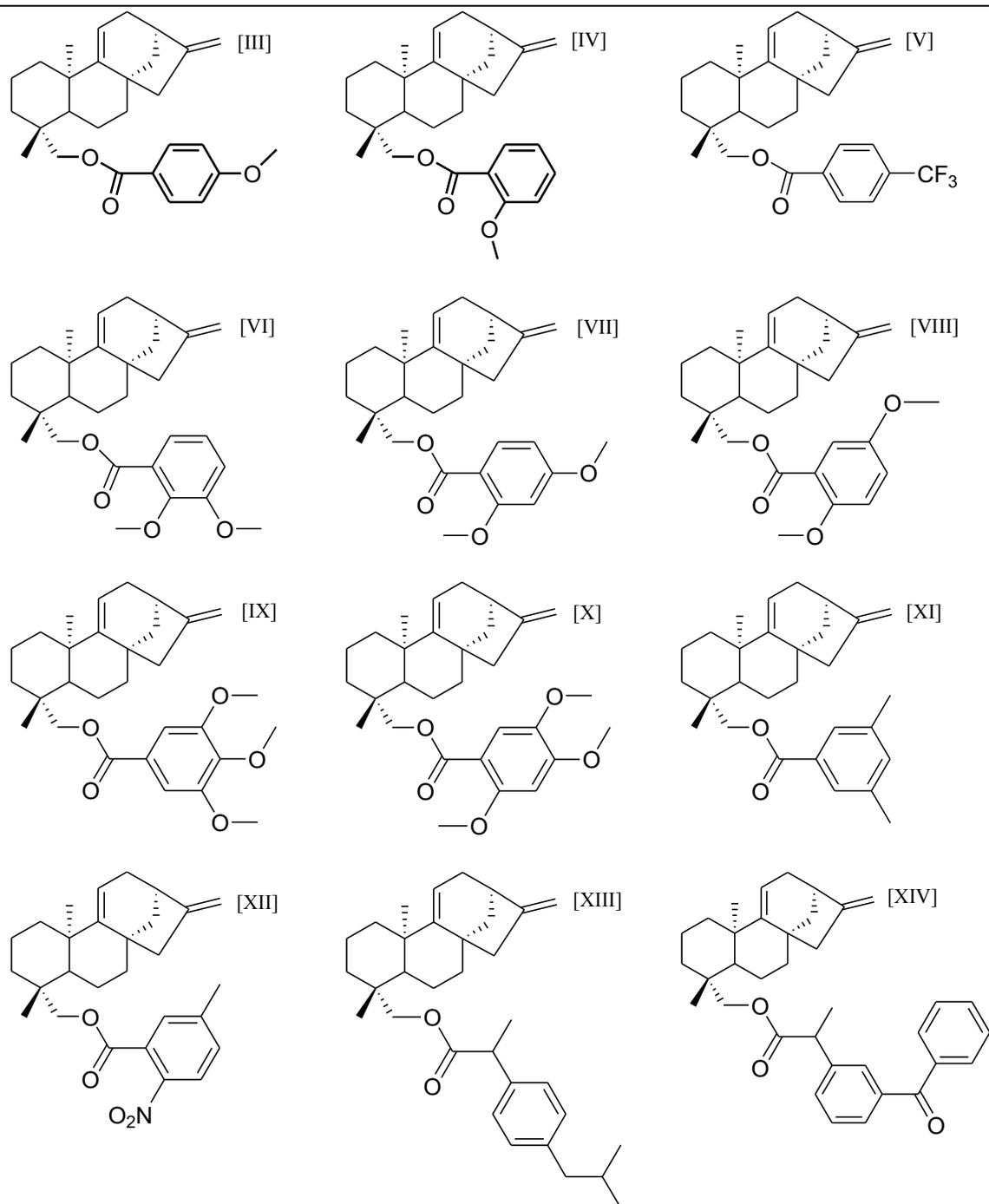
Le groupe des diterpènes figure, de par son abondance et sa variété structurelle, parmi les plus importants. Les diterpénoïdes sont par définition composés de 20 atomes de carbone et sont considérés comme des dérivés de

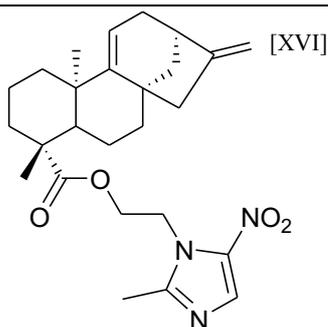
4 molécules d'isoprène. Cependant, des diterpénoïdes ayant plus de 20 atomes de carbone et certains moins de 20 atomes de carbone sont présents dans la Nature. Actuellement, de très nombreux squelettes diterpénoïdes sont connus pour leur activité antibactérienne, anti-inflammatoire, antifongique, anti-tumorale, antivirale et/ou antiparasitaire. Ces propriétés sont à l'origine d'un intérêt croissant pour ces composés comme en témoigne le grand nombre d'articles scientifiques parus ces dernières années se référant à leur isolement et à leur synthèse.

La synthèse est en effet une méthode alternative pour obtenir ces métabolites secondaires car ils sont souvent isolés dans la Nature en très faible quantité. La synthèse permet aussi une confirmation définitive des structures élucidées par des méthodes spectroscopiques, et souligne parfois la nécessité de revoir ces structures. L'hémisynthèse à partir de produits naturels donne accès à des dérivés qui peuvent également être actifs. Dans le cas des diterpènes, par exemple, l'hémisynthèse apporte des informations sur la réactivité des différents systèmes carbonés et sur la relation structure-activité des composés ; elle permet aussi d'effectuer des études structurales et offre la possibilité de poursuivre les études de biogenèse.

Dans ce contexte, l'acide grandiflorénique [I] naturel a été converti en *ent*-kaur-9(11),16-dien-19-ol [II], composé qui a ensuite été utilisé comme substrat pour la synthèse de douze (12) nouveaux dérivés obtenus par estérification dans les conditions de Steglich avec des acides benzoïques diversement substitués (obtention des composés III à XIV). Un composé supplémentaire a été préparé par couplage de l'acide grandiflorénique [I] avec le 2-(2-méthyl-5-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)éthyl méthanesulfonate [XV] (obtention du composé XVI).

Les treize (13) composés listés ci-après ont été soigneusement purifiés par chromatographie et complètement caractérisés par des techniques spectroscopiques (IR, MS, RMN 1D et 2D) en vue de leur évaluation biologique :





- [III] : 9(11),16-diéno-19-(4-méthoxybenzoyl)-*ent*-kaurène
- [IV] : 9(11),16-diéno-19-(2-méthoxybenzoyl)-*ent*-kaurène
- [V] : 9(11),16-diéno-19-(4-trifluorométhylbenzoyl)-*ent*-kaurène
- [VI] : 9(11),16-diéno-19-(2,3-diméthoxybenzoyl)-*ent*-kaurène
- [VII] : 9(11),16-diéno-19-(2,4-diméthoxybenzoyl)-*ent*-kaurène
- [VIII] : 9(11),16-diéno-19-(2,5-diméthoxybenzoyl)-*ent*-kaurène
- [IX] : 9(11),16-diéno-19-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)-*ent*-kaurène
- [X] : 9(11),16-diéno-19-(2,4,5-triméthoxybenzoyl)-*ent*-kaurène
- [XI] : 9(11),16-diéno-19-(2,3-diméthylbenzoyl)-*ent*-kaurène
- [XII] : 9(11),16-diéno-19-(5-méthyl-2-nitrobenzoyl)-*ent*-kaurène
- [XIII] : 9(11),16-diéno-18-[2-(4-isobutylphényl)propyl]-*ent*-kaurène
- [XIV] : 9(11),16-diéno-19-[2-(3-benzophényl)propyl]-*ent*-kaurène
- [XVI] : 9(11),16-diéno-19-(2-méthyl-5-nitro-1*H*-imidazol-1-yl)éthyl-*ent*-kaurène.

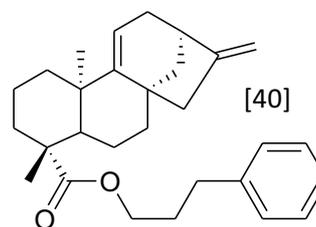
Le test d'activité antibactérienne a été réalisé par la méthode de microdilution en bouillon, avec la collaboration du Prof. Maria Eugenia Lucena, au Laboratoire de Biochimie de la Faculté de Pharmacie et de Bioanalyse de l'Universidad de Los Andes (ULA), selon la description faite par le NCCLS (2004). L'activité antifongique a été évaluée par la méthode de diffusion discale

décrite par le NCCLS (2004), avec la collaboration du Prof. Clara Díaz, dans le laboratoire de Mycologie du Dr. Corrada Capretti, Faculté de Pharmacie et Bioanalyse de l'Universidad de Los Andes (ULA).

L'activité antibactérienne de l'acide grandiflorénique [I], de l'*ent*-kaur-9 (11),16-dien-19-ol [II] et des treize (13) esters dérivés [III-XIV; XVI] a été évaluée sur les souches bactériennes Gram positives *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) et *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), et Gram négatives *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) et *Escherichia coli* (ATCC 25922). Les composés purs ont été testés à différentes concentrations (600 µg/mL, 300 µg/mL, 150 µg/mL et 75 µg/mL).

Tous les composés ont présenté une CMI et une CMB supérieure à 600 µg/mL contre chacune des bactéries testées. Comme les esters testés (III-XIV, XVI) sont de nouveaux composés, cette étude constitue le premier rapport d'activité antibactérienne de ces dérivés de l'acide grandiflorénique. Cependant, des recherches antérieures ont montré que l'acide grandiflorénique [I], testé selon la méthode de diffusion sur gélose, possède une activité modérée sur les bactéries Gram positif, spécifiquement *S. aureus* (CMI égale à 1600 µg/mL). La concentration recommandée pour tester les composés purs ne doit pas dépasser 0,1 mg/mL (100 µg/mL) et les composés les plus intéressants doivent posséder une activité antibactérienne inférieure à 10 µg/mL. Nos résultats sur le composé [I] sont comparables à ceux rapportés par Peña et ses collaborateurs en 2008 et 2009), avec une activité antibactérienne supérieure à 100 µg/mL. Les composés [I] et [II] ont également montré une activité antibactérienne similaire (CMI et CMB > 600 µg/mL), ce qui indique que la présence du groupe carboxyle (-COOH) ou hydroxyle (-OH) en position C-19 du noyau *ent*-kaurène

n'affecte pas l'activité antibactérienne. Cette observation est cohérente avec les travaux effectués par Carrillo en 2011, mais cet auteur rapporte également que l'ester *ent*-3'-phényl-kaur-9 (11),16-diène-19-carboxylate propyle [40] inhibe la croissance de *S. aureus* (10-50 µg/mL) et *E. faecalis* (50-100 µg/mL). Pour *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* et *E. coli*, une activité supérieure à 100 µg/mL a été observée, ce qui permet de déduire que la présence d'une chaîne aliphatique non substituée entre le carbonyle de l'ester et un cycle aromatique améliore nettement l'activité antibactérienne.



L'activité antifongique de l'acide grandiflorénique [I], de l'*ent*-kaur-9(11),16-dien-19-ol [II] et des treize (13) dérivés esters [III-XIV, XVI] a été évaluée contre *Candida albicans* (CDC 385) et *Candida krusei* (ATCC 6258). Les composés purs ont été testés à 600 µg/mL, 300 µg/mL, 150 µg/mL et 75 µg/mL par la méthode de diffusion sur disque. En 2011, Carrillo avait déjà évalué l'activité antifongique des composés [I] et [II], ainsi que de l'ester *ent*-3'-phényl-kaur-9(11),16-diène-19-carboxylate de propyle [40] ; ce dernier était le seul composé qui présentait une activité antifongique à une concentration > 100 µg/mL sur *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. nivariensis* et *C. parapsilosis*. Les esters testés [III-XIV] et [XVI] étant de nouveaux composés, il est important de souligner que cette étude constitue le premier rapport d'activité antifongique de ces dérivés. En comparant nos résultats avec ceux de Carrillo, nous constatons que la présence du groupe carboxyle (-COOH) ou du groupe hydroxyle (-OH) en position C-19 n'influence pas l'activité antifongique car les composés [I] et [II] présentent une activité similaire (supérieure à 600 µg/mL). La position du groupe carbonyle (-CO-) de l'ester sur le carbone C-19 (dérivés

[III] à [XIV]) ou sur le carbone C-1' (composé [XVI]) ne semble pas non plus influencer l'activité antifongique. De plus, dans le cas du composé [XVI], la présence du motif nitro-imidazole a un effet défavorable sur l'activité, notamment lorsqu'on la comparaison est faite avec l'*ent*-3'-phényl-kaur-9(11),16-diène-19-carboxylate [40] testé par Carrillo.

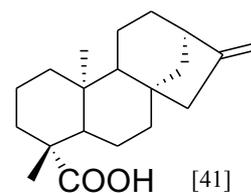
L'activité anti-inflammatoire a été évaluée *in vivo* par la méthode de l'œdème de l'oreille induit par le xylol. L'acide grandiflorénique [I] et les treize (13) esters dérivés [III-XIV, XVI] ont tous été testés à des doses de 64 mg/kg, 32 mg/kg et 16 mg/kg. Seul le composé [II] n'a pas été évalué, en raison d'une trop faible quantité disponible. L'administration de 20 µL de xylol dans l'oreille droite des souris a provoqué un œdème de 4,31 mg pour le groupe témoin traité avec une solution physiologique. Les agents anti-inflammatoires utilisés comme témoins positifs ont induit une diminution de l'œdème provoquée par le xylol : l'inflammation est de 0,80 mg avec du kétoprofène, de 0,74 mg avec du diclofénac sodique et de 1,42 mg avec de la dexaméthasone. Ces résultats sont significativement inférieurs à ceux observés dans le groupe témoin négatif (solution physiologique témoin).

L'inflammation aiguë générée par le xylol est inhibée par les médicaments anti-inflammatoires qui bloquent la phospholipase A2 et, dans une moindre mesure, par les AINS (anti-inflammatoires non stéroïdien), mais les résultats démontrent que l'inflammation est réduite (inhibition de l'œdème) de 81,44% avec le kétoprofène, de 82,83% avec le diclofénac sodique et de 67,05% avec la dexaméthasone. Ceci montre que la méthode de l'œdème de l'oreille induit par le xylol peut être utilisée pour étudier les composés stéroïdiens et non stéroïdiens.

En 2011, Gonzalez et ses collaborateurs ont considéré qu'une inhibition de l'œdème de 35% à 65% correspond à un effet anti-inflammatoire modéré, et qu'une valeur d'inhibition supérieure à 65% décrit un bon effet anti-inflammatoire. A la dose de 16 mg/kg, seul le composé [XIII] a montré un bon effet anti-inflammatoire (77,31%, Tableau 37), sachant que son activité demeure importante aux doses de 32 mg/kg (86,39%, Tableau 38) et de 64 mg/kg (88,33%, Tableau 39). De tous les composés évalués, c'est celui qui présente la plus forte activité anti-inflammatoire. Le composé [XIV] a également montré une activité prometteuse aux doses de 32 mg/kg (76,01%, Tableau 38) et de 64 mg/kg (77,31%, Tableau 39); cependant, à 16 mg/kg, son effet (62,40%, tableau 37) ne correspond plus qu'à une activité anti-inflammatoire modérée. Fait important, l'activité anti-inflammatoire des composés [XIII] et [XIV] ne présentent pas un effet dose-dépendant aux doses testées.

Nos résultats montrent qu'aux doses de 32 mg/kg (Tableau 38) et 64 mg/kg (Tableau 39), l'acide grandiflorénique [I] (32 mg/kg: 65,74%; 64 mg/kg: 69,85 %) et son dérivé hémisynthétique [VIII] (32 mg/kg: 76,01%; 64 mg/kg: 78,93%) présentent tous les deux un bon effet anti-inflammatoire dose-indépendant. D'autres composés testés ont présenté un effet modéré à toutes les doses étudiées à l'exception des composés [VI], [IX], [XI] et [XVI], pour lesquels une activité anti-inflammatoire inférieure à 35% a été mesurée à des doses de 16 mg/kg. Il est important de noter que l'analyse statistique montre que les composés hémisynthétiques [III-XIV; XVI], testés à des doses de 16 mg/kg (Tableau 37), 32 mg/kg (Tableau 38) et 64 mg/kg (Tableau 39), induisent une diminution de l'œdème significativement différente du groupe témoin négatif (Tween 80 témoin) ($p < 0,05$).

Pour vérifier l'importance de la double liaison endocyclique (C-9/C-11) dans l'activité anti-inflammatoire des dérivés d'hémisynthèse de l'acide grandiflorénique [I], on a également évalué l'effet anti-inflammatoire de l'acide



kaurénique [41] qui, à la différence de [I], ne présente pas cette double liaison endocyclique en position C-9. L'acide grandiflorénique [I] s'est révélé posséder un plus grand effet anti-inflammatoire (16 mg/kg : 60,13% ; 32 mg/kg : 65,74 ; 64 mg/kg : 69,85%) que l'acide kaurénique (16 mg/kg : 42,30% ; 32 mg/kg : 55,26% ; 64 mg/kg : 58,81%) à toutes les doses étudiées. Ces résultats sont en accord avec ceux décrits par Hueso et ses collaborateurs en 2011, qui ont souligné l'importance des deux doubles liaisons (C-9/C-11 ; C-16/C-17) pour l'activité anti-inflammatoire *in vitro* d'une série de dérivés *ent*-kaurènes.

D'après ces résultats, la relation structure-activité (RSA) de l'effet anti-inflammatoire de l'acide grandiflorénique [I] et de ses dérivés hémisynthétiques [II, III-XIV, XVI] fait apparaître les points suivants :

1- L'activité anti-inflammatoire est maintenue lorsque le groupe carboxyle (-COOH) de l'acide grandiflorénique [I] est estérifié. Bien qu'à des doses de 64 et 32 mg/kg, le pourcentage d'inhibition de l'inflammation dû au composé [XVI] ait tendance à diminuer par comparaison avec [I], la différence entre ces pourcentages n'est pas statistiquement significative.

2- L'estérification de l'*ent*-kaur-9(11),16-diène-19-ol [II] conduit à une augmentation de l'effet anti-inflammatoire. Tous les esters dérivés du composé [II] induisent une diminution significative de l'œdème par rapport au groupe témoin négatif ($p < 0,05$).

- 3- L'activation du cycle aromatique des benzoates par des substituants méthoxy (-OCH₃) a pour effet d'augmenter l'activité anti-inflammatoire. C'est par exemple le cas avec un groupe méthoxy en position *para*, ou bien avec deux groupes méthoxy sur les positions 2,5, ou encore avec trois groupes méthoxy en 2,4,5.
- 4- Les composés dont le noyau benzénique possède deux groupes activateurs (-OCH₃, -CH₃) sur les positions 2,5 et 3,5 augmentent l'activité anti-inflammatoire.

Il est important de rappeler qu'aucun précédent n'a été trouvé dans la littérature sur les modèles d'inflammation *in vivo* liée à l'acide grandiflorénique [I] ou à l'un des dérivés hémisynthétiques [III-XIV, XVI] préparés au cours de ces travaux de thèse.

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

Desde que el hombre existe, recurría a la naturaleza en busca de alimento y de su salud. Por medio de aciertos y errores aprendió a conocer las plantas que lo curaban, sin los recursos que le ofreció la naturaleza el hombre no hubiera sobrevivido (Hernández y Gally., 1981). Las plantas medicinales han provisto diferentes materiales, alimentos y curas a través de los años a la raza humana (Cáceres *et al.*, 1987).

El empleo de plantas con propiedades medicinales tiene gran importancia en América Latina, debido a la diversidad de especies vegetales presentes en su ecosistema, incrementando el número de recursos disponibles en los pueblos primitivos que han adquirido información sobre las propiedades medicinales de las plantas, en un principio por casualidad, (por ejemplo, una leyenda cuenta que un soldado español descubrió por accidente que la quinina componente principal de la Cinchona, podía curar las fiebres intermitentes: parece ser que bebió de un charco donde había caído una rama de este árbol y que, al despertarse, se le había curado la fiebre) y luego por necesidad. Estos conocimientos se han acumulado y transmitido en forma oral hasta nuestros tiempos (Zamora-Martínez y De Pascual., 1992; Akerele., 1993). Hoy en día se ha concretado a aplicar métodos modernos de análisis, comprobando las propiedades que los indígenas encontraron de un modo empírico.

Por otro lado, el aislamiento e identificación estructural de compuestos obtenidos de plantas, han dado lugar al diseño de reacciones para producir derivados hemisintéticos; por ejemplo, la diosgenina ampliamente usada en la industria farmacéutica para la síntesis de la mayoría de las hormonas esteroideas usadas en la medicina como anticonceptivos (Maldonado *et al.*, 2012) o dar pautas para la síntesis de compuestos similares como el caso de la cocaína, aislada del *Erythroxylon coca* que sirvió como compuesto modelo para la producción de procaína y otros anestésicos locales (Avendaño., 2001). Es entonces de gran importancia aislar los principios activos de las plantas, y su localización en las diferentes partes de las mismas, o en los extractos, para posteriormente realizar ensayos biológicos adecuados (Del Campo., 2014).

Todos los organismos vivos sintetizan y utilizan compuestos químicos comunes a todos ellos cuya función es esencial, se trata de azúcares, aminoácidos, lípidos, nucleótidos, llamados metabolitos primarios, pero además de éstos muchos producen

otra serie de compuestos más específicos conocidos como metabolitos secundarios o productos naturales, generalmente característicos de una especie o un número limitado de especies relacionadas, y que desempeñan funciones importantes de comunicación y defensa. Entre los metabolitos secundarios se pueden diferenciar distintas clases de compuestos. La más numerosa está constituida por los terpenos o terpenoides, que pueden encontrarse tanto en plantas como en animales, insectos o microorganismos (Brizuela *et al.*, 1998; Ordaz *et al.*, 2009; García y Pérez-Urria., 2009; Bahmani *et al.*, 2014).

Los terpenos representan, entre los productos naturales, unas de las clases de metabolitos secundarios más amplia en lo que a número de componentes se refiere, la más variada en diversidad estructural y funcional, una de las más interesantes desde el punto de vista biológico y farmacológico. Principalmente los terpenos derivan biogénicamente del ácido mevalónico (en el citoplasma) y del metil-eritritol (cloro plastos), cumpliendo en su mayoría la regla del isopreno, y se clasifican por el número de unidades C_5 que integran su estructura como: hemiterpenos (C_5 , una unidad de isopreno), monoterpenos (C_{10} , dos unidades de isopreno), sesquiterpenos (C_{15} , tres unidades de isopreno), diterpenos (C_{20} , cuatro unidades de isopreno), sesterpenos (C_{25}), triterpenos (C_{30} , seis unidades de isopreno), tetraterpenos (C_{40} , ocho unidades de isopreno) y politerpenos (García y Pérez-Urria., 2009; Xiao y Zhong., 2016).

El grupo de los diterpenos es por su abundancia y variedad estructural uno de los más importantes. Los diterpenoides por definición son compuestos de 20 átomos de carbono y se les considera derivados de 4 moléculas de isopreno, sin embargo en la naturaleza se consiguen diterpenoides que poseen más de 20 átomos de carbono y algunos menos de 20 carbonos (Valencia *et al.*, 1986). En la actualidad se conoce una gran cantidad de esqueletos de diterpenoides con actividad antibacteriana, antiinflamatoria, antifúngica, antitumoral, antiviral, antiparásitaria (Bruno *et al.*, 2002; Takahashi *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2006; Maurya *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015., Ni *et al.*, 2015), lo cual ha incrementado el interés por estos compuestos como demuestra el gran número de artículos científicos referidos a su aislamiento y síntesis que han aparecido durante los últimos años.

En conexión con lo antes expuesto, la síntesis constituye un método alternativo para su obtención, ya que se encuentran en la naturaleza en cantidades muy pequeñas, y permite confirmar definitivamente las estructuras elucidadas por métodos espectroscópicos o bien poner de manifiesto la necesidad de revisar dichas estructuras. Además por hemisíntesis a partir de los diterpenos se han obtenido compuestos relacionados que también pueden ser activos, permitiendo profundizar en los conocimientos de síntesis, aportando datos sobre la reactividad de los distintos sistemas carbonados y sobre la relación estructura-actividad permitiendo, por tanto, realizar estudios estructurales y la posibilidad de realizar posteriores estudios de biogénesis (Molina., 2005). Con base a lo descrito anteriormente a partir del ácido grandiflorénico [I] se obtuvo el *ent*-kaur-9(11),16-dien-19-ol [II], utilizado como material de partida para la síntesis de trece (13) nuevos ésteres derivados 9(11),16-dieno-19-(4-metoxibenzoil)-*ent*-kaureno [III]; 9(11),16-dieno-19-(2-metoxibenzoil)-*ent*-kaureno [IV]; 9(11),16-dieno-19-(4-trifluorometilbenzoil)-*ent*-kaureno [V]; 9(11),16-dieno-19-(2,3-dimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [VI]; 9(11),16-dieno-19-(2,4-dimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [VII]; 9(11),16-dieno-19-(2,5-dimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [VIII]; 9(11),16-dieno-19-(3,4,5-trimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [IX]; 9(11),16-dieno-19-(2,4,5-trimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [X]; 9(11),16-dieno-19-(2,3-dimetilbenzoil)-*ent*-kaureno [XI]; 9(11),16-dieno-19-(5-metil-2-nitrobenzoil)-*ent*-kaureno [XII]; 9(11),16-dieno-18-[2-(4-isobutilfenil)propil]-*ent*-kaureno [XIII]; 9(11),16-dieno-19-[2-(3-benzofenil)propil]-*ent*-kaureno [XIV], obtenidos por el método de esterificación de Steglich, excepto el 9(11),16-dieno-19-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil-*ent*-kaureno [XVI] que fue preparado a partir del acoplamiento del compuesto [I] con el 2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil metanosulfonato [XV], posteriormente fue evaluada su actividad antibacteriana, antifúngica, y antiinflamatoria.

II. ANTECEDENTES

II. ANTECEDENTES

II.1 PLANTAS MEDICINALES

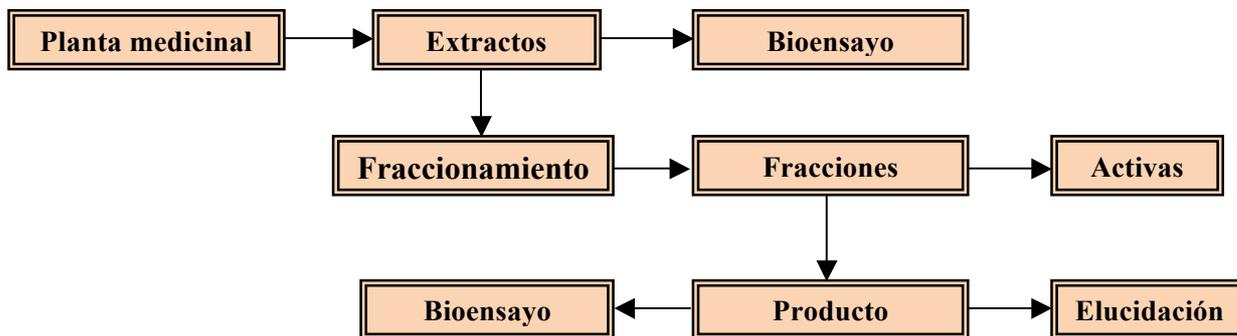
II.1.1 DEFINICIÓN

Las plantas constituyen un recurso valioso en los sistemas de salud de los países en desarrollo. Aunque no existen datos precisos para evaluar la extensión del uso global de plantas medicinales, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que más del 80 % de la población mundial utiliza, rutinariamente, la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud y que gran parte de los tratamientos tradicionales implica el uso de extractos de plantas o sus principios activos (Akerlele, 1993; Sheldon *et al.*, 1997; Katewa *et al.*, 2004; Pochettino *et al.*, 2008). De acuerdo a la OMS (1979) una planta medicinal es definida como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas con propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos.

Las plantas medicinales se usan comúnmente en forma de infusión, de extracto, o como fuente de aceite esencial o resina, es decir dan lugar a mezclas complejas que contienen un gran número de constituyentes que en gran parte de los casos son más activos biológicamente, que la suma de sus principios activos aislados, debido esencialmente a la interacción y potenciación de los diferentes principios activos de la planta (Berdonces., 1995).

A principios del siglo pasado, Friedrich Sertürner aisló a partir del *Papaver somniferum* la morfina, el primer compuesto puro con actividad farmacológica, esto inicio una era en el que los principios activos, eran aislados y purificados a partir de las plantas medicinales, posteriormente el desarrollo de la química y el descubrimiento de procesos de síntesis orgánica llevaron a la producción de medicamentos. Para la fabricación de muchos de ellos utilizaron los principios activos de determinadas plantas medicinales (Ordaz *et al.*, 2009; Li y Vederas., 2009).

De acuerdo con Villar (1999), se conocen diferentes pasos a seguir en la obtención de principios activos a partir de las plantas (Esquema 1):



Esquema 1. Pasos para la obtención de principios activos a partir de plantas (Villar., 1999)

Como se puede observar, el estudio de las plantas medicinales no sólo se limita al conocimiento de la actividad biológica de sus principios activos, sino que también se enfoca en la purificación, elucidación e identificación de la estructura química del compuesto que presenta una actividad biológica específica.

II.2 PRODUCTOS NATURALES O METABOLITOS SECUNDARIOS (MS)

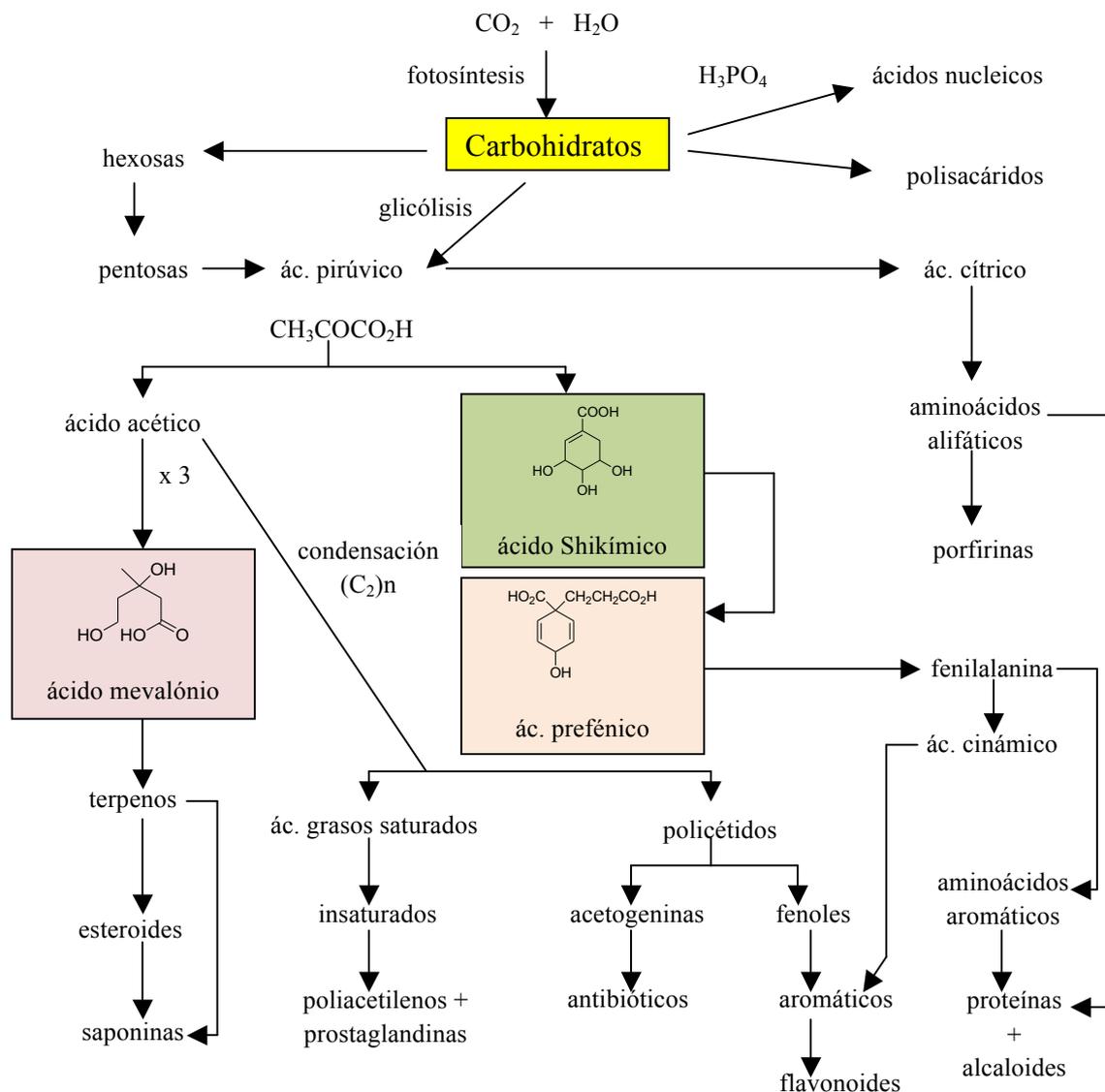
II.2.1 DEFINICIÓN

Las plantas para vivir, crecer y reproducirse necesitan transformar una gran variedad de compuestos orgánicos, dichas transformaciones requieren de sistemas enzimáticos y energía que es obtenida en forma de adenosin trifosfato (ATP); al conjunto de estas reacciones específicas mediante el cual un organismo fabrica sus propias sustancias y mantiene la vida se conoce como metabolismo (García y Pérez-Urria., 2009).

Las moléculas más importantes para la vida son las proteínas, los hidratos de carbono, las grasas y los ácidos nucleicos. A pesar de las características extremadamente diferentes de los distintos seres vivos, las rutas generales para modificar y sintetizar estas sustancias son esencialmente las mismas para todos con muy pequeñas modificaciones, estos procesos se conocen como **metabolismo primario** y los compuestos implicados, en las diferentes rutas, se conocen como metabolitos primarios; por el contrario el **metabolismo secundario** se refiere al conjunto de procesos en el que

participan compuestos con una distribución mucho más limitada y específica según el ser vivo, denominados metabolitos secundarios o productos naturales, los cuales son específicos de las especies. A los principios del metabolismo secundario se les considera como no esenciales para la vida. Según Bullock, el metabolismo secundario sirve para mantener el metabolismo básico en aquellas circunstancias en las que los sustratos normales no pueden ser utilizados para el desarrollo normal de la célula, por falta de nutrientes (Ordaz *et al.*, 2009).

La formación de los metabolitos secundarios en la naturaleza tiene lugar a partir de los metabolitos primarios. La síntesis de los productos naturales comienza con la fotosíntesis que tiene lugar en plantas superiores, algas y algunas bacterias. Es un proceso endotérmico que requiere de la luz solar. Aquellos organismos incapaces de absorber la luz obtienen su energía de la degradación de carbohidratos. La mayor parte de los compuestos de interés se sintetiza por alguna de las siguientes ramas: 1) rutas del ácido shikímico conducentes a la síntesis de sustancias aromáticas entre ellos aminoácidos, ácido cinámico 2) ruta del ácido mevalónico que da lugar a terpenoides, 3) ruta acetato-malonato donde el acetato es el precursor de los ácidos grasos y los policétidos, y 4) rutas del metabolismo del nitrógeno, principalmente aminoácidos, que llevan a la síntesis de alcaloides (Villar., 1999) (Esquema 2). Algunos esqueletos de productos naturales se biosintetizan utilizando fragmentos que provienen de más de una ruta específica tal es el caso de los flavonoides que se forman a partir de la ruta del acetato y del ácido shikímico. A estos compuestos se les denomina de biogénesis mixta.

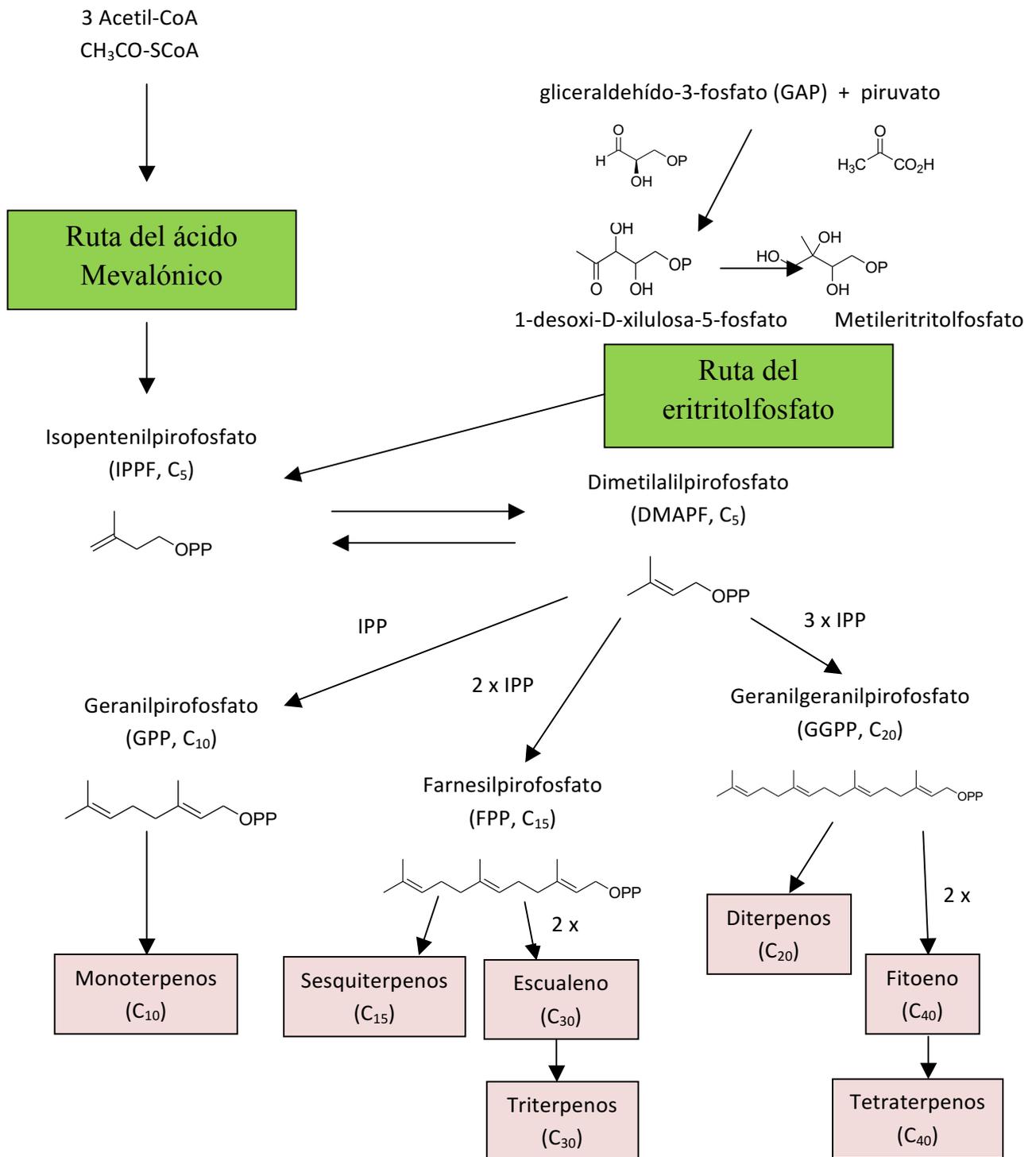


Esquema 2. Biosíntesis general de metabolitos secundarios (Marcano., 2002)

Las rutas biosintéticas que dan lugar a metabolitos de uno y otro grupo están entrelazadas, debido a que productos del catabolismo de un tipo de principios pueden ser inicio de la génesis de otro. Un compuesto determinado puede ser utilizado en el metabolismo primario o secundario dependiendo de la especie, etapa vegetativa y del medio ambiente en que se encuentre. La síntesis específica de cada compuesto suele estar restringida a estados específicos del desarrollo respectivo de cada tipo de organismo, células especializadas y períodos de estrés causados por la deficiencia de nutrientes o por el ataque de microorganismos (Azcón-Bieto y Talón, 2000).

Atendiendo a las vías biosintéticas que les dan origen, los metabolitos secundarios se dividen en tres grandes grupos: los terpenos, las sustancias fenólicas y los compuestos que contienen nitrógeno en su estructura (Valdés y Balbín, 2000).

Los terpenos representan, entre los productos naturales unas de las clases de metabolitos secundarios más amplia en lo que a número de componentes se refiere, la más variada en diversidad estructural y funcional, es una las más interesantes desde el punto de vista biológico y farmacológico. Todos los isoprenoides son sintetizados a partir de las mismas unidades básicas isoprenicas isopentenilpirofosfato (IPPF, C₅) y dimetilalildifosfato (DMAPF, C₅); ambos isómeros pueden ser sintetizados por dos vías: la vía dependiente de mevalonato (MVA) (prevalente en eucariotas) y la ruta del metileritritolfosfato (MEP) también conocida como vía 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato (DXP). Ashour *et al.*, (2010), describen que la ruta biosintética de los terpenos naturales (Esquema 3) comprende cuatro etapas: la primera implica la formación de IPPF, y su isómero DMAPF. En la segunda etapa, las unidades básicas de C₅ se condensan para formar, geranilpirofosfato (GPF, C₁₀), farnesilpirofosfato (FPF, C₁₅), y geranilgeranilpirofosfato (GGPF, C₂₀). En la tercera etapa el GPF y GGPF sufren una amplia gama de ciclaciones y reordenamientos que originan diferentes tipos de terpenos. GPF da origen a los monoterpenos, FPF es convertido a sesquiterpeno, mientras que GGPF a diterpenos. La cuarta y última etapa abarca una variedad de transformaciones (reducción, oxidación, isomerización) que dan origen a los miles de metabolitos de terpenos. Sin embargo, la vía alterna para la formación de la unidad de isopreno en bacterias y plantas, comprende la unión de piruvato y gliceraldehído-3-fosfato, originando 1-desoxi-xilulosa-5-fosfato como precursor del IPPF (Esquema 3).



Esquema 3. Biosíntesis de terpenos en plantas (Ashour *et al.*, 2010)

Los metabolitos secundarios en las plantas son muy comunes pero no significa que todas las plantas producen todos los metabolitos. Algunas sustancias están

restringidas a una sola especie y otras a grupos relacionados. La mayor parte de las veces se encuentran en una planta específica, en un órgano específico de ésta, en un tipo de célula y al igual solo se genera en un periodo específico del desarrollo de la planta. Muchos de los metabolitos secundarios son tóxicos y son almacenados, en su mayoría, en vesículas específicas o en vacuolas. Varios estudios indican que esta función de almacenamiento sirve de desintoxicación de la planta y por otro lado genera una reserva, por ejemplo, de moléculas ricas en nitrógeno (Bahmani, 2014).

Entre las funciones que cumplen los metabolitos secundarios en las plantas tenemos, como sistema de defensa contra patógenos, herbívoros, o estrés externo como la radiación ultravioleta (UV), también cumplen función de señalización, influyen la actividad de otras células, controlan la actividad metabólica y coordinan el desarrollo de toda la planta. Otras sustancias dan color a las flores para poder atraer polinizadores o proteger a la planta de ser consumida por animales. Algunas plantas producen fitoalexinas que previenen el esparcimiento de un hongo en una planta (García y Pérez, 2003; Trosset y Carbonell., 2015).

Las variables climáticas que afectan al rendimiento en metabolitos secundarios, de las plantas son: temperatura, humedad, radiación solar en sus dos vertientes, luz y calor, régimen de vientos y química del suelo. La competencia por nutrientes con otros organismos es otro factor que influye en la producción de metabolitos secundarios al igual que la protección de insectos y otros animales (Ordaz *et al.*, 2009).

Los productos naturales han tenido un papel importante en la medicina dándole un valor farmacológico y económico muy grande. Los metabolitos secundarios tienen diferentes intereses en función de su utilidad, son los principales responsables de las acciones y efectos farmacológicos que poseen una droga y por lo tanto de su uso terapéutico, pudiendo servir para la elaboración de medicamentos. Los principios activos son en general productos naturales que provienen de una cadena de oxidaciones y reducciones en el metabolismo secundario (Greenwell y Rahman., 2015).

Durante los últimos 20 a 30 años el análisis de metabolitos secundarios ha progresado bastante. El uso de técnicas modernas como la cromatografía (en todas sus

variantes), electroforesis, técnicas isotópicas y la enzimología, han podido elucidar las fórmulas químicas exactas y las rutas biosintéticas más importantes (Cordell, 1995).

II.3 DITERPENOIDES

La clase más grande de metabolitos secundarios presentes en las plantas son, sin duda, los terpenoides; la característica general que distingue a los mismos de otros productos naturales, es que están constituidos de unidades de cinco átomos de carbono, conocidas como unidad de isopreno (Fig. 1) (He *et al.*, 2013), de ahí que también se les conozca como isoprenoides, obedecen a lo que se conoce como “Regla de Isopreno”, esto es: “*La secuencia de átomos de carbono que conforman un terpeno es tal, que en su estructura pueden localizarse varias unidades consecutivas de isopreno*” (Ruzicka, 1959).

Todos los terpenoides tienen un origen biosintético común, proceden de la condensación de dos o más unidades de isopreno (Ashour *et al.*, 2010; López *et al.*, 2012); la mayoría de isoprenoides contienen átomos de carbono en número múltiplo de cinco (Pineda., 2006).

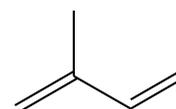


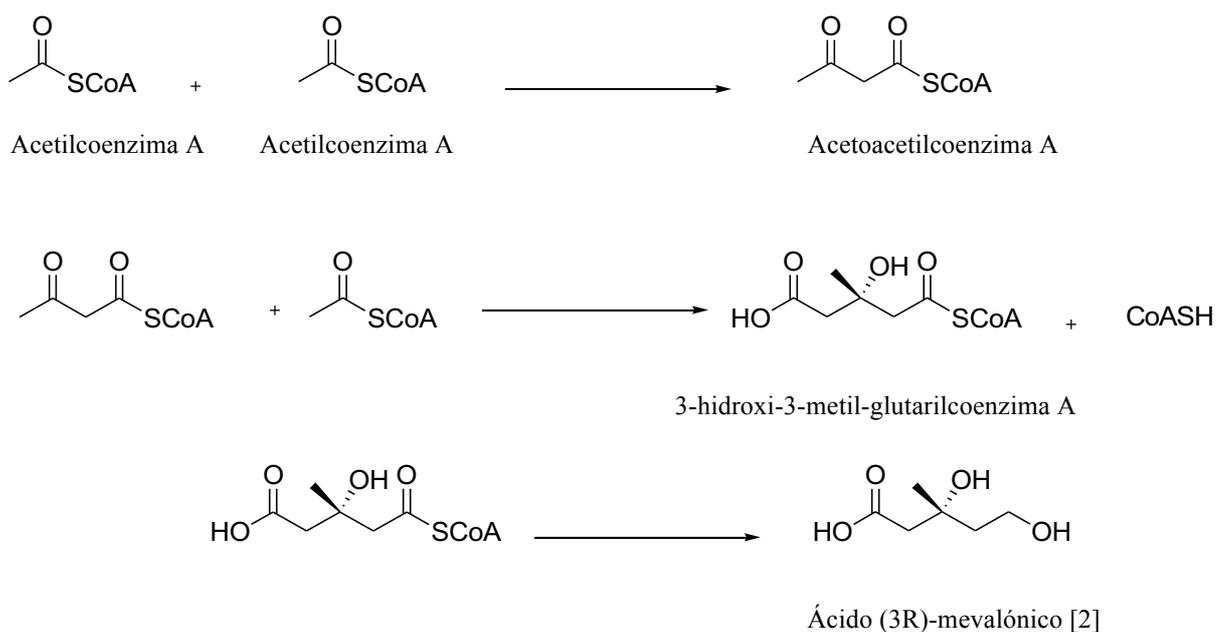
Figura 1. Estructura del isopreno 2-metil-1,3-butanodieno [1]

Los diterpenoides por definición son compuestos de 20 átomos de carbono y se les considera derivados de cuatro moléculas de isopreno, sin embargo en la naturaleza se consiguen diterpenoides que poseen más de 20 átomos de carbono y algunos menos de 20 carbonos. La terminación “eno” para el nombre diterpeno se debe a la presencia de insaturaciones en el anillo básico, pero debido a que estos anillos también presentan otros grupos funcionales, actualmente se les da la terminación “oide” siendo el nombre diterpenoide (Peña., 2008)

Durante muchos años, la abundancia y distribución de compuestos terpenoides en plantas han beneficiado la civilización humana; en la actualidad se conoce una gran cantidad de esqueletos de diterpenoides con actividad antibacteriana, antiinflamatoria, antifúngica, antitumoral, antiviral, antiparasitaria (Bruno *et al.*, 2002; Takahashi *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2006; Maurya *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015., Ni *et al.*, 2015). El desarrollo de estos compuestos tiene gran valor y una amplia aplicación, por ejemplo los diterpenoides tipo *ent*- kaurano se encuentran disponibles en el comercio principalmente como mezcla de productos de extracto de plantas naturales. Hasta ahora, ninguna entidad química única de diterpenoides *ent*-kaurano se ha utilizado en el

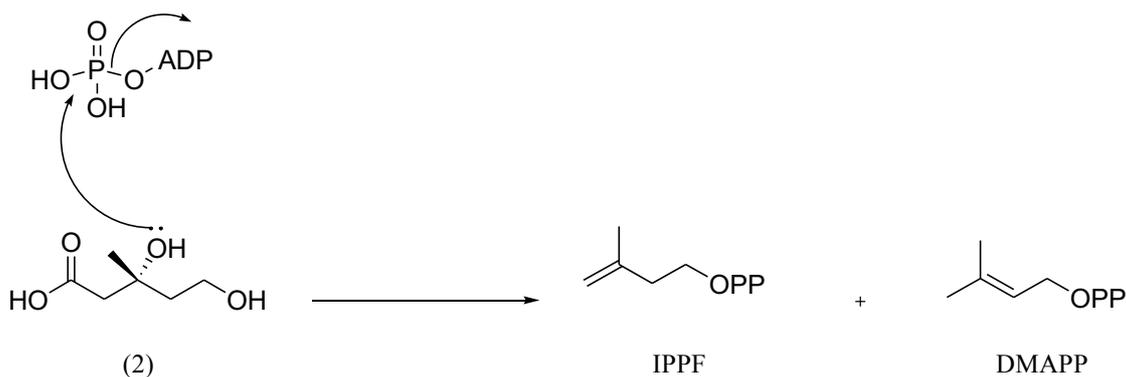
tratamiento clínico. Sin embargo, en el futuro cercano, nuevos medicamentos preparados a partir de esta clase de compuestos jugarán un papel importante en el tratamiento de varias enfermedades como el cáncer (Ni *et al.*, 2015).

El precursor en la biogénesis de los diterpenoides es el del ácido mevalónico [2], el cual se origina a partir de la condensación de tres moléculas de ácido acético (bajo la forma de acetilcoenzima A) para generar en primer lugar un 3-hidroxi-3-metil-glutaril derivado; luego éste mediante una reducción del tioéster, evoluciona hasta el ácido mevalónico (Esquema 4) (Dewick., 2002; Chacón P., 2013).



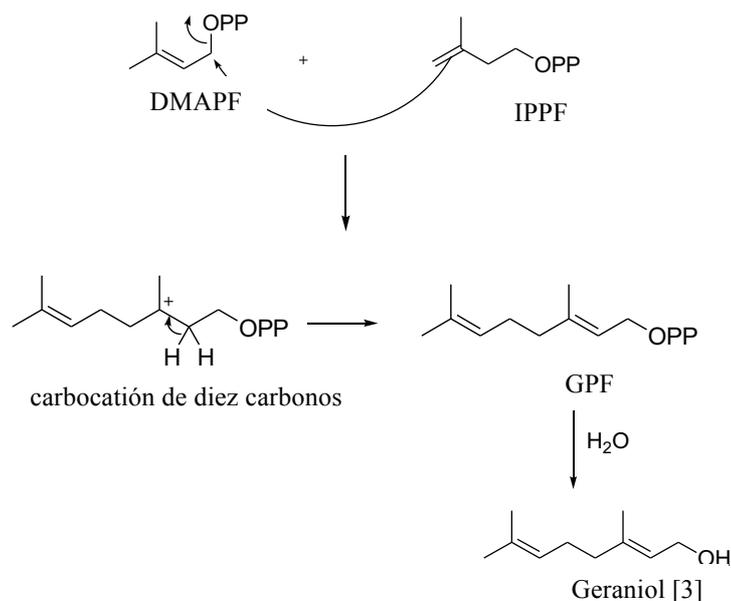
Esquema 4. Formación del ácido mevalónico

Posteriormente el ácido mevalónico a través de una deshidratación y descarboxilación simultánea, se transforma en el pirofosfato de 3-metil-3-butenilo o pirofosfato de isopentilo (IPPF), esta especie a su vez se encuentra en equilibrio con el dimetilalilpirofosfato (DMAPF) (Esquema 5).



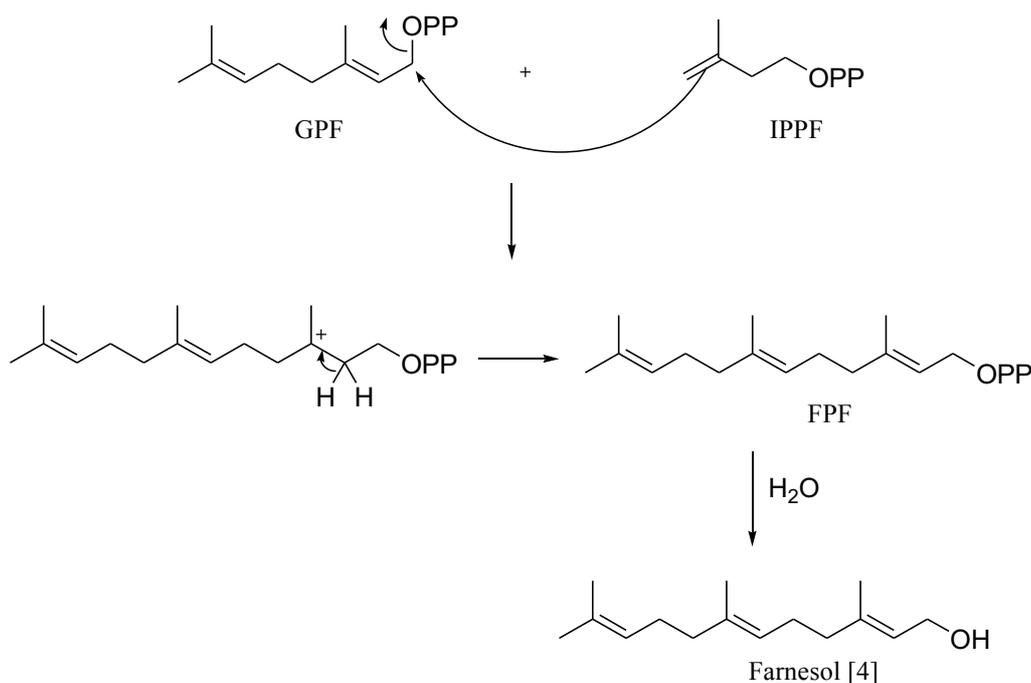
Esquema 5. Transformación del ácido mevalónico a IPPF: isopentenilpirofosfato y DMAPP: dimetilalilpirofosfato. –OPP: grupo pirofosfato

Estos dos compuestos reaccionan entre sí, para formar un enlace carbono-carbono que conecta las dos unidades de isopreno. El isopentenilpirofosfato actúa como un nucleófilo y desplaza al grupo OPP del dimetilalilpirofosfato (Esquema 6), formándose un carbocatión terciario que pierde un protón para generar un doble enlace.



Esquema 6. Formación del Geraniol

El producto de reacción es el geranilpirofosfato cuya hidrólisis conduce al monoterpeno Geraniol [3]. El pirofosfato de geraniol reacciona con una molécula de isopentenilpirofosfato, generando un carbocatión de quince átomos de carbono, que por desprotonación, origina el farnesilpirofosfato; la posterior hidrólisis del grupo éster produce al Farnesol [4] (Esquema 7).



Esquema 7. Formación del Farnesol

La repetición del proceso descrito anteriormente produce, a partir del farnesilpirofosfato, el diterpeno geranylgeraniol [5] (Fig. 2), precursor de los diterpenos cíclicos.

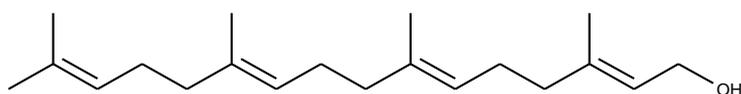
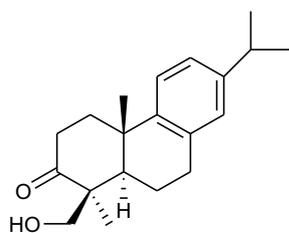
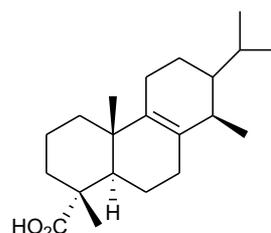


Figura 2. Estructura de geranylgeraniol [5]

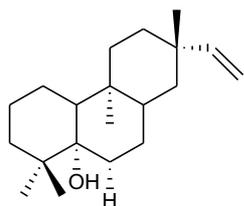
De acuerdo al número y a los patrones de ciclación que aparecen en su esqueleto los diterpenos se dividen en: acíclicos (fitano), bicíclicos (labdanos, halimanos, clerodanos), tricíclicos (pimaranos, abietanos, cassanos, rosanos, vouacapanos, podocarpanos), tetracíclicos (traquilobanos, kauranos, afidicolanos, estemodanos, estemaranos, beyeranos, atisanos, giberelanos), diterpenos macrocíclicos (taxanos, cembranos, dafnanos, tiglianos, ingenanos) y los compuestos mixtos. Se encuentran principalmente en plantas y hongos, aunque también se han encontrado en los organismos marinos e insectos (Fig. 3) (Sims y Pettus., 1976; Johansson *et al.*, 1996; Chakraborty *et al.*, 2010; Kataev *et al.*, 2011; Hanson., 2013; Hanson., 2015).



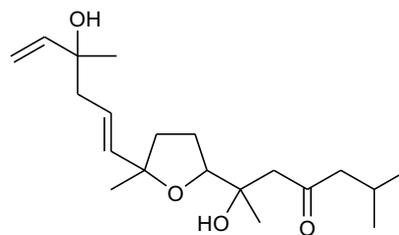
Triptobenceno R [6]; *Tripterygium wilfordii*
(Celastraceae) (Hanson *et al.*, 2015)



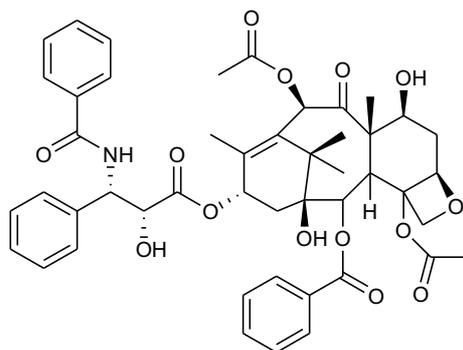
Ácido isosuaveolico [7]; *Hyptis suaveolens*
(Lamiaceae) (Hanson *et al.*, 2015)



Cuzcol [8]; *Maytenus cuscoina* (Celastraceae)
(Nuñez *et al.*, 2011)



Hueafurainoid A [9]; *Huea sp*
(Hanson *et al.*, 2015)



Taxol [10]; *Taxus brevifolia* (Taxaceae) (Sun *et al.*, 2015)

Figura 3. Estructuras de algunos diterpenos aislados de plantas

Tal como se menciona anteriormente, los kauranos son diterpenos tetracíclicos cuyo nombre proviene del popular “Kauri”, con el cual se designa a la especie vegetal de Nueva Zelanda *Agathis australis* (Araucariaceae). Entre 1928 y 1930 el inglés Hosking aisló de esta planta un diterpeno cristalino, al cual denominó kaureno, nombrando a su isómero isokaureno (Ibañez, 2006). Los *ent*-kauranos tienen una configuración inversa a los esteroides y por esta razón se les identifica como *ent*-kauranos o (-)-kauranos, la estructura y numeración de este diterpeno es como se presenta en la Fig. 5 (Hanson., 1991; Hanson., 2002; Ibañez., 2006; Kataev *et al.*, 2011; Hanson., 2012; Hanson., 2013; Hanson., 2015). El prefijo *ent*- representa enantio- de la palabra enantiómero y revela la inversión de la configuración de todos los centros quirales involucrados en una sustancia. Muchos de estos diterpenos presentan

configuraciones absolutas establecidas con sus correspondientes valores de rotación óptica específica $[\alpha]$, permitiendo revelar que aquellos que desvían la luz polarizada a la izquierda (-) pertenecen a la configuración *ent*- (Velandia y De Carvalho., 1998).

Diversas actividades biológicas se han descrito para los derivados del *ent*-kaureno, juegan un rol importante de protección de algunas plantas frente a las bajas temperaturas, actúan como reguladores de la germinación y el crecimiento vegetal, como sustancias de defensa frente a sus predadores naturales (Ashour *et al.*, 2010), antiparasitarios, citotóxicos, antitumorales, anti-HIV, antifertilidad, hipotensor, actividades antiinflamatorias (García *et al.*, 2007), antibacteriano, antifúngico, antituberculosis (Ding *et al.*, 2014). En particular, los diterpenos del tipo kaurano, son productos naturales ampliamente distribuidos en el reino vegetal (Otto *et al.*, 2001; Vieira *et al.*, 2002). Presentan estructuras complicadas, caracterizadas por poseer un esqueleto tetracíclico y propiedades lipofílicas. Esta lipofilicidad se debe a la unidad de perhidrofenantreno (anillos A, B, C), el cual está fusionado con una unidad de ciclopentano (anillo D) que se forma por un puente entre dos carbonos, C₈ y C₁₃. Fig. 4 (Hueso-Falcón *et al.*, 2010; Ding *et al.*, 2014).

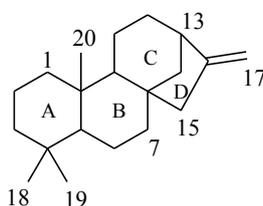


Figura 4. Esqueleto general de los diterpenos tipo kaurano.

Se han aislado un gran número de diterpenos tetracíclicos del tipo *ent*-kaurano entre los cuales se encuentra el ácido *ent*-kaur-9(11)-16-dieno-19-oico o ácido grandiflorénico.

II.3.1 Ácido *ent*-kaur-9(11),16-dieno-19-oico

El ácido *ent*-kaur-9(11),16-dieno-19-oico [11], también conocido como ácido grandiflorénico (AG) (Fig. 5), es un diterpeno *ent*-kaurano aislado por primera vez, en 1968 por Piozzi *et al.*, de la especie *Espeletia grandiflora* (Ruiz *et al.*, 2008), ese mismo

año Brieskorn y Pohlmann determinaron grandes cantidades de AG en la resina de *Espeletia schultzii* Wedd. El AG es de ocurrencia natural (Boeck *et al.*, 2005, Peixoto *et al.*, 2008) e intermediario de numerosos metabolitos secundarios de plantas (Batista *et al.*, 2007). Este compuesto exhibe una amplia variedad de actividades biológicas, por lo que es empleado como uterotónico, antimicrobiano, antifúngico, antiinflamatorio, antiespasmódico, anticancerígeno (Campos-Bedolla *et al.*, 1997, Paiva *et al.*, 2003; Villa-Ruano *et al.*, 2009; Sosa-Sequera *et al.*, 2010; Tirapelli *et al.*, 2002, 2005; Cavalcanti *et al.*, 2006, Verma *et al.*, 2015), cicatrizante (Balekar *et al.*, 2013), antiparasitario, anti-VIH (Diamantino *et al.*, 2008), tripanosomicida (Li *et al.*, 2007; Balekar *et al.*, 2012), diurético (Villa-Ruano *et al.*, 2013), alelopática (Rocha *et al.*, 2009), podría estar relacionado con propiedades abortivas debido a su estabilidad e integridad química en estudios en infusiones acuosas apoyadas por cromatografía líquida de alta presión (HPLC), cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y resonancia magnética nuclear (NMR) (Enríquez *et al.*, 1997). Además, el AG exhibe una estabilidad idéntica a la del ácido kaurénico (AK) y su presencia y alta abundancia sugieren su participación en los efectos antidiabéticos, de acuerdo con las pruebas *in vivo* realizadas por Bresciani *et al.*, (2004); Deng *et al.*, (2013).

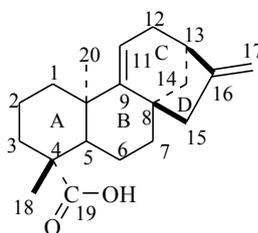


Figura 5. Estructura química del ácido *ent*-kaur-9(11),16-dieno-19-oico

En la literatura, el AG se ha señalado como un material de partida apropiado con propósitos sintéticos (Batista *et al.*, 2007). Indiscutiblemente, la disponibilidad de este producto natural en algunas especies de las familias Asteraceae, Euphorbiaceae y Apiaceae, permite desarrollar derivados, transformaciones químicas de dichos derivados y evaluar sus actividades biológicas (Diamantino *et al.*, 2008).

II.3.1.1 DISTRIBUCIÓN NATURAL DEL Ácido *ent-kaur-9(11),16-dieno-19-oico*

El AG es un diterpeno que posee un amplio espectro de bioactividades (García *et al.*, 2007; De Melo *et al.*, 2001), puede obtenerse a partir de las fuentes naturales, además, está comercialmente disponible bajo el CAS # 22338-67-6. En el reino Plantae el AG tiene una amplia abundancia (Rojas *et al.*, 2011), por lo que representa la primera fuente natural de este compuesto (García *et al.*, 2007), principalmente en la familia Asteraceae. Sin embargo, existen reportes de su identificación y aislamiento en menor cantidad a partir de otras fuentes que involucran las familias Euphorbiaceae y Apiaceae.

Dentro la familia Asteraceae, se encuentran una gran variedad plantas del género *Espeletia*, conocidas como “Frailejón”, son plantas resinosas nativas de los páramos de Venezuela, norte de Ecuador y Colombia, las cuales se caracterizan por presentar grandes cantidades de AG y ácido *ent-kaurénico*. En la mayoría de los frailejones estudiados hasta el momento, el componente más abundante de la fracción ácida es el AG. En 1997 en el Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Los Andes (ULA) se desarrolló un método para analizar los ésteres metílicos del ácido kaurénico y sus derivados mediante cromatografía de gases (CG), que posteriormente se adaptó para analizar mezclas de kaurenos mediante CG acoplada a espectrometría de masas (EM). Este método permitió establecer que la mayoría de los frailejones contenían una mezcla de AG y kaurénico, siendo casi siempre el ácido grandiflorénico el más abundante. Debido a la importancia biológica de los ácidos *ent-kaurénicos*, es importante destacar a la *E. semiglobulata*, hasta el momento, como la única especie que contiene poco AG, mientras que *E. schultzii* Wedd posee altas cantidades, facilitando su extracción y purificación (Aparicio *et al.*, 2013).

Como se observa en la Tabla 1, de las distintas fuentes naturales del AG citadas en la bibliografía, la familia Asteraceae es una de las mejores representadas, encontrándose en varias especies de los géneros *Espeletia*, *Montanoa*, *Helianthus*, *Coespeletia*, *Wedelia*, *Viguiera*, *Smallanthus*, *Zaluzania*, *Aspilia* (Lachman *et al.*, 2003; Cotoras *et al.*, 2004; Ohkoshi *et al.*, 2004; Boeck *et al.*, 2005; Tirapelli *et al.*, 2005; Ambrosio *et al.*, 2006; Ibañez *et al.*, 2006; Ríos *et al.*, 2006; Batista *et al.*, 2007; Soares

et al., 2007; Fraga *et al.*, 2008; Diamantino *et al.*, 2008; Robles-Zepeda *et al.*, 2008; Peña *et al.*, 2008; Rojas *et al.*, 2011).

De todas las especies mencionadas anteriormente, cabe destacar la importancia del género *Espeletia*, el cual está reunido bajo la subtribu Espeletiinae (Cuatrecasas, 1976; Ibáñez, 2006), son endémicas de los páramos andinos de Venezuela, Colombia y Ecuador (Sobrevila, 1989); es decir, crecen en ecosistemas de elevación discontinua entre los 2800 y 4200 m (Goldstein *et al.*, 1985), dentro de las latitudes 8° sur y 11° norte (Luteyn, 2000), donde el hábitat periglacial es muy duro (Silva *et al.*, 1999). Por esta razón, estas plantas presentan una serie de adaptaciones caracterizadas por las vellosidades abundantes en las hojas, con las hojas muertas protegiendo el tallo (Meinzer *et al.*, 1985), lo que le permite combatir las drásticas condiciones climáticas de las alturas andinas (frío, alta irradiación ultravioleta (UV), estacionalidad diaria y escasez fisiológica de agua).

Las plantas de la subtribu Espeletiinae son resinosas y se conocen popularmente como frailejones (Hueso-Falcón *et al.*, 2010). Estos frailejones dominan los páramos como gigantes rosetas (Monasterio, 1979), las cuales se extienden dependiendo de la morfología y similitudes ecológicas de las diversas especies, tendiendo a excluir a las demás formando manchas casi puras en las zonas adyacentes, donde se hace notable el predominio de una de las especies de frailejon, en términos de tamaño, número y biomasa (Silva *et al.*, 1999).

Familia	Género y especie	Parte de la planta	Referencia
ASTERACEAE	<i>Aspilia mossambicensis</i>	Hojas	Page <i>et al.</i> , 1992
	<i>Coespeletia moritziana</i>	Hojas	Ibañez <i>et al.</i> , 2006; Peña <i>et al.</i> , 2009
	(Sch. Bip. Ex Wedd) Cuatrec.	Flores Hojas	Mestres <i>et al.</i> , 2011
	<i>Coespeletia timotensis</i>	Hojas	De Carvalho <i>et al.</i> , 2001
	<i>Espeletia grandiflora</i>	Hojas	Piozzi <i>et al.</i> , 1968
	<i>Espeletia killipi</i>	Hojas Exudado resinoso	Torrenegra., 2003 Acosta <i>et al.</i> , 2011
	<i>Espeletia barclayana</i>	Hojas	Torrenegra., 2003
	<i>Espeletia schultzi</i> Wedd.	Inflorescencia Hojas Hojas Exudado resinoso Tallos -----	De los Rios <i>et al.</i> , 1999 Usubillaga <i>et al.</i> , 2003 Ibañez <i>et al.</i> , 2006; Ruíz <i>et al.</i> , 2008 Mondolis <i>et al.</i> , 2013 De León <i>et al.</i> , 2008
	<i>Espeletia nana</i> Cuatrec.	Hojas	Peña <i>et al.</i> , 2012
	<i>Espeletia semiglobulata</i> Cuatrec.	Hojas	Usubillaga <i>et al.</i> , 2003
	<i>Espeletiopsis angustifolia</i> Cuatrec.	Hojas Hojas Hojas	Aparicio <i>et al.</i> , 2013 Meccia <i>et al.</i> , 2010
	<i>Espeletiopsis guacharaca</i> (Díaz) Cuatrec.	Hojas Tallos	Bohlmann <i>et al.</i> , 1980
	<i>Helianthus nuttallii</i>	Hojas	Lee <i>et al.</i> , 1984
	<i>Ichthyothere terminalis</i>	Raíces	Balekar <i>et al.</i> , 2012
	<i>Montanoa tomentosa</i>	Hojas Hojas Hojas Hojas Hojas Hojas	Bejar <i>et al.</i> , 1984; 1988 Enríquez <i>et al.</i> , 1983 Reynols <i>et al.</i> , 1984; Campos-Bedolla <i>et al.</i> , 1997 Robles-Zepeda., 2009 Villa-Ruano <i>et al.</i> , 2009 Cruz-Mondragón <i>et al.</i> , 2009
	<i>Wedelia calycina</i>	-----	Bohlmann <i>et al.</i> , 1982

Tabla 1. Fuentes naturales del ácido grandiflorénico.

Familia	Género y especie	Parte de la planta	Referencia
ASTERACEAE	<i>Wedelia buphthalmiflora</i>	Raíces	Bohlmann <i>et al.</i> , 1982
	<i>Wedelia chinensis</i>	Hojas	Bohlmann <i>et al.</i> , 1984
	<i>Wedelia hispida</i>	Hojas	Vieira <i>et al.</i> , 2005 Herz <i>et al.</i> , 1984
	<i>Wedelia hookeriana</i> Gardner	Hojas	Herz <i>et al.</i> , 1984
		Hojas	Peña <i>et al.</i> , 2008
		Hojas	Herz <i>et al.</i> , 1984; Batista <i>et al.</i> , 2009
	<i>Wedelia paludosa</i>	Raíces y hojas	Batista <i>et al.</i> , 1999; 2005; 2009;2010; 2013
		Hojas	Duarte., 2010
		Hojas	Herz <i>et al.</i> , 1984
	<i>Wedelia trilobata</i> (L)	Hojas	Bohlmann <i>et al.</i> , 1982
		Raíces	Ma <i>et al.</i> , 2013
	<i>Perymenium klattianum</i>	Hojas	Balekar <i>et al.</i> , 2013
	<i>Smallanthus sonchifolius</i>	Hojas	Schteingart y Pomilio., 1981
	<i>Smallanthus siegesbeckius</i>	Raíces	Verma y Khosa., 2015
<i>Viguiera hypargyrea</i>	Raíces	Coll <i>et al.</i> , 2010	
<i>Viguiera bishopii</i>	Raíces	Villa-Ruano <i>et al.</i> , 2013	
	Hojas	Marquina <i>et al.</i> , 2009	
	Raíces	Bohlmann <i>et al.</i> , 1981	
<i>Zaluzania montagnifolia</i>	Hojas, flores, y raíces	Coll <i>et al.</i> , 2010	
EUPHORBIACEAE	<i>Croton gossypifolius</i> Vahl	Corteza	Suárez <i>et al.</i> , 2013
APIACEAE	<i>Alepidea amatymbica</i>	Rizomas frescos	Holzappel <i>et al.</i> , 1995
		Rizomas frescos	Somova <i>et al.</i> , 2001
	<i>Alepidea amatynsia</i>	Raíces, hojas	Rustaiyan y Sadjadi., 1987

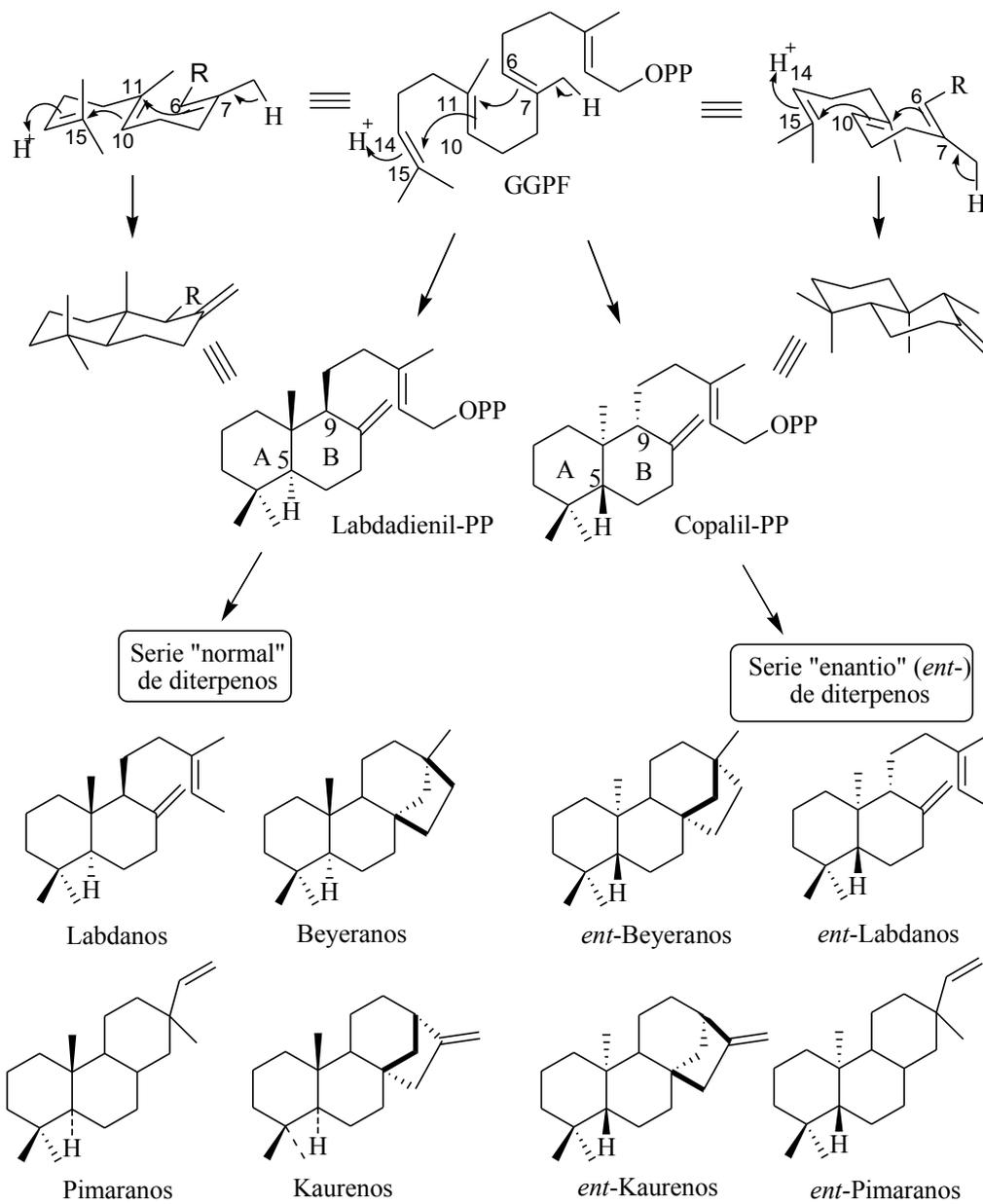
Continuación de Tabla 1. Fuentes naturales del ácido grandiflorénico.

II.3.1.2 BIOSÍNTESIS DEL ÁCIDO *ent*-kaur-9(11),16-dieno-19-oico

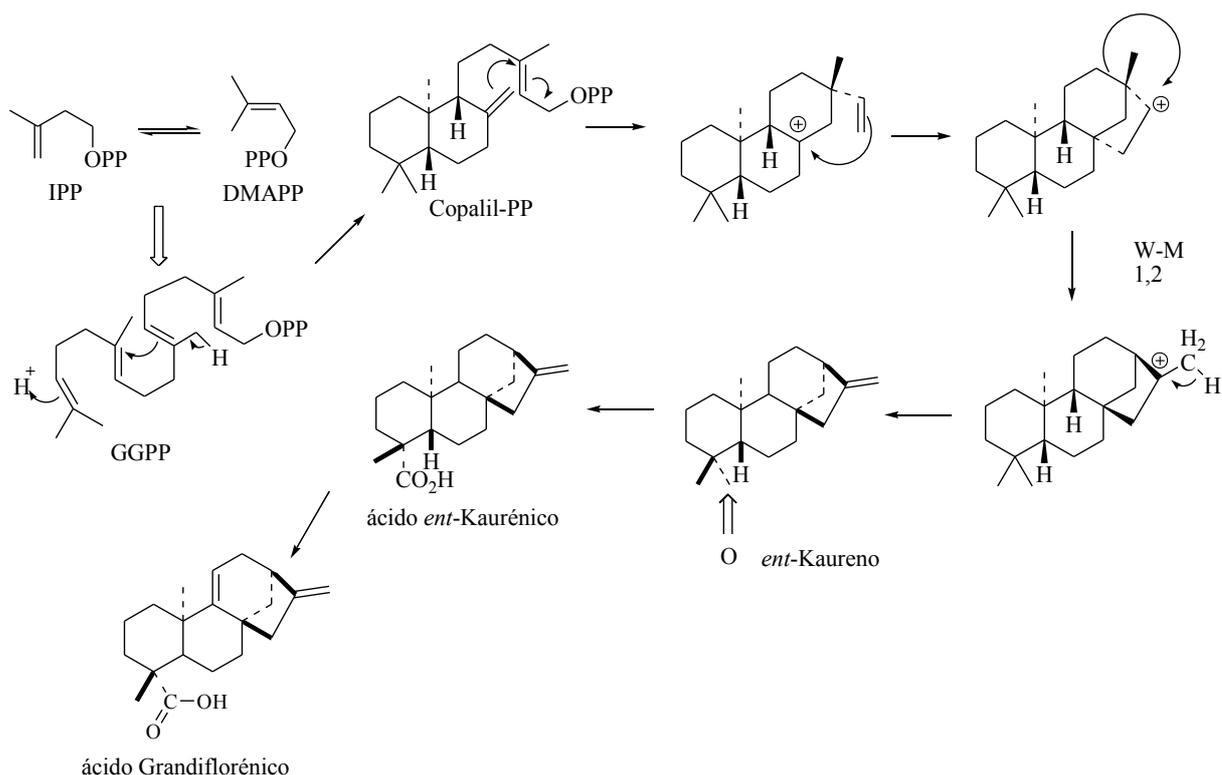
Tanto el ácido *ent*-kaur-9(11),16-dieno-19-oico como el resto de los diterpenoides, constituyen una extensa clase de productos naturales isoprenoides, biosintetizados a partir de la ruta del ácido mevalónico a través de geranilgeranilpirofosfato (GGPF), descrita anteriormente. El esqueleto carbonado del GGPF sufre una ciclación o reordenamiento con pérdida del pirofosfato, trayendo como consecuencia, la protonación del doble enlace C₁₄-C₁₅, seguido por un ataque nucleofílico del C₁₀ sobre el C₁₅ y C₇ sobre C₁₁, originando dos intermediarios biciclos

perhidronaftalenos (labdadienil-PP y copalil-PP), productos cuyas estructuras dependen de la conformación del sustrato proquiral GGPF. En este sentido, se denomina a la serie “enantiomérica” (denotado como “*ent-*”) las estructuras correspondientes a la imagen especular que resultan de la fusión de los anillos A y B, de la serie denominada “normal” (Kataev *et al.*, 2011; García *et al.*, 2007).

En el Esquema 8 se observa que el *ent*-kaureno se genera a partir del copalil-PP mediante una secuencia de ciclaciones y reordenamientos que son catalizadas por la enzima terpeno sintasa. Por otra parte, en el Esquema 9 se observa que estas ciclaciones están mediadas por la pérdida del difosfato, creando un carbocatión que puede ser estabilizado por un reordenamiento de Wagner-Meerwein (W-M= transposición carbocatiónica 1,2) originando los *ent*-kauranos, o por una vía de eliminación de un proton en carbono 15 con la formación de los beyeranos. Por acción de monooxigenasas (citocromo P-450), el C₁₉ del *ent*-kaurano es oxidado a alcohol (*ent*-kaurenol), seguidamente a aldehído (*ent*-kaurenal), y la enzima *ent*-kaurano oxidasa es la responsable formación del ácido *ent*-kaurénico (KA). Finalmente el KA por acción de una oxidasa se transforma en ácido grandiflorénico (Dewick, 2002; Villa-Ruano *et al.*, 2009, 2010; Rico., 2010).



Esquema 8. Ciclación del GGPF bajo catálisis ácida: diterpenos de la serie "normal" y "entio"
(García *et al.*, 2007)



Esquema 9. Biosíntesis del ácido grandiflorénico

En relación a la nomenclatura de los kauranos, se consideran diferentes criterios, siendo la más frecuente la inversión de la descripción estereoquímica convencional cuando el nombre es precedido por el prefijo “*ent-*”. Más adelante, la nomenclatura, numeración y estereoquímica del esqueleto *ent*-kaurano se estableció por recomendaciones de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) (Sharma *et al.*, 2009). Aunque la mayoría de los *ent*-kaurenos se caracterizan por presentar valores negativos para la rotación óptica específica, $[\alpha]_D$ (García *et al.*, 2007), la presencia del doble enlace entre los carbonos 9 y 11, en el ácido *ent*-kaur-9(11)-16-dieno-19-oico provoca modificación suficiente para desviar la luz polarizada a la derecha, $[\alpha]_D=+32,1^\circ$ (CHCl_3) (Velandia y De Carvalho., 1998).

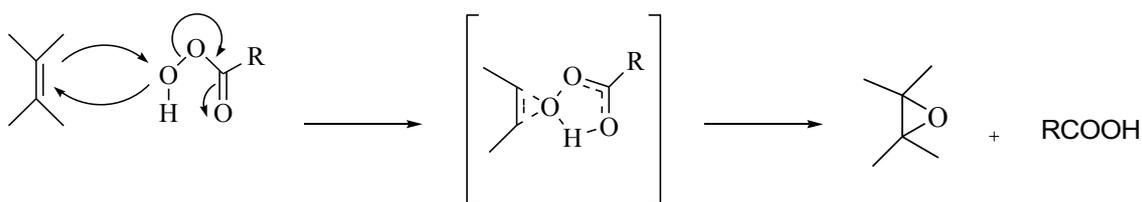
II.3.1.3 MODIFICACIONES ESTRUCTURALES DEL ÁCIDO GRANDIFLORÉNICO REPORTADOS EN LA LITERATURA

El ácido *ent*-kaur-9(11),16-dieno-19-oico se ha sometido a diversas transformaciones químicas, realizadas en el grupo carboxilo de la posición C₁₉ y los dobles enlaces ubicados en las posiciones C₉-C₁₁ (enlace endocíclico) y C₁₆-C₁₇ (enlace exocíclico), a continuación se evidencian algunas de las reacciones reportadas en la literatura:

a. Oxidación:

a.1 Epoxidación con el ácido *m*-cloro-peroxibenzoico (MCPBA)

El método tradicional de epoxidación de alquenos utiliza como oxidante ácidos percarboxílicos. Un peroxiácido epoxida a un alqueno mediante una reacción electrofílica concertada, cuyo mecanismo pasa a través de la formación de un complejo de transición bicíclico (Esquema 10). La velocidad de reacción aumenta en alquenos sustituidos con grupos dadores de electrones, como los grupos alquilo, y disminuye notablemente con los grupos atrayentes de electrones. La reactividad del ácido percarboxílico también está sujeta a efectos electrónicos, aumentando la velocidad de epoxidación los grupos atrayentes de electrones, al incrementar su electrofilia, mientras que disminuye con los grupos dadores de electrones. El MCPBA en tetracloruro de carbono (CCl₄) es el más usado, ya que proporciona buenos rendimientos de epóxidos (Wade., 2004; Carrero., 2008; McMurry., 2012).

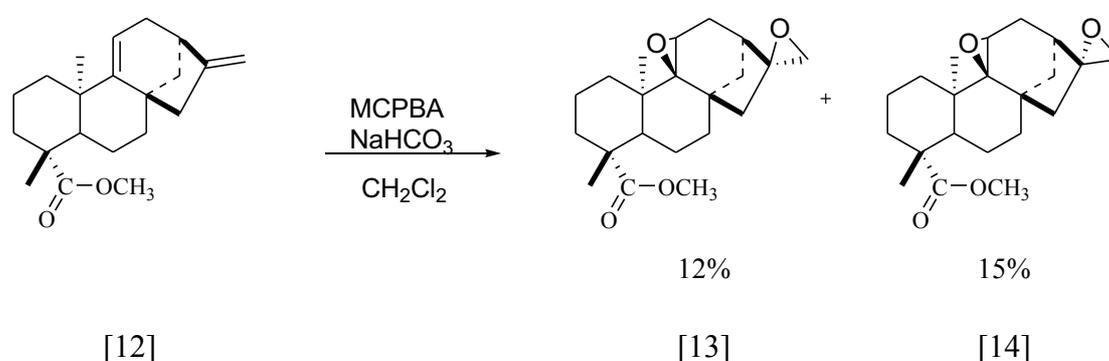


Esquema 10. Mecanismo de epoxidación de alquenos con ácidos percarboxílicos

El disolvente también influye en la reacción, siendo poco deseables los hidrofílicos por su interferencia con el enlace de hidrógeno intramolecular del ácido percarboxílico, mientras que los disolventes aromáticos y clorados son los que proporcionan velocidades de reacción más elevadas. Este sistema presenta el

inconveniente de generar cantidades estequiométricas de un ácido carboxílico, cuya presencia influye en la estabilidad de los epóxidos formados por apertura de su anillo oxirano, lo que conduce a un descenso en la selectividad por formación de mono ésteres o dioles vecinales en presencia de agua. Esto suele evitarse mediante la formación de los perácidos “*in situ*”, procedimiento que consiste en añadir H₂O₂ a un ácido carboxílico, que se regenera después de su uso, con lo que sólo son necesarias pequeñas cantidades de dicho ácido ya que actúa como catalizador (Fiege, 2002).

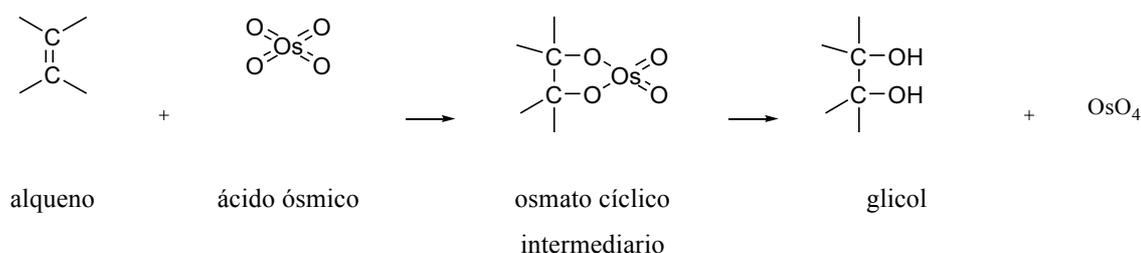
Hueso-Falcón *et al.*, (2011), obtuvieron dos epóxidos, 9(11) β ,16(17) β -diepoxi-*ent*-kauran-19-oato de metilo [13] y 9(11) β ,16(17) α -diepoxi-*ent*-kauran-19-oato de metilo [14] al hacer reaccionar el éster metílico del 9(11),16-dieno-*ent*-kaureno [12] con MCPBA usando como disolvente el diclorometano (DCM) (Esquema 11).



Esquema 11. Epóxidos formados a partir del ácido grandiflorénico

a.2 Hidroxilación con tetraóxido de osmio

El tetraóxido de osmio o ácido ósmico (OsO₄) reacciona con los alquenos en un proceso concertado para formar un éster ósmico cíclico u osmato cíclico intermediario, el cual se forma en una sola etapa por adición del OsO₄ al alqueno; este osmato cíclico se rompe utilizando bisulfito de sodio acuoso, (NaHSO₃) (Esquema 12). Esta reacción ocurre con estereoquímica *syn*.



Esquema 12. Mecanismo de hidroxilación de alquenos con tetraóxido de osmio (OsO₄)

La reacción se realiza por lo general utilizando una pequeña cantidad catalítica de OsO_4 en presencia del *N*-óxido de *N*-metilmorfolina (NMO) (Fig. 6), este reacciona con rapidez con el osmato intermediario para producir el diol, más NMO y OsO_4 reoxidado el cual continua hidrolizando a más moléculas de alqueno.

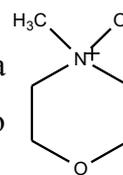
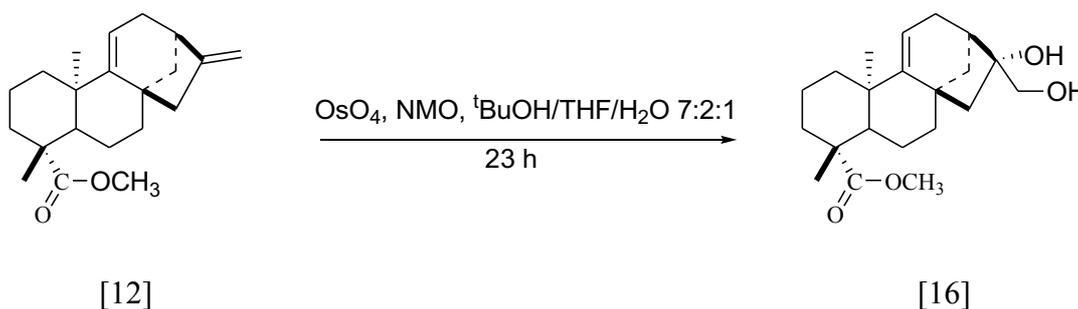


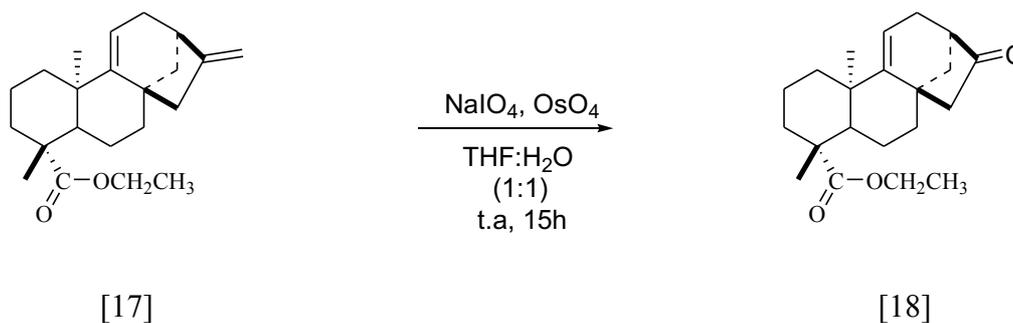
Figura 6. *N*-óxido de *N*-metilmorfolina [15]

El éster [12] del AG ha sufrido este tipo de reacción para obtener el derivado hidroxilado en C_{17} , éster metílico del 16 α ,17-dihidroxi-9(11)-*ent*-kaureno [16] tal como se muestra en el esquema 13 (Hueso-Falcón *et al.*, 2010).



Esquema 13. Hidroxilación con OsO_4 del éster metílico del 9(11),16-dieno-*ent*-kaureno

Considerando que los 1,2-dioles pueden obtenerse con facilidad por oxidación con OsO_4 de un alqueno, este método constituye una alternativa para transformar un alqueno en dos compuestos carbonílicos (o en uno dicarbonílico), tratándolo directamente con una mezcla de peryodato de sodio (NaIO_4) y una cantidad catalítica OsO_4 en agua (procedimiento de Limieux-Jonhson) (Camps *et al.*, 2009). En primer lugar el alqueno es oxidado a diol por el OsO_4 , y a continuación, el NaIO_4 , oxida el diol a compuesto carbonílico y regenera el OsO_4 para que continúe el proceso de oxidación del alqueno. En tal sentido, Duarte (2010), obtuvo el compuesto *ent*-kaur-16-oxo-17-norkaur-9(11)-en-19-ato de etilo [18] a partir del *ent*-kaur-9(11),16-dien-19-ato de etilo [17] (Esquema 14).



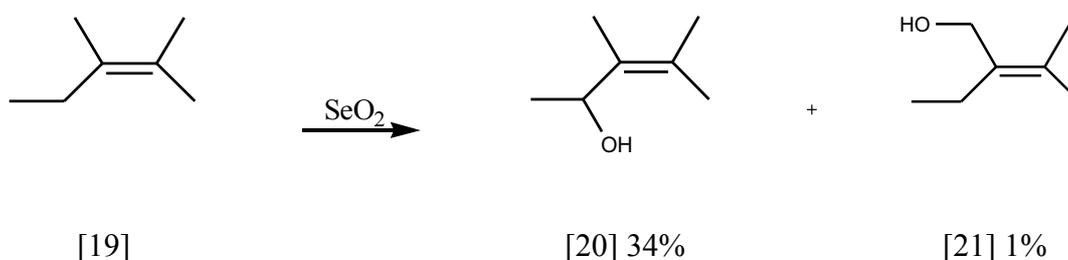
Esquema 14. Oxidación del *ent*-kaur-9(11),16-dieno-19-ato de etilo con NaIO₄ y OsO₄

a.3 Oxidación con dióxido de selenio (SeO₂)

El SeO₂ está indicado como el reactivo más fiable para la inserción directa de un oxígeno en un enlace carbono-hidrógeno alílico (Mann *et al.*, 1977; Crich *et al.*, 2003). Estudios desarrollados por Guillemonat, dieron como resultado una serie de reglas para la hidroxilación selectiva de posiciones alílicas (Francis *et al.*, 1976):

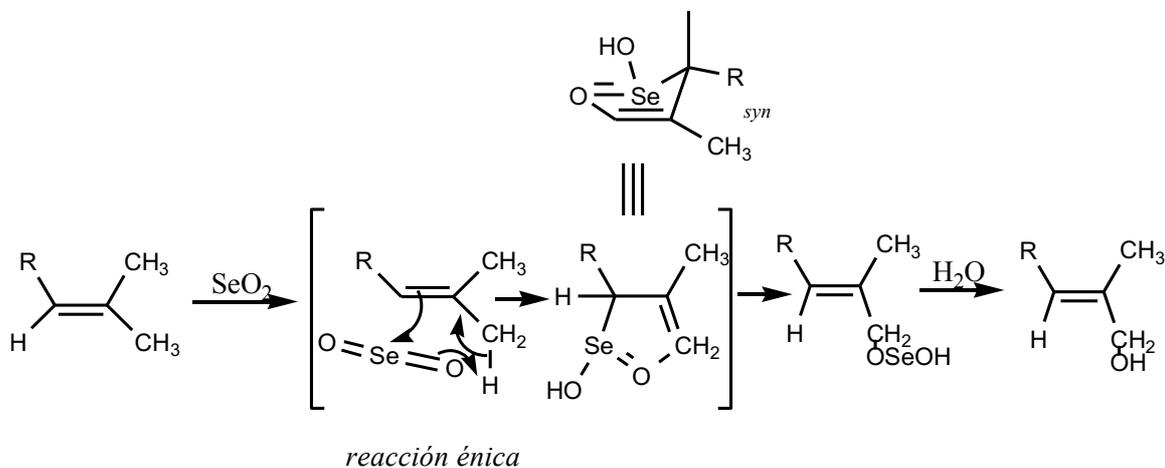
1. En alquenos trisustituídos, la hidroxilación ocurre en posición α al carbono más sustituido del doble enlace.
2. Cuando el doble enlace está en un anillo, la oxidación transcurre dentro del anillo cuando sea posible, y α al carbono más sustituido del doble enlace.
3. El orden de facilidad en la oxidación es CH₂ > CH₃ > CH.
4. La oxidación de un doble enlace terminal genera un alcohol primario con migración alílica del doble enlace.

Un ejemplo lo podemos ver en el caso de oxidación de 2,3-dimetil-2-penteno [19], donde la posición alílica metilénica es oxidada preferentemente frente al metilo, originando como producto mayoritario 4-hidroxi-2,3-dimetil-2-penteno [20] y en menor proporción 2-etil-1-hidroxi-3-metil-2-buteno [21] (Esquema 15).



Esquema 15. Hidroxilación de alquenos con SeO₂

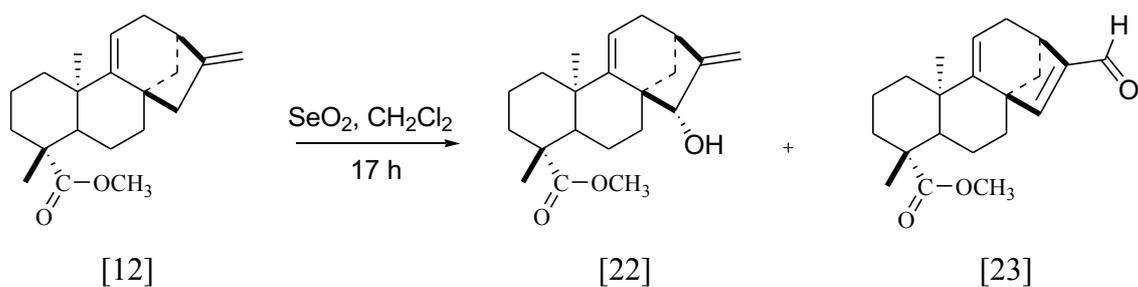
El mecanismo de la reacción de oxidación alílica está aceptado que se inicia por una adición tipo-énica, seguida de un reordenamiento [2,3]-sigmatrópico del ácido alilselénico e hidrólisis del éster resultante (Esquema 16) (Fernández., 2006)



Esquema 16. Mecanismo de oxidación alílica de alquenos con dióxido de selenio (SeO₂)

La selectividad hacia metilos que originan olefinas (*E*) es debida al estado de transición cíclico (Esquema 16), donde además, se dispone de manera pseudoecuatorial el grupo R, quedando los grupos -CH₃ y -R dispuestos *syn*. En cuanto a la selectividad respecto a la posición más sustituida, se debe a que las adiciones tipo-énicas son electrofílicas y la densidad de carga positiva se estabiliza preferentemente en dicha posición.

La hidroxilación alílica del éster metílico de 9(11)-16-dien-*ent*-kaureno [12] con SeO₂, se ensayó a temperatura ambiente utilizando diclorometano como solvente durante 17 horas, obteniendo como producto mayoritario el éster metílico de *ent*-15- α -hidroxi-kaur-9(11),16-dieno-19-ato [22] y producto secundario el éster metílico de *ent*-17-oxo-kaur-9(11),15-dieno-19-ato [23] (Esquema 17) (Hueso-Falcón *et al.*, 2010); sin embargo, Fraga *et al.*, (2008) y Duarte *et al.*, (2010) solo reportaron como único producto de la reacción al ácido *ent*-15- α -hidroxi-kaur-9(11),16-dieno-19-oico. Resultados similares a los reportados por Hueso-Falcón *et al.*, (2010) obtuvieron Peña *et al.*, (2014), al hacer reaccionar el AK con SeO₂.



Esquema 17. Hidroxilación alílica del éster metílico de 9(11),16-dieno-*ent*-kaureno con SeO₂

a.4 Ozonólisis

La ozonólisis es generalmente aceptado como un método estándar para la transformación directa de alquenos a compuestos carbonílicos; el ozono (O₃) rompe los dobles enlaces para formar aldehídos y cetonas (Atmaca *et al.*, 2014). El O₃ es una forma de alta energía del oxígeno, se produce cuando la luz UV o una descarga eléctrica actúan en una atmósfera de oxígeno gaseoso. La estructura de Lewis del O₃ muestra que el átomo de oxígeno central soporta una carga positiva y cada uno de los átomos de oxígeno exteriores la mitad de la carga negativa (Fig. 7) (Wade., 2004).

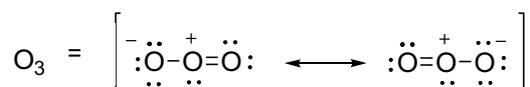
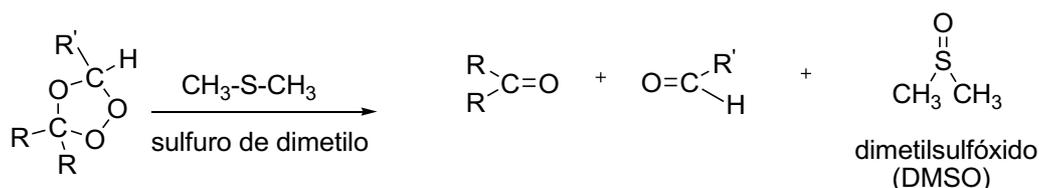
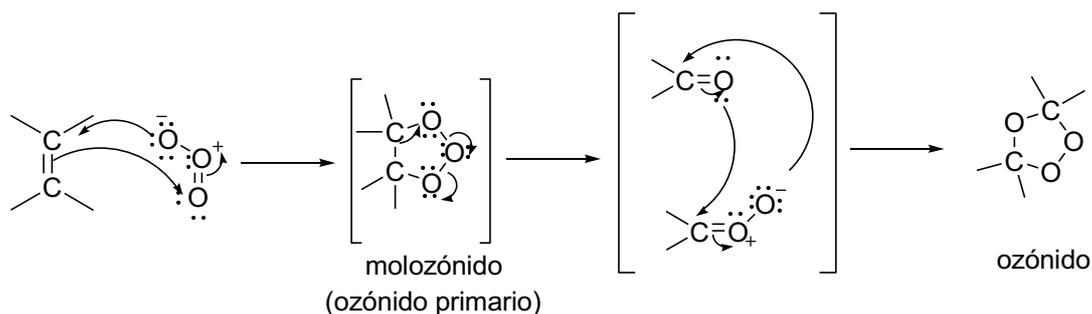


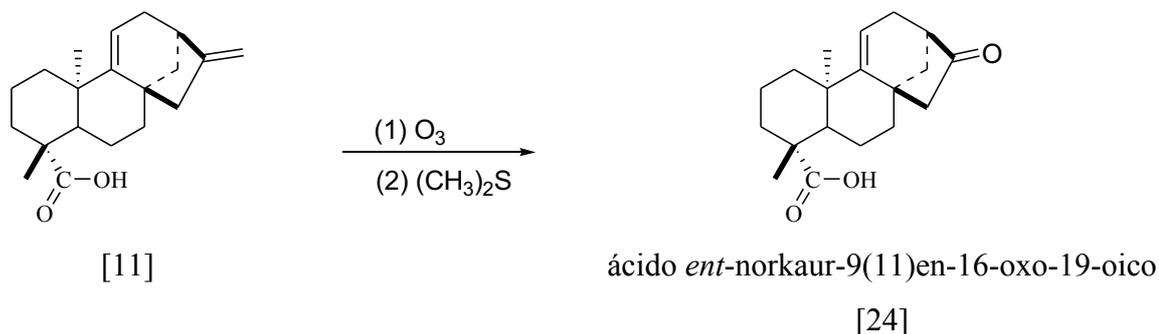
Figura 7. Estructura de Lewis del ozono

Se ha establecido que el mecanismo por el cual procede la reacción de ozonólisis es complejo en el esquema 18, se muestra el esquema de la reacción de ozonólisis de alquenos. La reacción inicia con la cicloadición del ozono al doble enlace >C=C<, formándose un ozónido primario o molozónido; este ozónido es inestable, por sus dos uniones peróxi (-O-O-) y se reordena rápidamente para formar un ozónido, por lo tanto los dos enlaces peróxi y el doble enlace >C=C< escinden simultáneamente originando dos compuestos carbonílicos. Si se ozoniza un alqueno con un doble enlace tetrasustituido, resultan dos fragmentos de cetona; si se ozoniza un alqueno con un doble enlace trisustituido, resulta una cetona y un aldehído, y así sucesivamente (Colmán., 2013). La reactividad química de los ozónidos, ha sido muy poco estudiada limitándose prácticamente, a su reducción en procesos de ozonólisis con agentes reductores moderados como el zinc (Zn) o el sulfuro de dimetilo [(CH₃)₂S] (Muñoz., 2014).



Esquema 18. Mecanismo para la reacción de ozonólisis

El AG ha sufrido ozonólisis siendo modificado el doble enlace exocíclico, transformando el C₁₆ en un grupo cetona (Esquema 19) (Zhang *et al.*, 2001).



Esquema 19. Reacción de ozonólisis para el ácido grandiflorénico

b. Reducción

b.1 Hidrogenación

Las reacciones de hidrogenación son aquellas en las que una o más moléculas de hidrógeno se adicionan a un enlace múltiple (Barazarte., 2008). Los alquenos reaccionan con hidrógeno (H₂) en presencia de paladio (Pd) o platino (Pt) para producir los alcanos correspondientes productos de la adición. El Pd se utiliza por lo general como un polvo muy fino soportado en un material inerte como el carbón vegetal (Pd/C),

para maximizar el área superficial, mientras que el Pt se utiliza comúnmente como dióxido de platino (PtO₂) (McMurry., 2012; Ogweno *et al.*, 2014). La hidrogenación catalítica, es un proceso heterogéneo, que se produce a temperatura ambiente, utilizando hidrógeno gaseoso a presión atmosférica. El proceso comienza cuando el hidrógeno molecular se adsorbe en la superficie del catalizador, y se disocia en átomos de hidrógeno, seguidamente el alqueno forma un complejo con el catalizador cuando el orbital vacío en el metal interactúa con el orbital pi (π) del alqueno. Posteriormente se transfiere un átomo de hidrógeno del metal a uno de los átomos de carbono del alqueno, formando un intermediario parcialmente reducido con un enlace carbono-hidrógeno (C-H) y un enlace sigma (δ) carbono-metal. Finalmente se transfiere un segundo átomo de hidrógeno del metal al segundo carbono, originando el alcano como producto y regenerándose el catalizador (Fig. 8). Este tipo de reacción se caracteriza porque presenta una estereoquímica *sin* y es extremadamente sensible al ambiente estérico alrededor del doble enlace (Sánchez *et al.*, 2014).

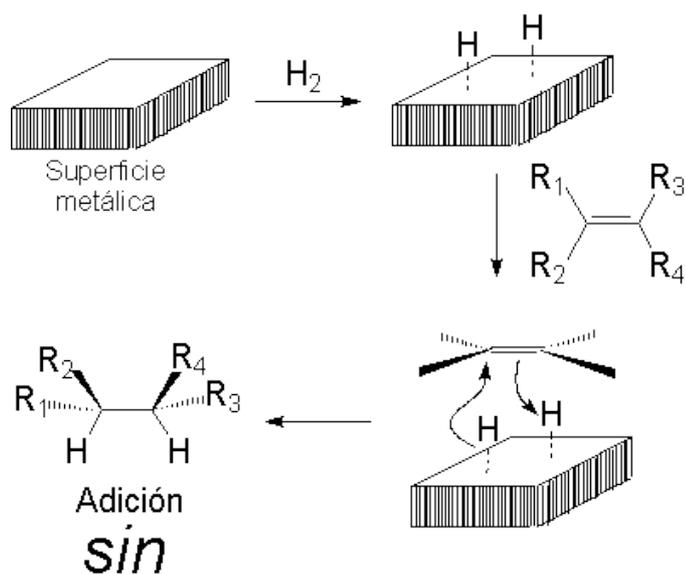
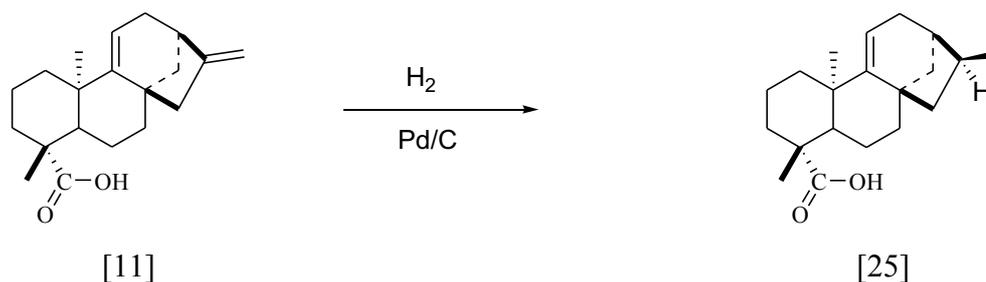


Figura 8. Mecanismo de hidrogenación de alquenos

Esta reacción ha sido de mucho interés para la obtención de derivados metilados, a partir de productos naturales que presentan en su estructura dobles enlaces, así el AG fue sometido a hidrogenación catalítica con PtO₂ en metanol obteniendo como

producto el ácido *ent*-kaur-9(11)-en-16 β -metil-19-oico [25] (Esquema 20) (Alonso *et al.*, 2006).



Esquema 20. Hidrogenación catalítica del ácido grandiflorénico

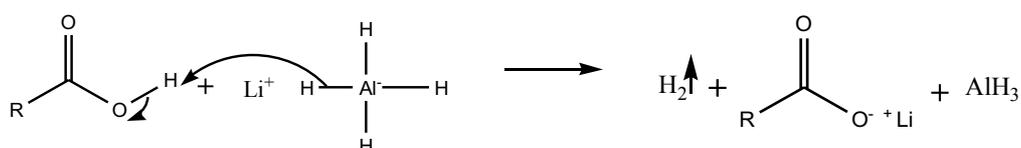
Durante un periodo de más de tres décadas la hidrogenación catalítica homogénea se ha estudiado ampliamente por muchos investigadores en el mundo académico y en la industria, y actualmente esta siendo considerada como una metodología idónea para la producción de compuestos bioactivos (Sturm *et al.*, 2002). Barazarte (2008) realizó la hidrogenación del ácido grandiflorénico metilado (AGM) en medio heterogéneo y homogéneo. Para la hidrogenación en medio heterogéneo se disolvió el sustrato en metanol seco y luego se añadió el Pd/C, a presión de 800 psi H₂ durante 12 horas a temperatura ambiente. La reacción de hidrogenación en medio homogéneo la llevó a cabo en un reactor, donde tanto el catalizador complejo diclorotetrakis (dimetilsulfóxido) de rutenio (II) [RuCl₂(DMSO)₄] como el AGM fueron disueltos en tolueno, usando presión 1000 psi H₂, temperatura 100 °C, durante 24 horas y la relación sustrato/catalizador fue 50:1, en la cual no observó la hidrogenación del enlace endocíclico debido al impedimento estérico, sin embargo, en la catálisis heterogénea si pudo ser evidenciada la hidrogenación del doble enlace interno indicando que el catalizador Pd/C es menos regioselectivo en comparación con el catalizador [RuCl₂(DMSO)₄].

b.2 Reducción con tetrahidruro de aluminio y litio (LiAlH₄)

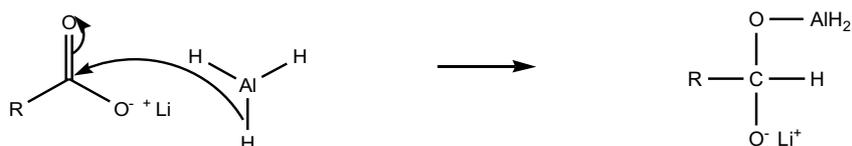
Las reacciones de reducción juegan un papel importante en la síntesis y hemisíntesis de productos naturales (Sivagurunathan *et al.*, 2011), debido a que implican la transferencia de hidruro (:H⁻); el agente reductor más usado en la reducción de grupos funcionales carbonilo (ácidos, ésteres, cetonas y aldehídos) es el tetrahidruro de aluminio y litio (LiAlH₄). Los ácidos carboxílicos y ésteres se reducen a alcoholes

primarios, la reducción es una reacción de sustitución nucleofílica en el grupo acilo en la que el $-H$ reemplaza al $-OH$ para dar un aldehído el cual se reduce posteriormente a un alcohol primario por una adición nucleofílica. Generalmente el tetrahydrofurano (THF) se utiliza como disolvente durante la reducción con $LiAlH_4$ a escala de laboratorio (Hori *et al.*, 2016). El mecanismo esencial de reducción de ácidos carboxílicos con $LiAlH_4$, puede resumirse como sigue (Wade., 2004):

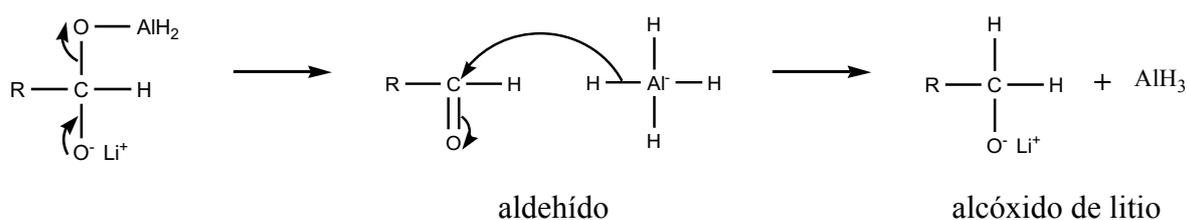
- (1) Desprotonación del ácido, se desprende hidrógeno y se obtiene una sal de litio.



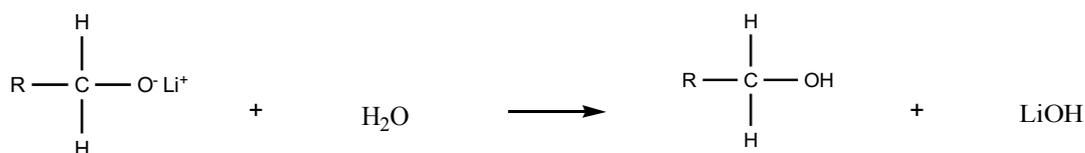
- (2) Adición de AlH_3 al grupo carbonilo del carboxilato de litio.



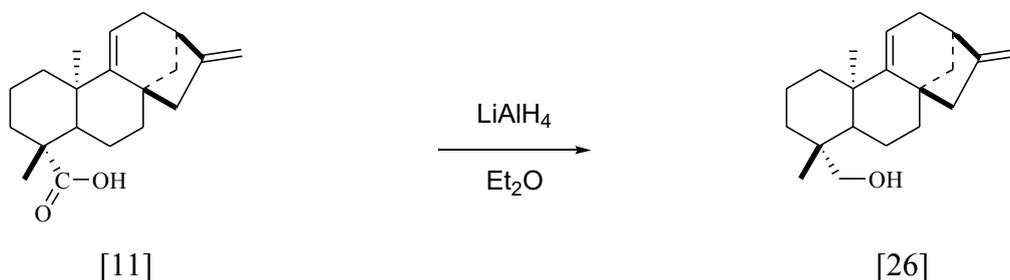
- (3) Formación de aldehído, el cual se reduce rápidamente a alcóxido de litio.



- (4) Adición de agua, protonando el alcóxido a alcohol primario.



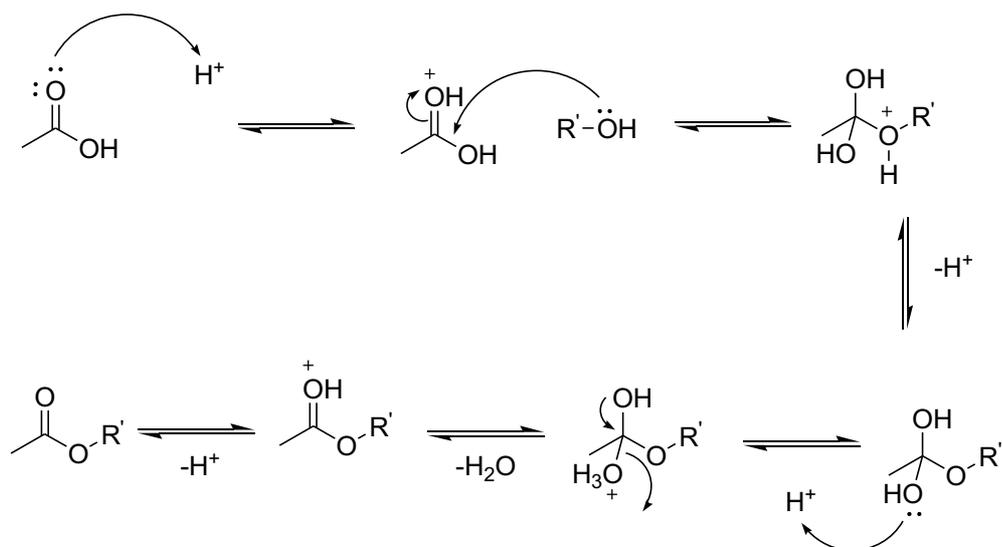
Hueso-Falcón *et al.*, (2010), hicieron reaccionar el AG con LiAlH_4 obteniendo el alcohol *ent*-Kaur-9(11),16-dien-19-ol [26] con un rendimiento de 81 % (Esquema 21).



Esquema 21. Reducción del ácido grandiflorénico con LiAlH_4

c. Esterificación

En 1895, Fischer constató que era posible la obtención de ésteres a través de la reacción de un ácido carboxílico con un alcohol en presencia de un ácido fuerte (HCl ó H_2SO_4), esta reacción es conocida como **esterificación de Fischer**, siendo uno de los principales métodos para la obtención de ésteres. La esterificación de Fischer es una reacción de sustitución nucleofílica del grupo acilo, en la cual el ácido mineral protona el átomo de oxígeno del grupo carbonilo, tornando al ácido carboxílico mucho más reactivo al ataque nucleofílico del alcohol, dando origen a un intermediario tetraédrico. Posteriormente la transferencia de un protón de un átomo de oxígeno a otro produce un segundo intermediario tetraédrico y convierte el -OH en un buen grupo saliente. Finalmente la pérdida de un protón y de agua regenera el catalizador ácido, originando un éster de acuerdo con el esquema 22 (Morais *et al.*, 2014).



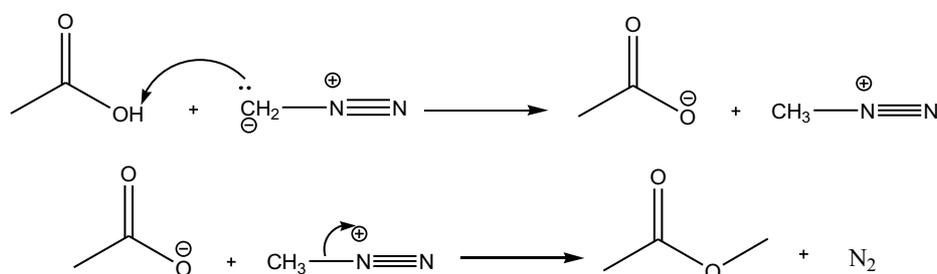
Esquema 22. Mecanismo general de esterificación de Fischer

Un método utilizado frecuentemente para la preparación de ésteres metílicos es mediante la reacción de ácidos carboxílicos con diazometano (CH_2N_2) (Esquema 23), el cual permite obtener ésteres en condiciones muy suaves, sin embargo es poco utilizada debido a la elevada toxicidad del diazometano (Graft *et al.*, 1990; McMurry., 2012).



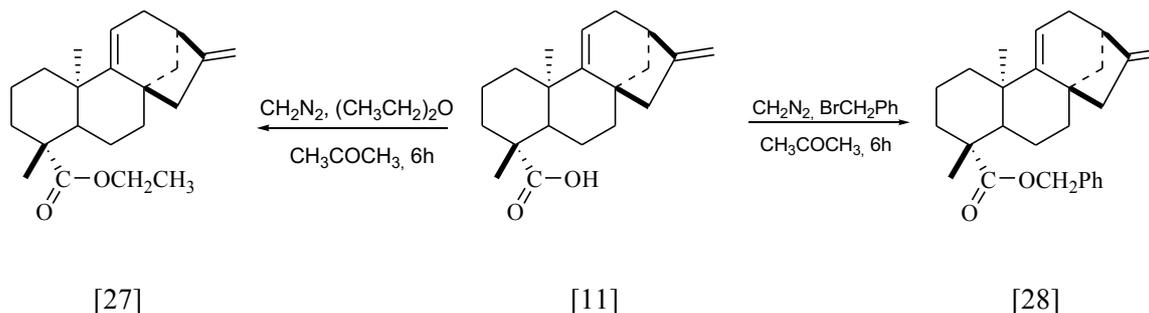
Esquema 23. Reacción de esterificación con diazometano

La reacción ocurre en dos pasos: (1) protonación del diazometano por el ácido carboxílico para producir el ión metildiazonio (CH_3N_2^+) y un ión carboxilato; y (2) la reacción del ión carboxilato con CH_3N_2^+ (Esquema 24).



Esquema 24. Mecanismo general de esterificación con diazometano (McMurry., 2012)

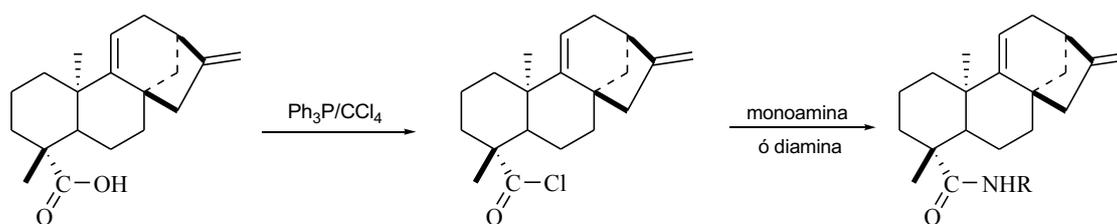
Los ésteres también pueden ser sintetizados a través de una reacción entre un anión carboxilato con un halogenuro de alquilo primario (McMurry., 2012). De acuerdo con lo anteriormente expuesto Hueso-Falcón *et al.*, (2010), lograron sintetizar ésteres a partir del AG al hacerlo reaccionar con diazometano en éter etílico $[(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{O}]$ durante 24 horas y bromuro de bencilo (BrCH_2Ph) en acetona por 6 horas obteniendo un rendimiento cuantitativo del éster etílico del 9(11),16-dien-*ent*-kaureno [27] y 88 % de éster bencilico del 9(11),16-dien-*ent*-kaureno [28] (Esquema 25).



Esquema 25. Ésteres formados a partir del ácido grandiflorénico

d. Formación de amidas

Las amidas son una clase importante de compuestos orgánicos que exhiben propiedades biológicas como antihelmínticos, antifúngicos, antibacterianos, antihistamínicos (Da Silva *et al.*, 2016). El método clásico para la síntesis de amidas es la reacción de ácidos carboxílicos con aminas a altas temperaturas, sin embargo, esta reacción es difícil debido a que las aminas son bases que convierten a los grupos carboxilos ácidos en sus aniones carboxilatos no reactivos, en tal sentido lo más común es la conversión del ácido carboxílico en un grupo funcional más reactivo como cloruro de ácido o activando el ácido carboxílico con dicitohexilcarboimida (DCC) (Shaabani *et al.*, 2007; Suresh *et al.*, 2015), en tal sentido nuevos diterpenos kaurenos monoamidas fueron sintetizados con buen rendimiento a partir del AG aislado de *Wedelia padulosa*; este ácido se hizo reaccionar con monoaminas (hexilamina, ciclohexilamina, anilina, morfolina) (Tabla 2) y diaminas (Esquema 26), y posteriormente se evaluó su efecto sobre la germinación de semillas, crecimiento y desarrollo de la raíz de *Lactuca sativa* (Diamantino *et al.*, 2008).



[11]

cloruro del 9(11),16-dien-*ent*-kaureno [29]

Esquema 26. Diterpenos kaurenos monoamidas sintetizados a partir del ácido grandiflorénico. Ph₃P: trifenilfosfina; CCl₄: tetracloruro de carbono.

Tabla 2. Monoaminas y diaminas empleadas para formar las monoamidas del esquema 26

Monoaminas		Diaminas	
Compuesto N°	R	Compuesto N°	R
a	-(CH ₂) ₅ CH ₃	e	-NH(CH ₂) ₂ NH ₂
b	-C ₆ H ₁₁	f	-NH(CH ₂) ₃ NH ₂
c	-C ₆ H ₅	g	-NH(CH ₂) ₄ NH ₂
d		h	

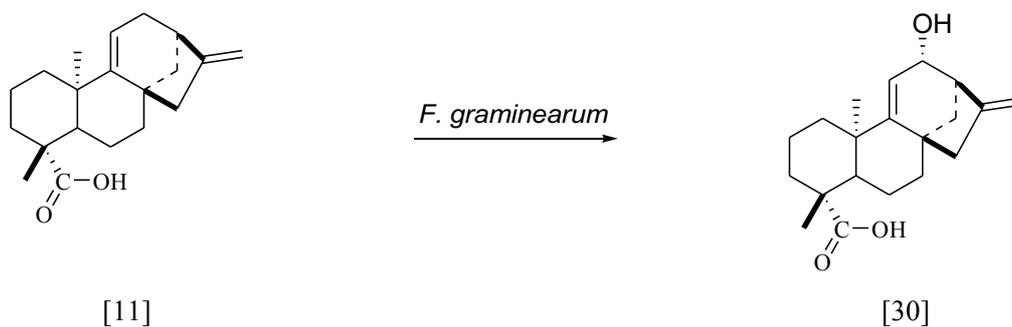
II.3.1.4 TRANSFORMACIONES MICROBIOLÓGICAS REALIZADAS AL ÁCIDO GRANDIFLORÉNICO

El interés en la obtención de compuestos naturales ha aumentado la investigación acerca de la producción biotecnológica de estas sustancias. Estos productos pueden extraerse del material vegetal, pero algunos de los compuestos presentes en las plantas, que exhiben excelentes propiedades ya sea como agentes aromatizantes, saborizantes o como productos farmacéuticos, no están disponibles en cantidades industriales. Por este motivo se hace necesaria su síntesis a partir de precursores con mayor disponibilidad y menor valor comercial, empleando biocatalizadores para conservar la denominación de “natural”, debido a que la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos ha definido como “sustancias naturales”, únicamente a aquellas que pueden obtenerse por procesos físicos, enzimáticos o microbianos a partir de precursores aislados de la naturaleza (Rojas *et al.*, 2009).

La transformación microbiológica de compuestos orgánicos es una metodología de síntesis valiosa para llevar a cabo reacciones regio- y estereoselectiva (Vieira *et al.*, 2002). Ésta constituye una de las pocas metodologías disponibles para la funcionalización de átomos de carbono inactivos haciendo posible las reacciones que no tienen equivalente en la química convencional (Silva *et al.*, 2002).

En este sentido, muchos compuestos de interés terapéutico y/o industrial se obtienen por transformaciones microbiológicas (Silva *et al.*, 1999). Entre los sustratos utilizados con fines biocatalíticos se encuentran los terpenos, así encontramos que varios diterpenos han sido biotransformados por microorganismos tales como *Cephalosporium aphidicola*, *Gibberella fujikuroi*, *Candida rugosa*, *C. antartica*, *Pseudomonas sp.*, *Aspergillus niger* y *Fusarium moniliforme* (García *et al.*, 2007; Rojas *et al.*, 2009).

De esta forma, Ruan *et al.*, (2014), llevaron a cabo la transformación microbiológica del AG utilizando *Fusarium graminearum*, hongo patógeno responsable de la fusariosis en muchas partes del mundo; esta enfermedad destructiva afecta trigo, cebada y otros granos pequeños, destruyendo cultivos en pocas semanas (Goswami y Kistler., 2004; Palazzini *et al.*, 2016). Los autores observaron que el sustrato fue metabolizado completamente por el hongo a las 72 horas, formando como único producto al ácido 12 α -hidroxigrandiflorénico [30] (Esquema 27); determinando que *Fusarium graminearum* es una herramienta biocatalítica útil para la obtención de nuevas moléculas con posibles aplicaciones farmacológicas a partir de diterpenos *ent-*kauranos.



Esquema 27. Biotransformación del ácido grandiflorénico por *F. graminearum*

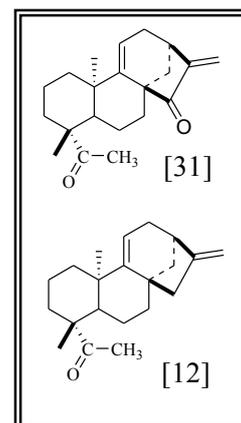
II.3.1.5 ACTIVIDADES BIOLÓGICAS Y RELACIÓN ESTRUCTURA

ACTIVIDAD REPORTADAS PARA EL ÁCIDO GRANDIFLORÉNICO

- a. **Actividad antiinflamatoria:** La inflamación fue descrita por Celsus en el año 10 antes de Cristo como enrojecimiento e hinchazón con calor y dolor. En los últimos años ha sido creciente la cantidad de publicaciones e investigaciones alrededor de la comprensión de los mecanismos y de las moléculas involucradas en el proceso inflamatorio. En el proceso global intervienen muchos mecanismos, algunos mediados por una variedad de moléculas de señalización, además de la activación de los factores de complemento (Nathan, 2002).

Las citoquinas representan un grupo multifuncional de sustancias mensajeras que transportan información de una célula a otra, responsable de la inducción de varias enzimas por ejemplo la óxido nítrico sintetasa (NOS), pueden ser clasificadas como pro o anti-inflamatorias dependiendo de la vía en la que participen en la inflamación; en el grupo de las citoquinas pro-inflamatorias tenemos la interleuquina 1 (IL1), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), las IL6 e IL8, involucradas en la iniciación y amplificación de los procesos inflamatorios. En el grupo de las citoquinas anti-inflamatorias tenemos la IL10, el factor- β transformador de crecimiento (TGF- β) y el activador natural del receptor de la interleuquina 1 (IRA), los cuales modulan negativamente los eventos inflamatorios (Grisham *et al.*, 1999; Szekanecz *et al.*, 2006). Una citoquina a su vez induce su propia producción y la de otras citoquinas, a través de la activación de algunos factores de transcripción nuclear como el factor nuclear *kappa* B (NF- κ B), que regula muchos genes indispensables para el mantenimiento de la inflamación. Las citoquinas TNF- α e IL1 constituyen los principales mediadores de respuesta biológica a los lipopolisacáridos (LPS) bacterianos y otros estímulos infecciosos. Ambas, TNF- α y IL1, incrementan la expresión de varios tipos de genes, por medio de activación de NF- κ B, el cual al ser activado puede migrar al núcleo y estimular la transcripción específica de determinados genes mediadores de procesos inflamatorios. NF- κ B, juega un importante rol en la inflamación, por regulación de los genes involucrados en estos procesos (Gilmore, 2006). Por otro lado, se ha encontrado elevados niveles

de óxido nítrico (NO) en patologías como artritis reumatoidea, inflamación crónica intestinal. El NO es sintetizado en cantidades equimoleculares por óxido-reductasas conocidas como NOS, se conocen tres isoenzimas de la NOS: iNOS ó NOS 2, eNOS ó NOS 3 y NOS 1. La NOS 2 es una enzima inducida en macrófagos, hepatocitos, neutrófilos y en células de la musculatura lisa y del endotelio vascular, como respuesta a diferentes estímulos inmunológicos tales como el TNF- α y el LPS bacteriano, además cataliza la producción de gran cantidad de NO, que puede ser tóxico en ciertas circunstancias o para ciertos grupos celulares. El NO puede funcionar como una molécula pro-inflamatoria, mediante la activación de las enzimas ciclooxigenasa (COX) y con ello aumentar la producción de las prostaglandinas (PGs). Las otras dos isoformas de NOS, producen NO en pequeñas cantidades y son las responsables de los niveles normales de este gas en el organismo (Grisham *et al.*, 1999). Esto proporciona los fundamentos para el diseño de fármacos que modulen selectivamente concentraciones de NO. De acuerdo con lo explicado anteriormente Hueso-Falcón *et al.*, (2011), evaluaron *in vitro* la actividad antiinflamatoria del AG y nueve derivados sintéticos, de los cuales solo dos compuestos el éster metílico del 9(11)-16-dien-*ent*-kaureno [12] y éster metílico de 15-oxo-9(11)-16-dien-*ent*-kaureno [31] fueron capaces de inhibir la producción de óxido nítrico (NO) con una concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) entre 2 y 10 μ M. Para descartar que el efecto inhibitorio se deba a citotoxicidad analizaron el porcentaje de viabilidad celular por el ensayo MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromuro), demostrando que los compuestos no eran citotóxicos a concentración máxima evaluada de 25 μ M. Así mismo determinaron que son inhibidores potentes de la expresión de la enzima NOS-2; también se determinó la inhibición de la activación de NF- κ B, el cual podría ser el mecanismo implicado en el efecto antiinflamatorio de los derivados del kaureno, además determinaron inhibición de las citoquinas IL-6, IL-1, y TNF- α , después de la estimulación con lipopolisacárido. Estos resultados indican que los derivados del kaureno pueden ser utilizados para el diseño de



nuevos agentes antiinflamatorios, y se establecieron algunas relaciones estructura actividad que se describen a continuación:

- Es importante la presencia del doble enlace endocíclico C₉-C₁₁ para la actividad antiinflamatoria.
- El doble enlace exocíclico C₁₆-C₁₇ juega un papel importante para la actividad antiinflamatoria, la hidrogenación del mismo anula la actividad.
- La esterificación en C₁₉ del AG incrementa la actividad antiinflamatoria (los ésteres metílicos presentaron mayor actividad antiinflamatoria que el AG y su alcohol derivado).
- Ésteres en C₁₉ con hidroxilo (-OH) en posición C₁₅ ó -COOH en C₁₉ con grupo carbonilo (C=O) en C₁₅ incrementan la actividad antiinflamatoria.

b. Actividad cicatrizante: Los avances científicos sobre los fenómenos que participan en las heridas de la piel han incrementado la búsqueda de compuestos que puedan acelerar la cicatrización (Casaroli *et al.*, 2006). Los terpenoides son conocidos por ser promotores en los procesos de cicatrización debido a sus propiedades astringentes y antibacterianas (Scortichini y Pia., 1991). Balekar *et al.*, (2013), evaluaron *in vitro* el papel del AG en diferentes fenómenos involucrados en el proceso de cicatrización, para ello utilizaron cultivos celulares de fibroblastos dérmicos ATCC CRL-2522; macrófagos RAW 264.7, queratinocitos HaCaT, evaluaron citotoxicidad sobre estas células, determinaron contenido de colágeno, niveles de TGF- β 2 (Factor de crecimiento de transformación beta 2), NO, TNF- α (Factor de necrosis tumoral alfa), y IL-1 β . El AG (2,5 μ g/mL) no produjo citotoxicidad sobre fibroblastos dérmicos y queratinocitos humanos con un porcentaje de viabilidad de 116 % y 106 % respectivamente, el porcentaje de migración de fibroblastos fue del 100 % y el contenido de colágeno en los fibroblastos incremento después de tratarlo con AG a las concentraciones de 2,5 μ g/mL; 1,25 μ g/mL y 0,65 μ g/mL. Por el contrario los niveles de TGF- β 2 producidos por queratinocitos después de la exposición al AG (2,5 μ g/mL) no provocó cambios significativos, y tampoco mostró

incremento en el número de queratinocitos. Con respecto a la viabilidad sobre células RAW 264.7 fue de 90% y en las mismas no fue detectada producción de NO, y los niveles de IL-1 β y TNF- α luego de la exposición al AG (2,5 μ g/ml) fueron bajos. El ensayo de citotoxicidad permitió evaluar la actividad biológica del compuesto, pues el % de viabilidad fue alto en todas las células estudiadas. Los fibroblastos son células del tejido conectivo responsables de la producción y deposición del colágeno necesarios para la reparación del tejido dañado. TGF- β 2 esta involucrado en la regulación de la proliferación, adhesión, migración, y deposición de las células en la matrix extracelular, el NO se produce durante la inflamación, concentraciones bajas son potencialmente beneficiosas. IL-1 β y TNF- α favorecen los procesos inflamatorios, y a concentraciones de 10 ng/mL no son tóxicos para los queratinocitos.

El mismo año Balekar *et al.*, reportaron resultados similares cuando estudiaron el efecto estimulante *in vitro* del AG sobre células fibroblastos L929. El incremento del contenido de colágeno en fibroblastos luego de ser tratadas con AG (2,5 μ g/mL) fue de 95 μ g/mL, y la tasa de migración fue de 98,9 %.

Los resultados de estos estudios proporciona evidencia científica de que AG tiene actividad potencial de curación de heridas y puede ser utilizado como agente monoterápico para la cicatrización o se puede combinar con otro agente cicatrizante para efectos sinérgicos.

- c. Actividad antibacteriana:** Los ácidos kaurénico y grandiflorénico destacan por la actividad antibacteriana, los estudios han demostrado que dicha actividad es preferentemente frente a bacterias Gram positivas a dosis que oscilan entre 5 y 1000 μ g/mL, sin embargo, no se ha establecido su mecanismo de acción y relación-estructura actividad. Peña *et al.*, (2009), evaluaron la actividad antibacteriana del AG por el método de difusión en agar sobre *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Escherichia coli* (ATCC 25992), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), reportaron actividad antibacteriana solo frente a *S. aureus* a CMI de 1600 μ g/mL, establecen que la posición C₁₅ debe estar libre para que exista actividad antibacteriana. También se ha reportado actividad

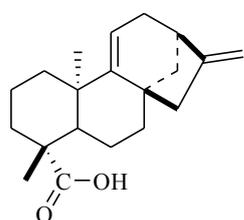
antibacteriana sobre *Bacillus subtilis* con CMI de 0,625 µg/mL (Slimestad *et al.*, 1995)

Balekar *et al.*, (2012) evaluaron la actividad antibacteriana de extractos etanólicos preparados a partir de las hojas de *Wedelia trilobata* (L) por el método de microdilución sobre bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* TISTR 517) y Gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853). El AG fue aislado de la cuarta fracción obtenida con un rendimiento de 41 %, siendo esta fracción la que presentó mayor actividad antibacteriana sobre *S. aureus* (CMI 15,62 µg/mL-CMB 31,5 µg/mL) y *S. epidermidis* (CMI 7,81 µg/mL-CMB 15,62 µg/mL) y actividad moderada sobre *E. coli* (CMI 500 µg/mL) y *P. aeruginosa* (CMI 1000 µg/mL).

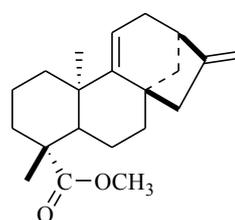
- d. Actividad antifúngica:** La actividad del AG contra el hongo patógeno de plantas *Cladosporium cucumerinum* fue evaluada a través de ensayos bioautograficos, resultando inactivo (Slimestad *et al.*, 1995).
- e. Actividad tripanomicida:** El protozoario *Trypanosoma cruzi* es el agente causante de la enfermedad de Chagas ó Tripanosomiasis americana, enfermedad que afecta a los países tropicales. Batista *et al.*, (1999), aislaron del extracto etanólico de *Wedelia padulosa* al AG, y fue evaluada su actividad *in vitro* sobre los tripamostigotas de *T. cruzi*. Los resultados obtenidos demostraron que el AG causa la lisis total de los tripomastigotas a una concentración de 0,68 mg/ml.
- f. Actividad antimalárica:** Enfermedades parasitarias como la Malaria, se han convertido en un problema de salud pública en gran parte del mundo, principalmente en países que se encuentran ubicados en regiones tropicales y subtropicales de nuestro planeta. Esta enfermedad es causada por un parásito del género *Plasmodium* y transmitida por la picadura de la hembra del mosquito *Anopheles*, la cual se reproduce en regiones que combinan factores como calor, humedad y vegetación óptimos para su desarrollo. Las principales especies de *Plasmodium* que afectan al hombre son: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* y el más severo *Plasmodium falciparum*, que presenta la más alta tasa de morbilidad dentro de las enfermedades de este tipo y es la tercera

ura 9. Compuestos evaluados sobre *P. falciparum* resistente a cloroquina. (AG) ácido didiflorénico; [32] metil *ent-9β*:11,16β-diepoxi-kauran-19-ato; [33] metil *ent-9β*:11,16α-oxi-kauran-19-ato.

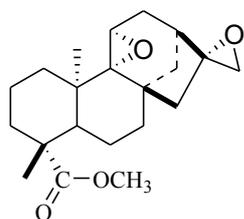
causa de muertes por infección después de la tuberculosis y la infección por VIH (Mendoza., 2004; Torres *et al.*, 2014). La resistencia del *Plasmodium falciparum* a las drogas antimaláricas presenta un serio problema no solo para el tratamiento de los casos individuales, sino también para las programas de control y erradicación. Existe una amplia distribución de cepas resistentes a la cloroquina, uno de los esquizotocidas sanguíneos de mayor utilización y quizá su continua administración y la automedicación con dosis subcurativas han contribuido a la extensión del fenómeno (Espinal *et al.*, 1981; Blair *et al.*, 2001). Batista *et al.*, (2013), evaluaron la actividad antimalarica *in vitro* del AG, éster y époxi-derivados sobre *P. falciparum* resistente a cloroquina. El AG presentó moderada actividad con C_{150} igual a 23,3 μM , mientras que para el éster metílico [12] el C_{150} fue igual a 8,2 μM , indicando que la esterificación del grupo carboxilo en C_{19} mejora la actividad antiplasmódica. Con respecto a la actividad de los epóxidos en C_{16} - C_{17} , determinaron que la actividad disminuye cuando presenta configuración *ent-β* [32] (C_{150} =10,4 μM), lo contrario observaron cuando la configuración es *ent-α* [33] (C_{150} =6,9 μM) (Fig. 9).



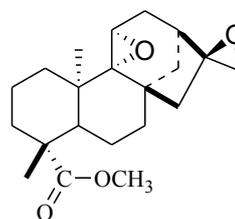
[11]



[12]



[32]

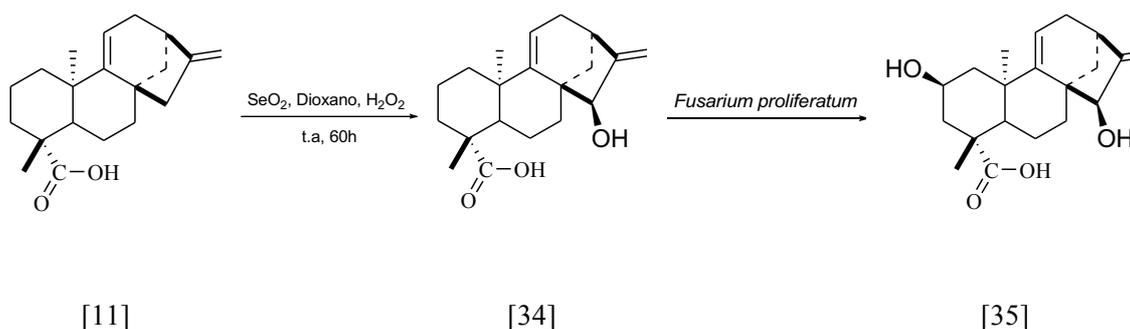


[33]

- g. Efecto antialimentario e insecticida:** Acosta y Torrenegra (2011), evaluaron la actividad antialimentaria y el efecto insecticida del AG sobre un gusano proveniente de una especie Lepidóptera. El ensayo biológico consistió en adicionar a la dieta del gusano 1 % de AG reportando una menor supervivencia de este. Asimismo determinaron el porcentaje de AG presente en hojas de *Espeletia killipii* sanas e infectadas por el insecto, reportaron que las hojas sanas presentan un 4,8 % de AG mientras que en las hojas infectadas se determinó un aumento del 10 %. El extracto etéreo de *Espeletia killipi*, del cual se aisló el AG en mayor proporción, presentó actividad tóxica frente al gusano blanco de la papa *Pemnotrypes vorax*, H., encontrando, que el derivado del kaureno, es el responsable de esta actividad con una DL50 de 0,005 % (Marín y Pedrozo., 1997). Este ácido ha mostrado actividad insecticida frente al mosquito *Aedes aegypti*, con una dosis letal 100 (DL₁₀₀) de 250 ppm, actividad de relevante importancia ya que éste es el vector de la fiebre amarilla (Slimestad *et al.*, 1995).
- h. Actividad alelopática:** Ciertas sustancias producidas por las plantas pueden interactuar con otras especies vegetales, cuando son liberadas al medio ambiente, influyendo directamente sobre el desarrollo y crecimiento de otra planta, este fenómeno se denomina alelopatía. Casi la totalidad de las moléculas caracterizadas como agentes alelopáticos son metabolitos secundarios, sin embargo, muchos de los productos naturales son fitotóxicos pero solo algunos de estos pueden ser alelopáticos (Ayala., 2010; García *et al.*, 2013).

Duarte *et al.*, (2010), evaluaron la actividad alelopática sobre la germinación y crecimiento de la raíz y el tallo de *Lactuca sativa* del ácido *ent-2 α ,15 α -dihidroxi-kaur-16-en-19-oico* [35] producto de la biotransformación del ácido *ent-15 α -hidroxi-kaur-9(11),16-dien-19-oico* [34] por el hongo *Fusarium proliferatum* CML287 (Esquema 28).

por el hongo *Fusarium proliferatum*.



El ácido *ent*-2 α ,15 α -dihidroxi-kaur-16-en-19-oico inhibió el crecimiento de la raíz y el tallo en un 100 % a una concentración de 10^{-4} mg/mL. Sin embargo, Diamantino *et al.*, (2008) reportaron que el AG y su amida derivada de piperazina (h) estimulan fuertemente el crecimiento de los brotes (semillas germinadas) y la raíz de *Lactuca sativa* ambos a concentración de 10^{-7} M, efecto contrario presentaron las demás monoamidas derivados. Con respecto a la germinación de la semilla, el AG y todas las monoamidas presentaron un efecto inhibitorio, exepcto la monoamida derivada del 1,4-butilendiamida (g) (Tabla 2) que estimulo la germinación a una concentración de 10^{-7} M. Iguales resultados fueron reportados por Vieira *et al.*, (2005) para el AG pero a concentración de 10^{-3} M.

- i. Actividad antineoplásica:** Diferentes autores han desarrollado baterías de pruebas *in vitro* para predecir los efectos tóxicos de compuestos químicos, utilizando como modelos experimentales líneas celulares establecidas, en las cuales se determina la alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a un daño que puede ser detectado, esto es conocido como citotoxicidad celular (Arencibia *et al.*, 2009). Estos experimentos *in vitro*, tienen el propósito de determinar la potencial citotoxicidad de los compuestos estudiados, debido a que estos serán usados como fármacos, cosméticos y deben demostrar que no son tóxicos o porque van a ser usados como agentes antineoplásicos y la citotoxicidad es crucial para su acción (Castro., 2006).

Batista *et al.*, (2013), evaluaron la citotoxicidad del AG, ésteres y epóxidos derivados (Fig. 10) en líneas celulares de tumores humanos que representaban

diversos órganos y tejidos, incluyendo próstata (DU-145), ovario (IGROV, IGROV-ET), melanoma (SK-MEL-28), pulmón (A-549), leucemia (K-562), colon (HT-29, HT-29-KF, LoVo) y cuello uterino (HELA, HELA-APL). Ninguno de los compuestos ensayados presentó citotoxicidad, sin embargo, se ha reportado que el AK y AG, presentan citotoxicidad moderada contra varias líneas de células neoplásicas humanas con valores de concentración a la cual se inhibe el 50 % de las células cancerosas (GI₅₀) entre 10-30 µM (Ryu *et al.*, 1996; Ruiz *et al.*, 2008; Alvarado *et al.*, 2010).

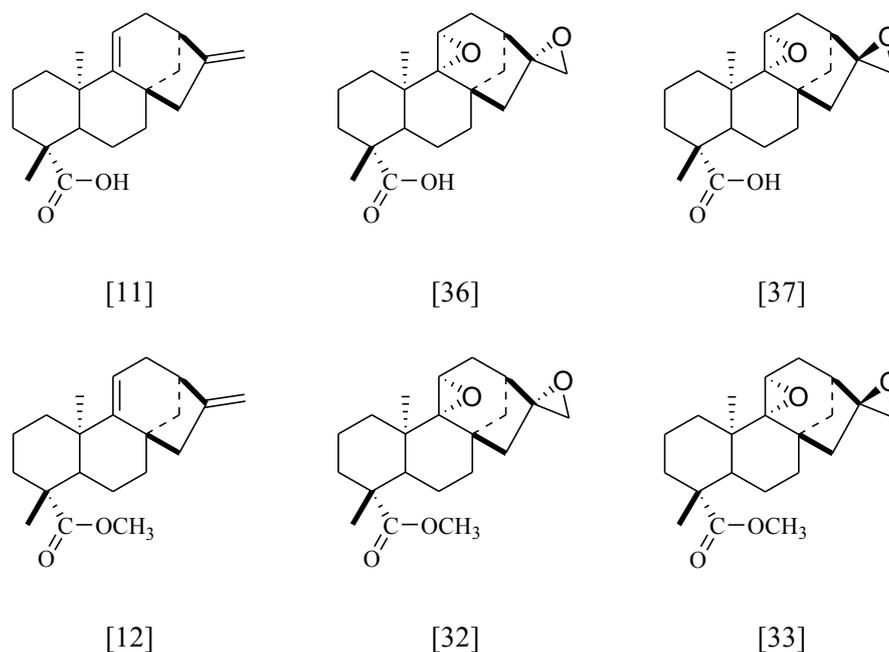
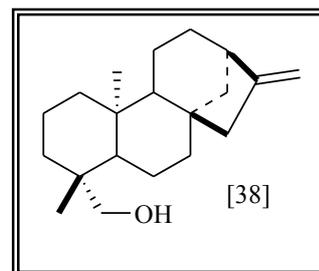


Figura 10. Compuestos evaluados sobre líneas celulares de tumores humanos. (AG) ácido grandiflorénico; [36] ácido *ent*-16 β -epoxi-kauran-19-oico; [37] ácido *ent*-16 α -epoxi-kauran-19-oico; [32] metil *ent*-9 β :11,16 β -diepoxi-kauran-19-ato; [33] metil *ent*-9 β :11,16 α -diepoxi-kauran-19-ato.

- j. **Actividad sobre el sistema cardiovascular:** los diterpenos han sido vinculados con actividad cardiovascular específicamente efecto vasodilatador, Mondolis *et al.*, (2013), estudiaron en ratas machos Sprague-Dawley el efecto vasodilatador “*in vitro*” del AG y el *ent*-kaur-16-en-9-ol [38] sobre anillos de aorta con endotelio intacto y endotelio desnudo (desprovisto de endotelio). El AG presentó actividad de vasodilatación independiente del endotelio con valor máximo de relajación igual a 79,27 % a una concentración de 10⁻⁴ M, mientras que el compuesto 38 no mostró efecto



significativo (valor máximo de relajación 26,36 %). Estos resultados demostraron la importancia del grupo carboxilo en carbono 19 (C₁₉) para la vasodilatación, previamente reportado por Ambrosio *et al.*, (2004), quienes evaluaron el rol del grupo carboxílico en el carbono 19 (C₁₉) del AK, determinando que al metilar este grupo se elimina por completo el efecto vasodilatador. Estas investigaciones apoyan la idea de que el AG es una fuente prometedora de nuevos fármacos prototipos para el desarrollo de agentes terapéuticos cardiovasculares.

- k. Toxicidad:** El objetivo principal de la investigación no es solo aislar moléculas con estructuras novedosas, sino aislar nuevos compuestos bioactivos que tengan aplicaciones potenciales o puedan servir como compuestos guías para las modificaciones sintéticas, los cuales posteriormente son sometidos a bioensayos para determinar su actividad biológica. La metodología para la búsqueda de nuevas sustancias con actividad citotóxica es muy variada, sin embargo existen algunos reportes donde se propone el método de nauplios de *Artemia salina* (Fig. 11), como un estudio inicial para dirigir la búsqueda de compuestos citotóxicos (Meyer, 1982). Un lugar sobresaliente dentro del grupo de bioensayos más utilizados para la investigación de productos naturales lo ocupa el ensayo de *Artemia* spp. Este es un ensayo general de amplio uso que determina el efecto letal de los compuestos y/o extractos en larvas de *Artemia* spp., y de esta manera se predice su habilidad para producir la muerte de células cancerígenas en cultivo de tejidos, matar insectos y/o ejercer un amplio rango de efectos farmacológicos. La *Artemia* spp. son camarones minúsculos de cuerpo blando, de color carmelita y transparente a la luz; hasta la fecha es el único género animal en todo el mundo cuyos quistes está disponible comercialmente de manera continua, como fuente de alimentos para peces y crustáceos en acuicultura. Esto ha constituido un elemento clave para su utilización en ensayos biológicos ya que la disponibilidad permanente de huevos (quistes) permite obtener larvas ofreciendo las siguientes ventajas: no hay necesidad de mantener una colonia viva



Figura 11. *Artemia salina*

(Solis *et al.*, 1993)

permanentemente, las pruebas pueden realizarse dónde y cuándo sea necesario, se dispone siempre de un número suficiente de individuos de la misma edad y condición fisiológica (Pérez y Lazo., 2010).

La toxicidad del AG fue evaluada a través del ensayo con *Artemia salina*. Para obtener las larvas se agregaron los huevos en solución de sal marina, y se dejaron durante 24 horas a temperatura entre 27-30 °C con luz artificial. La concentración inicial del AG fue de 1 mg/mL en DMSO, posteriormente se tomaron alícuotas de 100 µL, 50 µL, 25 µL, y 12,5 µL las cuales fueron diluidas con solución de sal marina que contenían de 10 a 20 metanauplios, se utilizó como control positivo el lapachol en DMSO. Luego de 24 horas contaron el número de sobrevivientes y se determinaron la concentración letal 50 (CL₅₀). El AG presentó una actividad citotóxica de 29,8 µg/mL (Batista *et.al.*, 2009), indicando que presenta menor toxicidad que el AK (CL₅₀=16 µg/mL) (Fatope *et al.*, 1996).

III. HIPÓTESIS

III. HIPÓTESIS

En vista de que estudios realizados con anterioridad demuestran que transformaciones químicas han mejorado la actividad farmacológica de derivados del *ent*-kaureno, se espera que tanto el ácido grandiflorénico como los derivados hemisintéticos obtenidos presenten actividad antibacteriana [*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922)], antifúngica [(*Candida albicans* (CDC 385), *Candida krusei* (ATCC 6258)] y antiinflamatoria.

IV. OBJETIVOS

IV. OBJETIVOS

IV.1 Objetivo general

1. Realizar modificaciones estructurales del ácido grandiflorénico aislado de la planta *Coespeletia moritziana* y evaluar la actividad biológica de los derivados obtenidos.

IV. 2 Objetivos específicos

1. Hemisíntesis del *ent*-kaur-9(11),16-dieno-19-ol a partir del ácido grandiflorénico a través de la reducción con LiAlH_4 del ácido carboxílico en posición 19.
2. Obtención de los ésteres derivados a partir del *ent*-kaur-9(11),16-dieno-19-ol a través de la reacción de esterificación de Steglich.
3. Obtención del 9(11),16-dien-19-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil-*ent*-kaureno a partir del ácido grandiflorénico.
4. Caracterizar los derivados obtenidos mediante técnicas espectroscópicas: espectroscopía Infrarroja (IR), espectrometría de Masas (EM), espectroscopía de resonancia magnética nuclear ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$).
5. Evaluar la actividad antibacteriana del ácido grandiflorénico y sus derivados hemisintéticos por el método de microdilución sobre *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), y *Escherichia coli* (ATCC 25922).
6. Evaluar la actividad anfúngica del ácido grandiflorénico y sus derivados hemisintéticos por el método de difusión en agar sobre *Candida albicans* (CDC 385) y *Candida krusei* (ATCC 6258).
7. Evaluar la actividad antiinflamatoria *in vivo* del ácido grandiflorénico y sus derivados hemisintéticos por el método de edema auricular inducido por xilol sobre ratones BIO:NMRI a dosis de 64 mg/kg; 32 mg/kg; y 16 mg/kg.

V. TÉCNICAS GENERALES

V. TÉCNICAS GENERALES

V.1 Reacción de esterificación de Steglich

Esta reacción es un método conveniente para la esterificación de ácidos carboxílicos con alcoholes, fenoles y tioles bajo condiciones suaves en presencia de carboimidias como 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCI) y dicitclohexil carboimida (DCC) (Neisis y Steglich., 1978; Sethi *et.al.*, 2012; Srivastava *et.al.*, 2016; Huang *et.al.*, 2016). En el esquema 29 se muestra la reacción general de esterificación.



Esquema 29. Esterificación de Steglich

Este procedimiento depende de la alta eficiencia de la 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (Fig. 12) como catalizador nucleofílico en reacciones de transferencia de grupo. Generalmente se emplea como disolvente el diclorometano (DCM), sin embargo pueden ser usados otros solventes apróticos de polaridad comparable como el dietiléter, tetrahidrofurano, y acetonitrilo. La reacción puede ser aplicada a una amplia variedad de ácidos y alcoholes, incluyendo polialcoholes, y aminoácidos N-protectidos (Hassner y Alexaniam., 1978; Norouzi *et.al.*, 2016). También el método es muy conveniente para la síntesis de una amplia variedad de ésteres tiólicos (Hasember., 2012). El primer evento de la reacción es la formación de la *O*-acilurea, la cual es atacada por el carboxilato en exceso para formar el anhídrido, liberándose como coproducto dicitclohexilurea. En el esquema 30 se presenta el mecanismo de reacción.

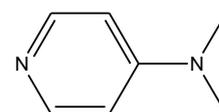
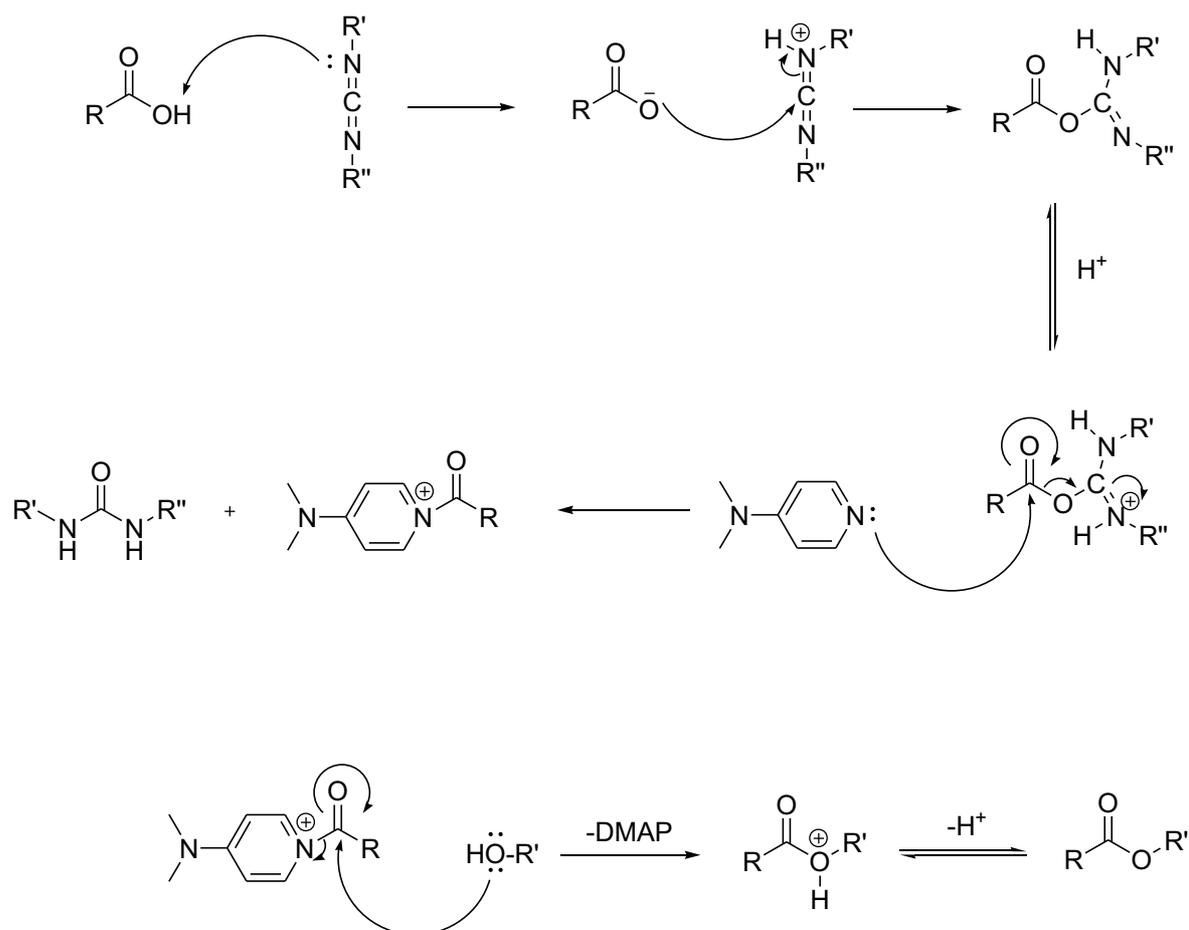


Figura 12. 4-dimetilaminopiridina [39]



Esquema 30. Mecanismo de esterificación de Steglich

V.2 Técnicas Cromatográficas

La cromatografía puede definirse como una técnica que separa una mezcla de solutos basada en la velocidad de desplazamiento diferencial de los mismos que se establece al ser arrastrados por una fase móvil (líquida o gaseosa) a través de un lecho cromatográfico que contiene la fase estacionaria, la cual puede ser líquida o sólida. Las propiedades de los componentes de una mezcla determinan su movilidad entre sí y con respecto a la fase móvil. La base de la separación cromatográfica será, por tanto, la diferencia en la migración de los mismos (Gutiérrez *et.al.*, 2009).

V.2.1 Cromatografía en capa fina (CCF)

Por este método la muestra para análisis se aplica por medio de un tubo capilar en la superficie de una capa fina adsorbente en forma de banda, punto o mancha y es adsorbida en la superficie por la acción de fuerzas electrostáticas (Fuerzas de Van der

Waals, puentes de hidrógeno, efectos inductivos). Los adsorbentes más utilizados son gel de sílica, alumina, tierra silíceas, celulosa y poliamidas. Como soportes del adsorbente se utilizan láminas o placas de vidrio, plásticas o metálicas (Olivé *et.al.*, 1994).

La placa seca se coloca en el tanque cromatográfico o cámara, en el cual debe encontrarse saturado el eluyente (Fase Móvil líquida). El eluyente ascenderá o desplazará por capilaridad en la placa y arrastrará los componentes a lo largo de ésta produciendo “manchas” que representan a los componentes, la separación se da por migración diferencial, es decir que la fase móvil arrastra a las sustancias apolares y aquellas más polares son retenidas por la fase estacionaria dando lugar a la separación. Posteriormente se evapora el eluyente y la placa se analiza por medio de métodos químicos en el que por inmersión o rociado se obtienen derivados coloreados o fluorescentes o por medio de métodos físicos ópticos utilizando radiación UV o luz visible (Braithwaite., 1994).

V.2.2 Cromatografía en Columna (CC)

Es el método más utilizado para la separación de compuestos orgánicos. La fase estacionaria se deposita en el interior de una columna de vidrio rellena de alumina (Al_2O_3), sílica u óxido de magnesio que termina con una placa porosa que impide su paso y en un estrechamiento con una llave. La mezcla se deposita sobre la parte superior de la fase estacionaria mientras que la fase móvil atraviesa el sistema. Los compuestos van saliendo por separado de la columna y se recogen en fracciones, los más polares quedan más retenidos y para que salgan generalmente hace falta aumentar la polaridad del disolvente (Marti *et.al.*, 2003).

La fase móvil se encuentra formada por la solución que lentamente va atravesando la fase estacionaria. La solución que sale al final de la columna se reemplaza constantemente por nueva solución que se suministra desde un contenedor por la parte superior de la columna. La migración de las sustancias de la mezcla a través de la columna se encuentra retardada en diferente grado por las interacciones diferenciales que cada una de ellas pueda ejercer con la fase estacionaria. Las sustancias se separan gradualmente formando bandas dentro de la banda total, la separación, y por tanto la resolución, aumenta con la longitud de la columna. La banda

individual de cada sustancia puede ensancharse con el tiempo debido a procesos difusionales, disminuyendo por tanto la resolución (Olivé *et.al.*, 1994).

V.3 Técnicas Espectroscópicas

Cada vez que se efectúa una reacción o que un nuevo compuesto se encuentra en la naturaleza, su estructura debe ser determinada, con ayuda de las siguientes técnicas: espectroscopía de infrarrojo (IR), espectroscopía de ultravioleta (UV), espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), y espectroscopía de masas (EM).

V.3.1 Espectroscopia de Infrarrojo (IR)

La espectroscopia vibracional fue una de las primeras técnicas espectroscópicas que encontró un uso extendido, en particular la espectroscopia de absorción infrarroja (IR) que recibe su nombre de la región del espectro electromagnético implicada. La región IR del espectro electromagnético se encuentra entre $12800-10\text{ cm}^{-1}$. Tanto desde el punto de vista de las aplicaciones como de los aparatos se puede dividir en tres zonas: IR cercano: $12800-4000\text{ cm}^{-1}$, IR medio: $4000-400\text{ cm}^{-1}$; IR lejano: $400-10\text{ cm}^{-1}$, siendo en el IR medio donde se dan la mayoría de las aplicaciones analíticas tradicionales (Wade., 2004; Hirschmugl., 2002).

Como en otros procesos de absorción de radiación electromagnética, la interacción de la radiación infrarroja con la materia provoca en ésta alguna alteración. En el caso del IR, esta alteración guarda relación con cambios en el estado vibracional de las moléculas. Las moléculas diatómicas simples tienen solamente un enlace, el cual se puede estirar. Moléculas más complejas pueden tener muchos enlaces, y las vibraciones pueden ser conjugadas, llevando a absorciones en el infrarrojo a frecuencias características que pueden relacionarse a grupos químicos. Los átomos en un grupo CH_2 , encontrado comúnmente en compuestos orgánicos pueden vibrar de seis formas distintas, estiramientos simétricos y asimétricos, flexiones simétricas y asimétricas en el plano (tijereteo y balanceo), y flexiones simétricas y asimétricas fuera del plano (aleteo y torsión) (Rubinson y Rubinson., 2004).

El espectro vibracional de una molécula se considera una propiedad física única y por tanto característica de ésta molécula. Así, entre otras aplicaciones, el espectro IR

se puede usar como “huella dactilar” en la identificación de muestras desconocidas mediante la comparación con espectros de referencia (Skoog., 2001; 2005).

V.3.1.1 Preparación de la muestra en IR

Muestras gaseosas: requieren poca preparación más allá de su purificación, pero se usa una celda de muestra con una larga longitud (usualmente 5-10 cm) pues los gases muestran absorbancias relativamente débiles (Rubinson y Rubinson., 2004)

Muestras líquidas: se pueden disponer entre dos placas de una sal de alta pureza (comúnmente cloruro de sodio, o sal común, aunque también se utilizan otras sales tales como bromuro de potasio o fluoruro de calcio). Las placas son transparentes a la luz infrarroja y no introducirán líneas en el espectro. Algunas placas de sal son altamente solubles en agua, y así la muestra, agentes de lavado y similares deben estar completamente anhidros (sin agua) (Skoog, 2001).

Muestras sólidas: se pueden preparar principalmente de dos maneras. La primera es moler la muestra con un agente aglomerante para formar una suspensión (usualmente nujol) en un mortero de mármol o ágata. Una fina película de suspensión se aplica sobre una placa de sal y se realiza la medición. El segundo método es triturar una cantidad de la mezcla con una sal especialmente purificada (usualmente bromuro de potasio) finamente (para remover efectos dispersores de los cristales grandes). Esta mezcla en polvo se comprime en una prensa de troquel mecánica para formar una pastilla translúcida a través de la cual puede pasar el rayo de luz del espectrómetro. Es importante destacar que los espectros obtenidos a partir de preparaciones distintas de la muestra se verán ligeramente distintos entre sí debido a los diferentes estados físicos en los que se encuentra la muestra y a que en algunos casos los agentes aglomerantes también absorben en IR mostrando bandas características. Las absorciones se expresan en cm^{-1} (Steinfeld., 1989).

V.3.2 Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La espectroscopia de RMN fue desarrollada a finales de los años cuarenta para estudiar los núcleos atómicos, posteriormente los químicos descubrieron que la espectroscopia de resonancia magnética nuclear podía ser utilizada para determinar las

estructuras de los compuestos orgánicos. Esta técnica espectroscópica puede utilizarse sólo para estudiar núcleos atómicos con un número impar de protones o neutrones (o de ambos). Esta situación se da en los átomos de ^1H , ^{13}C , ^{19}F y ^{31}P , debido a que son núcleos magnéticamente activos, es decir poseen espín, igual que los electrones, ya que los núcleos poseen carga positiva y poseen un movimiento de rotación sobre un eje que hace que se comporten como si fueran pequeños imanes (McMurry., 2012) . En ausencia de campo magnético, los espines nucleares se orientan al azar. Sin embargo cuando una muestra se coloca en un campo magnético, los núcleos con espín positivo se orientan en la misma dirección del campo, en un estado de mínima energía denominado estado de espín α , mientras que los núcleos con espín negativo se orientan en dirección opuesta a la del campo magnético, en un estado de mayor energía denominado estado de espín β . La diferencia de energía entre los dos estados de espín α y β , depende de la fuerza del campo magnético aplicado H_0 . Cuanto mayor sea el campo magnético, mayor diferencia energética habrá entre los dos estados de espín (Atkins y De Paula., 2008).

Cuando una muestra que contiene un compuesto orgánico es irradiada brevemente por un pulso intenso de radiación, los núcleos en el estado de espín α son promovidos al estado de espín β . Esta radiación se encuentra en la región de las radiofrecuencias (rf) del espectro electromagnético por eso se le denomina radiación rf. Cuando los núcleos vuelven a su estado inicial emiten señales cuya frecuencia depende de la diferencia de energía (ΔE) entre los estados de espín α y β . El espectrómetro de RMN detecta estas señales y las registra como una gráfica de frecuencias frente a intensidad, que es el llamado espectro de RMN. El término resonancia magnética nuclear procede del hecho de que los núcleos están en resonancia con la radiofrecuencia o la radiación rf. Es decir, los núcleos pasan de un estado de espín a otro como respuesta a la radiación rf a la que son sometidos (Requena y Zuñiga., 2004).

V.3.2.1 Resonancia Magnética Nuclear de Protón (^1H -RMN)

Los núcleos, como pueden ser los protones o los carbonos que forman las moléculas orgánicas, no se encuentran aislados sino que están rodeados de electrones que los protegen parcialmente del campo magnético externo al que se ven sometidos.

Los electrones se mueven generando un pequeño campo magnético inducido que se opone al campo magnético externo (Wade., 2004).

En cualquier molécula la nube electrónica que existe alrededor de cada núcleo actúa como una corriente eléctrica en movimiento que, como respuesta al campo magnético externo, genera una pequeña corriente inducida que se opone a dicho campo. El resultado de este hecho es que el campo magnético que realmente llega al núcleo es más débil que el campo externo, por tanto, se dice que el núcleo está protegido o apantallado. Este apantallamiento es muy importante desde el punto de vista experimental ya que el campo magnético efectivo (H_{ef}) que siente un protón dentro de una molécula es siempre menor que el campo externo, y por lo tanto, para que el núcleo entre en resonancia dicho campo externo debe ser mayor. Si todos los protones (1H) de una molécula orgánica estuvieran apantallados de igual forma, todos entrarían en resonancia con la misma combinación de frecuencia y campo magnético. Sin embargo, los protones se hallan dentro de entornos electrónicos diferentes y, por tanto, se encuentran diferentemente protegidos o apantallados (McMurry., 2012).

Por lo general, los efectos de protección, o apantallamiento, de las nubes electrónicas que rodean a cada protón son diferentes, lo que provoca diferentes frecuencias de emisión. El resultado es un espectro de diversas frecuencias donde cada conjunto de núcleos específicos da origen a una señal única de RMN. Así pues, un espectro de RMN es una gráfica de la intensidad de señal en función de la frecuencia de la energía electromagnética que liberan los diversos núcleos de una muestra. Las variaciones en las frecuencias de absorción de resonancia magnética nuclear, que tienen lugar debido al distinto apantallamiento de los núcleos, reciben el nombre de desplazamientos químicos (unidades δ ó ppm) (Carey., 2006).

El compuesto de referencia más común en resonancia magnética nuclear es el tetrametilsilano (TMS, $(CH_3)_4Si$). Como el silicio es menos electronegativo que el carbono, los grupos metilo del TMS son relativamente ricos en electrones, es decir, sus protones están fuertemente apantallados. Como consecuencia de este apantallamiento, estos protones absorben a una intensidad de campo mayor que el resto de protones enlazados al carbono o a otros elementos, de manera que casi todas las señales de resonancia magnética nuclear aparecen a campos más bajos (hacia la izquierda de la señal del TMS). Además todos los protones del TMS absorben con el mismo

desplazamiento químico dando una única absorción intensa. La escala más común de desplazamiento químico es la escala δ (delta) en la que la absorción del TMS se define como 0.00 δ . La mayor parte de los protones absorben a campos menores que el TMS, de modo que la escala δ aumenta hacia los campos menores. La mayoría de las señales de protones (^1H) varían entre 0 y 12 δ , mientras que las señales del ^{13}C varían del 0 a 250 δ (Wade., 2004).

V.3.2.2 Resonancia Magnética Nuclear de Carbono (^{13}C -RMN)

La resonancia magnética nuclear de ^{13}C es complementaria a la de ^1H . Esta última técnica se utiliza para deducir la estructura del esqueleto carbonado observando los entornos magnéticos de los átomos de hidrógeno, mientras que la espectroscopia de RMN de ^{13}C determina el entorno magnético de los átomos de carbono. El isótopo de ^{13}C menos abundante tiene un número impar de neutrones, lo que le confiere un espín magnético de 1/2, igual al del protón. La espectroscopia de resonancia magnética nuclear de ^{13}C es menos sensible que la de ^1H debido a que sólo el 1% de los átomos de carbono posee espín y a que, además, la frecuencia de resonancia del ^{13}C , para un campo magnético dado, es la cuarta parte de la que se da en la RMN de ^1H (Hesse *et.al.*, 2007). Los desplazamientos químicos del carbono son de 15 a 20 veces mayores que los del hidrógeno debido a que el carbono está directamente unido a los átomos que resultan ser bien apantallantes o desapantallantes.

V.4 Espectroscopia de masas

La espectrometría de masas, es una técnica de análisis cualitativo, de amplia utilización para la determinación de estructuras orgánicas, por si sola o en combinación con otras técnicas de espectrofotometría. La espectrometría de masas está basada en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa; una vez obtenidos estos iones, se separan de acuerdo con su masa y su carga, y finalmente se detectan por medio de un dispositivo adecuado (Wade., 2004). El espectrómetro de masas tiene tres partes básicas: una *fente de ionización* en la que se les da una carga eléctrica a las moléculas, un *analizador de masas* en el que se separan los iones por su relación masa/carga (m/z), y un *detector* en el que se registran los iones separados. El espectro de masas de un compuesto será, en consecuencia, una información bidimensional que

representa un parámetro relacionado con la abundancia de los diferentes tipos de iones en función de la relación masa/carga de cada uno de ellos, se representa como una gráfica de barras con las masas en el eje de la x (m/z), y la intensidad, en el eje y. Al pico más alto, que se le asigna una intensidad del 100 por ciento, se llama pico base y el pico que corresponde al radical catión sin fragmentar (masa de la molécula original) se llama pico principal o ion molecular (M^+) (Hesse *et.al.*, 2007). La presencia y abundancia en el espectro de determinados tipos de iones, identificables a partir de su masa, será función de la estructura química de cada compuesto; la espectrometría de masas puede ofrecer una enorme cantidad de información sobre un compuesto determinado (Gutiérrez y Droguet., 2002; Wade, 2004).

V.5 Determinación de punto de fusión

El punto de fusión es la temperatura de cambio del estado sólido al estado líquido a presión atmosférica. Para que esto ocurra es necesario que se rompan las fuerzas intermoleculares que mantienen cohesionados en una estructura cristalina las moléculas de un compuesto y por tanto su valor dependerá del balance de las diferentes fuerzas intermoleculares. La presencia de impurezas, incluso en pequeñas cantidades, produce una disminución del punto de fusión, acompañado generalmente de un incremento del intervalo en que funde, por ello la medida del punto de fusión se emplea como criterio de pureza de un determinado compuesto (Ramsay., 1949).

V.6 Actividad antibacteriana

Las técnicas de dilución en caldo o agar, se pueden utilizar para medir cuantitativamente la actividad *in vitro* de un antimicrobiano frente a un cultivo bacteriano. Estos métodos se basan en la preparación de una serie de tubos o placas con caldo o agar, respectivamente, a los cuales se les agrega el antibiótico (ATB) en distintas concentraciones. Luego se inoculan cada uno de los tubos o placas con una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio. Las pruebas se examinan después de incubar durante la noche a 35 ± 2 °C y se determina la concentración inhibitoria mínima (CIM) del antimicrobiano frente al microorganismo ensayado. El resultado final depende significativamente de la metodología empleada, por ello, para

obtener valores reproducibles, cada detalle técnico debe ser cuidadosamente controlado (CLSI., 2012).

V.6.1 Método de difusión en agar (método de Kirby Bauer)

Variados métodos de laboratorio pueden ser usados para determinar *in vitro* la susceptibilidad de bacterias ante agentes microbianos. En muchos laboratorios, el test de difusión en agar es usado en forma rutinaria para bacterias de rápido crecimiento y algunas bacterias patógenas. Los ensayos de susceptibilidad basados solamente en la presencia o ausencia de una zona de inhibición sin importar su tamaño, no son aceptables. Resultados confiables sólo se pueden obtener con un disco de ensayo de difusión que use el principio de metodología estandarizada y con medidas de diámetro de zonas correlacionados con la determinación de CIM con cepas conocidas susceptibles y resistentes a varios antibióticos (Swenson *et.al.*, 2004; Fekete *et.al.*, 2004). La difusión en disco es un método versátil adecuado para probar la mayoría de patógenos bacterianos, casi todos los agentes antimicrobianos pueden ser probados y no requiere de ningún equipo especial (Matuschek *et.al.*, 2014).

En el método de Kirby Bauer, el microorganismo es inoculado en la superficie de una placa de agar, sobre el cual se colocan discos impregnados con una concentración conocida del antibiótico. Las placas se incuban por 16-18 horas a 35-37°C. Durante la incubación, el antibiótico difunde radialmente desde el disco a través del agar, por lo que su concentración va disminuyendo a medida que se aleja del disco. En un punto determinado, la concentración del antibiótico en el medio es incapaz de inhibir al microorganismo en estudio. El diámetro del área de inhibición alrededor del disco puede ser convertido a las categorías de sensible, intermedio o resistente (S, I, o R) de acuerdo a tablas publicadas por los organismos encargados del control de tales métodos, como el Comité Nacional de Estandar de Laboratorios Clínicos de los Estados Unidos de Norteamérica (National Committee for Clinical Laboratories Standards, NCCLS) (NCCLS, 2000).

El medio de cultivo frecuentemente empleado en este método, es el Agar Mueller-Hinton debido a su reproducibilidad aceptable lote a lote para ensayos de susceptibilidad, y crecimiento satisfactorio para la mayoría de los patógenos, el pH debe estar entre 7,2 y 7,4 después de gelificar a temperatura ambiente, y el grosor entre 4 y 6

mm. Los discos de antibióticos son adquiridos comercialmente, deben mantenerse a -8 °C, es importante sacar el vial de discos del refrigerador una o dos horas antes de su uso para que igualen su temperatura a la del ambiente en una cubierta ajustada y con un adecuado agente desecante (NCCLS, 2001; Jogersen y Ferraro., 2009).

El inóculo bacteriano debe tener una turbidez ópticamente comparable a un estándar de 0,5 de la escala McFarland, aproximadamente 10^6 - 10^8 UFC/mL, y se prepara en solución salina estéril o caldo de cultivo. Luego de ajustar la turbidez en un lapso óptimo de 15 minutos con un hisopo de algodón estéril se inócula la superficie de la placa de agar Mueller Hinton por rayado, repitiendo varias veces rotando la placa para asegurar una distribución constante del inóculo (Bernal y Guzmán., 1984).

Al dispensar los discos sobre la superficie del agar deben ser presionados para asegurar contacto pleno con la superficie; luego las placas se deben incubar a 37 °C durante 18-24 horas y posteriormente realizar la lectura.

V.6.2 Método de microdilución

Este método se denomina microdilución porque involucra pequeños volúmenes de caldo. La prueba se realiza en placas elisa estériles de fondo cónico o redondo, cada pocillo debe contener 0,1 ml de caldo. La técnica de microdilución es usada para evaluar la actividad antibacteriana de aceites esenciales, compuestos o antibióticos (Gradinaru *et.al.*, 2014).

Para preparar las placas de microdilución se realizan diluciones intermedias de los agentes antimicrobianos en caldo o agua estéril, el método más conveniente para obtener las diluciones consiste en prepararlas en un volumen de por lo menos 10 mL y colocar 0,1 mL en cada uno de los pocillos mediante una pipeta automática mono o multicanal. Sin embargo, si el inóculo se agrega con pipeta, la solución del antibiótico debe prepararse a una concentración que duplique la deseada y los pocillos deben ser cargados con 0,05 mL en vez de 0,1 mL. Siempre debe incluirse en la placa un pocillo de control de crecimiento (sin antibiótico) y un control negativo (caldo sin inocular) (CLSI., 2006).

El inóculo a prepararse debe ser de 5×10^5 UFC/mL el cual debe agregarse dentro de los 15 minutos posteriores a su ajuste, y el volumen de suspensión bacteriana agregado no debe exceder el 10% del volumen total del pocillo. El tiempo de

incubación para la mayoría de los microorganismos es de 16 a 20 horas, a temperatura de 35 ± 2 °C. Para evitar la desecación durante la incubación, se debe sellar cada policubeta con su tapa plástica o película plástica autoadhesiva (Davidson y Paris., 1989).

La CIM es la menor concentración de antibiótico capaz de inhibir completamente el desarrollo bacteriano en el pocillo, el punto final queda definido a simple vista por la falta de turbidez del caldo. Alternativamente para la lectura y registro de resultados del método de microdilución se puede utilizar un dispositivo lector que pueda discernir entre desarrollo y ausencia del mismo. Para determinar el punto final de desarrollo, debe compararse cada pocillo con el pocillo control de crecimiento. El ensayo se considera válido si en el pocillo control de crecimiento se observa turbidez neta (CLSI., 2012).

V.7 Actividad antifúngica

V.7.1 Método de difusión en disco

Es un método simple, desarrollado para levaduras y disponible para fármacos solubles en agua, tales como fluocitosina, fluconazol y voriconazol, estandarizado por el Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) en el documento M44-P para especies de *Candida* (NCCLS., 2004). Se obtienen halos de inhibición cuya medición ha sido demostrado en estudios multicéntricos y se han probado más de 1.000 cepas. La utilización de azul de metileno disperso en la superficie de la placa parece mejorar los límites de la zona de inhibición y facilitar la lectura (Tapia., 2009).

V.7.2 Método de microdilución

En la actualidad se dispone de dos estándares que utilizan el método de microdilución en caldo para evaluar la actividad antifúngica, uno es el documento M27-A2, de la CLSI, y el otro es el estándar europeo European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing-Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (EUCAST-AFST), cuya versión definitiva se publicó el año 2007 (Tapia., 2009). Aunque ambos estándares son similares, presentan diferencias en varios aspectos en la metodología para evaluar susceptibilidad de levaduras fermentadoras como *Candida* sp. Algunas de las diferencias más importantes son: el tiempo de incubación (24 horas para EUCAST y

48 horas para el estándar CLSI) pues el primero utiliza un inóculo mayor; el fondo del pocillo de la placa de microdilución (plano para EUCAST y redondo para CLSI); la lectura (espectrofotométrica en EUCAST, visual en CLSI). Ambos utilizan el medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 con glutamina, sin bicarbonato y una concentración de glucosa de 0,2 y 2% (CLSI y EUCAST, respectivamente). Según lo descrito en la literatura científica, ambos estándares correlacionan bastante bien dentro de tres diluciones; sin embargo, el método EUCAST, tendería a leer CIM más bajas que el método CLSI (Espinell-Ingroff *et.al.*, 2005). Desde el punto de vista práctico, el método EUCAST es menos laborioso, más fácil de interpretar, y arroja resultados definitivos a las 24 horas de incubación.

Para determinar la concentración fungicida mínima (CFM), se toman 10 μ L del último pozo que da positivo (crecimiento mínimo) en la microplaca y de los tres pozos siguientes, que muestran visualmente una inhibición del crecimiento completa, se cultivan en agar dextrosa Sabouraud (SDA) y se incuban a 35 °C por 24 ó 48 horas (Londoño *et.al.*, 2008).

V.8 Actividad antiinflamatoria

Bayarsaihan (2011), define la inflamación como la respuesta fisiológica de defensa del organismo a estímulos nocivos, como los patógenos, las células dañadas, los traumas físicos o irritantes; se trata de un proceso complejo que involucra la acción coordinada de múltiples células, caracterizado por alteraciones en la permeabilidad vascular y la producción de mediadores inflamatorios locales, como esteroides, prostaglandinas, citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y especies reactivas de oxígeno (ERO). La habilidad para desencadenar una reacción inflamatoria es esencial para la supervivencia de los organismos, dado los innumerables agentes patógenos y lesivos ambientales existentes, aunque en algunas situaciones y enfermedades tal reacción puede llegar a ser exagerada y sin un aparente beneficio para el organismo (Franco *et al.*, 2013).

Los procesos inflamatorios se clasifican en agudos y crónicos: los procesos de tipo agudo consisten en una respuesta inmediata que se produce frente al agente lesivo, se caracteriza por un aumento del flujo sanguíneo, alteración de la permeabilidad de la microvasculatura y migración de leucocitos hasta el foco de lesión (Leal., 2009). La

inflamación aguda consta de dos fases. La primera fase va desde el momento en que se inicia la inflamación hasta aproximadamente una hora después. Se produce una vasoconstricción momentánea y la piel de esta zona adquiere una coloración pálida, seguida de vasodilatación con un incremento del flujo sanguíneo (hiperemia) y enrojecimiento de la zona (eritema). La segunda fase se inicia aproximadamente dos horas después de la acción del agente flogógeno e histológicamente puede observarse alteraciones vasculares, edema e infiltración por polimorfonucleares neutrófilos (Robbins y Cotran., 2007). Esta segunda fase se caracteriza por un aumento de los niveles de eicosanoides (Funk., 2001, Le Filliatre *et.al.*, 2001, Hinz y Brune 2002) que son un conjunto de sustancias sintetizadas a partir del ácido araquidónico (AA) que se ingiere con la dieta y es almacenado formando parte de los fosfolípidos de la membrana celular, siendo muy pequeña la concentración de AA libre en la célula (Esplugues y López-Jaramillo., 1997).

La actividad antiinflamatoria ha despertado en los últimos años un gran interés científico en el área de la química medicinal y farmacología, principalmente en virtud de la capacidad potencial de ciertos compuestos de interferir en la evolución de enfermedades que cursan con procesos inflamatorios. Existen muchos trabajos sobre evaluación de la actividad antiinflamatoria que se han realizado tanto en extractos como en metabolitos secundarios aislados de fuentes naturales; estos estudios se han realizado guiados a través de diferentes modelos farmacológicos tanto *in vivo* como *in vitro* (Gómez *et al.*, 2011). Para evaluar la actividad antiinflamatoria *in vivo* se dispone de modelos que varían en la intensidad de la reacción, estos pueden ser: modelos de inflamación aguda y modelos de inflamación subcrónica ó crónica (Díaz., 2007). Dentro de los modelos de inflamación aguda se pueden emplear el edema inducido con xilol en oreja de ratón. En el estudio de agentes antiinflamatorios se pueden seleccionar agentes irritantes que permiten un conocimiento más selectivo de la forma de actuar de la sustancia objeto de estudio, como por ejemplo, bradicinina, histamina y xileno, que provocan una inflamación de origen neurogénico, mientras que el empleo de fenilpropionato de etilo permite estudiar agentes antiinflamatorios con un largo período de latencia, como son los corticosteroides (Ríos *et al.*, 2004).

V.8.1 Edema auricular inducido por xilol

Entre los modelos experimentales que se dispone para estimar la inflamación en fase aguda se encuentra el modelo de edema auricular inducido por xilol, el cual permite cuantificar, de una manera fácil y reproducible el edema al inducir una inflamación aguda localizada en la oreja del animal luego de la administración tópica de xilol. La respuesta inflamatoria es usualmente cuantificada por el incremento en el peso de la oreja (edema) que es máxima alrededor de 3 horas después de la aplicación del xilol (Oliveira., 2011).

VI. PARTE EXPERIMENTAL

VI.1 OBTENCIÓN DEL ÁCIDO GRANDIFLORÉNICO [I]

El ácido grandiflorénico [I] fue proporcionado por la Dra. Rosa Aparicio y colaboradores, quienes aislaron dicho ácido en el Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis (IIFFB) a partir de la planta *Coespeletia moritziana* recolectada en el páramo de las piedras, a 13 km del Pico el Águila, en la vía de Piñango Estado Mérida, a unos 3100 msnm (Aparicio *et.al.*, 2013).

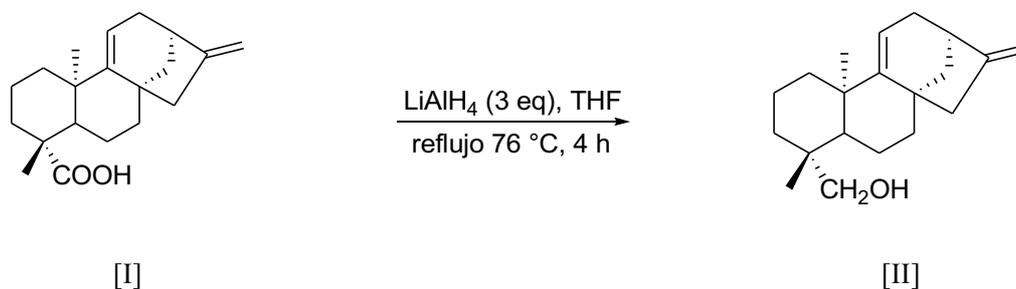
VI.2 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL GENERAL PARA LA SÍNTESIS DE ÉSTERES DERIVADOS

Todas las reacciones se realizaron bajo atmósfera de argón (Ar) a menos que se indique lo contrario. Los solventes tetrahidrofurano (THF), diclorometano (CH₂Cl₂) y dimetilformamida (DMF) fueron purificados inmediatamente antes de su uso. Las evaporaciones de los solventes se realizaron a presión reducida a temperaturas por debajo de 40°C a menos que se indique lo contrario. Las reacciones se controlaron por cromatografía en capa fina (TLC) llevada a cabo sobre placas de sílice E. Merck de 0,25 mm (60 F254), usando luz UV (354 nm) para la visualización y una solución de molibdato de amonio como agente de revelado. La separación por cromatografía en columna se llevó a cabo bajo presión positiva usando gel de sílice de 40-63 micras (Fluka[®]) y la polaridad del disolvente indicado en cada caso. Los espectros de RMN de las muestras en el disolvente indicado se realizaron a 300 MHz y calibrado usando disolvente residual de un patrón interno.

VI.2.1 Procedimiento para la síntesis del *ent*-kaur-9(11),16-dieno-19-ol [III].

El ácido grandiflorénico [I] se redujo a *ent*-kaur-9(11),16-dien-19-ol [II] de acuerdo al procedimiento de Agath Boulyé (2012) como se describe a continuación: en un balón de tres bocas bajo atmósfera de argón se suspendió el LiAlH₄ 188,9 mg (4,98 mmol, 3 eq) en THF (3mL). A esta suspensión se adicionó el ácido grandiflorénico [I] (500mg, 1,66 mmol, 1 eq) previamente disuelto en THF (5 mL). Luego la mezcla se dejó en reflujo (76°C) por 4 h. Trascorrida la reacción la solución se colocó sobre baño de hielo y el exceso de LiAlH₄ se eliminó con adición sucesiva de H₂O (0,2 mL), solución de 15 % NaOH 0,2 mL y H₂O 0,61 mL. El resultado de la suspensión se filtró

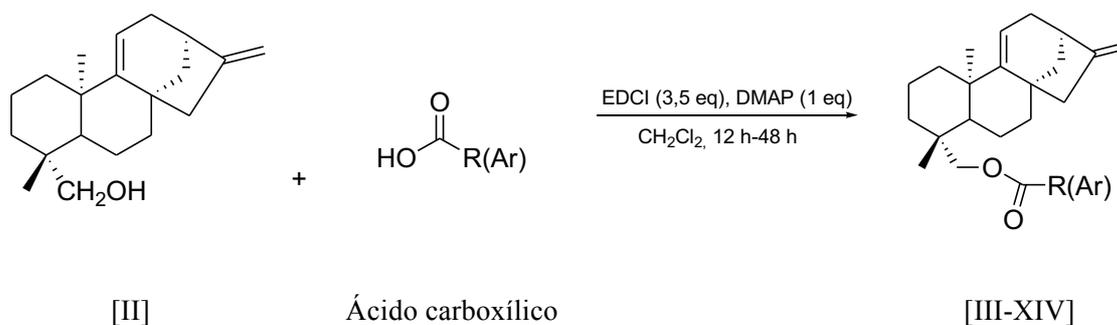
y se lavó con acetato de etilo, posteriormente el filtrado se concentró a presión reducida para obtener el producto, que fue purificado por cromatografía de columna con silica gel (ciclohexano), y eluida con fase móvil ciclohexano/EtOAc (90:10 → 80:20).



Esquema 31. Síntesis del *ent*-kaura-9(11),16-dieno-19-ol [II]

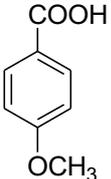
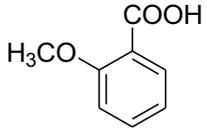
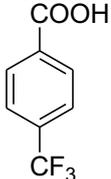
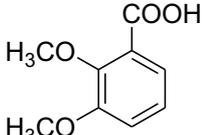
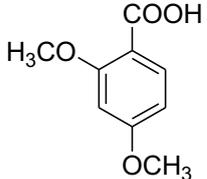
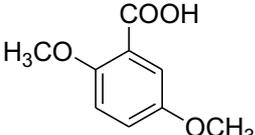
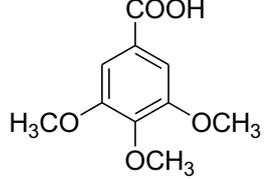
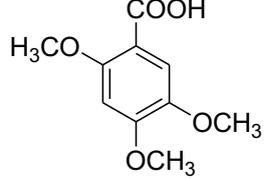
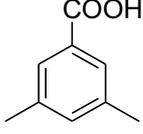
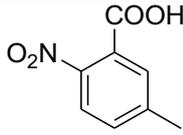
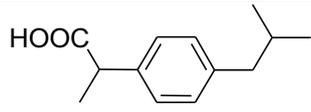
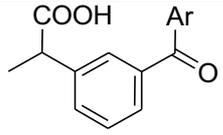
VI.2.2 Procedimiento para la síntesis de los ésteres derivados [III-XIV]

El ácido carboxílico 3,5 eq (Tabla 1), EDCI 3,5 eq y DMAP 1 eq fueron suspendidos en CH_2Cl_2 5 mL bajo atmósfera de argón, se agitaron durante 30 minutos sobre baño de hielo. Luego se adicionó el *ent*-kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II] (1 eq), y la mezcla se agitó sobre baño de hielo por 2 h, luego a temperatura ambiente. Trascorrido 48 h la solución resultante se lavó con solución saturada de NaHCO_3 (2x10 mL) y solución saturada de NaCl (2x10 mL), la fase orgánica se secó con MgSO_4 , se filtró, concentró a presión reducida, el producto obtenido fue purificado por cromatografía de columna con silica gel (ciclohexano), y eluida con fase móvil ciclohexano/acetato de etilo (95:5). El esquema 32 presenta la reacción general seguida para la formación de todos los ésteres derivados obtenidos por medio del acoplamiento entre el *ent*-kaura-9(11),16-dieno-19-ol [II] y los ácidos carboxílicos (Tabla 3).



formar los esteres derivados [III-XIV]. Todos los ácidos carboxílicos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich.

Esquema 32. Acomplamiento del *ent*-kaura-9(11),16-dieno-19-ol [II] con ácidos carboxílicos .

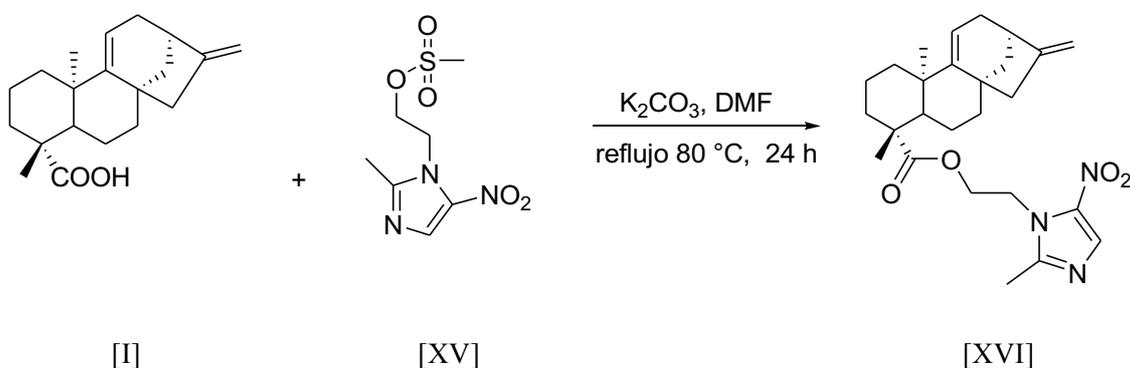
		
Ácido 4-metoxibenzoico	Ácido 2-metoxibenzoico	Ácido 4-trifluorometilbenzoico
		
Ácido 2,3-dimetoxibenzoico	Ácido 2,4-dimetoxibenzoico	Ácido 2,5-dimetoxibenzoico
		
Ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico	Ácido 2,4,5-trimetoxibenzoico	Ácido 3,5-dimetilbenzoico
		
Ácido 2-nitro-5-metil benzoico	Ácido (R,S) 2-(4-isobutilfenil)propanoico	Ácido (R,S) 2-(3-benzoilfenil)propanoico

VI.2.3 Obtención del 9(11),16-dieno-19-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil-*ent*-kaureno [XVI]

El compuesto 9(11),16-dien-19-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil-*ent*-kaureno [XVI] no se formó empleando el procedimiento VI.2.2 descrito anteriormente, por

esta razón se sintetizó a partir de la reacción entre los compuestos ácido grandiflorénico [I] y 2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etilmetanosulfonato [XV], este último se obtuvo según el procedimiento modificado de Yon Quian *et al.*, (2010) y Peixoto *et al.*, (2011), debido a que el anión mesilato es un excelente grupo saliente en las reacciones de sustitución nucleofílica.

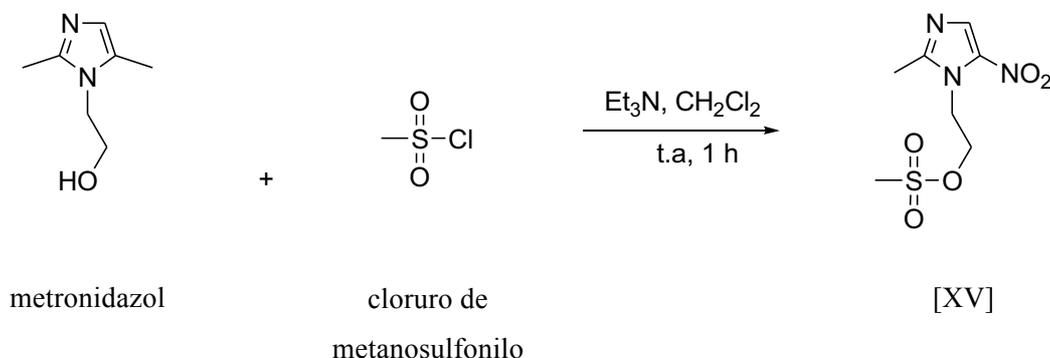
Para la obtención del éster 9(11),16-dien-19-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil-ent-kaureno [XVI] se mezclaron en un balón fondo redondo de 25 mL el ácido grandiflorénico [I] (50 mg, 1 eq), 2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etilmetanosulfonato [XV] (41,58 mg, 1 eq) en DMF (3 mL), luego se adicionó el K₂CO₃ (46,16 mg, 2 eq), siempre bajo condiciones inertes y atmósfera de argón, se dejó en reflujo a 80 °C durante 24 horas. Una vez finalizada la reacción se procedió a filtrar, posteriormente el filtrado se lavó con agua, la fase orgánica con acetato de etilo (3x10 mL), solución saturada de NaCl (3x 10 mL), se adicionó MgSO₄ anhidro, luego se filtro, concentro al vacío a 50 °C para eliminar la DMF, finalmente se filtró, concentró a presión reducida, y el producto obtenido fue purificado por cromatografía de columna con silica gel (ciclohexano), y eluida con fase móvil ciclohexano/acetato de etilo (30:70→40:60).



Esquema 33. Síntesis del 9(11),16-dien-19-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etil-ent-kaureno [XVI]. Ácido grandiflorénico [I] ; 2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etilmetanosulfonato [XV]

VI.2.4 Obtención del 2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il) etilmetanosulfonato [XV].

Para la síntesis del compuesto 2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etilmetano sulfonato [XV] se preparó una solución de 2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etanol (metronidazol[®]) 200 mg (1,17 mmol, 1 eq), trietilamina 32,58 μ L (236,58mg, 2,34 mmol, 2 eq), cloruro de metanosulfonilo 17,8 μ L (267,81 mg, 2,34 mmol, 2 eq) en CH_2Cl_2 , se agitó a temperatura ambiente por 1 h. Transcurrido este tiempo se adicionó 5 mL de solución saturada de bicarbonato de sodio (NaHCO_3), luego se realizó extracción con CH_2Cl_2 (2x20 mL), la fase orgánica se lavó con solución saturada de cloruro de sodio (2x10 mL), MgSO_4 , se filtró y concentró a presión reducida, para obtener el producto que fue purificado por cromatografía de columna con silica gel (ciclohexano), y eluida con fase móvil diclorometano/metanol (95:5).



Esquema 34. Síntesis del 2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il) etilmetanosulfonato [XV].

VI.3 DETERMINACIÓN DEL PUNTO DE FUSIÓN DEL ÁCIDO GRANDIFLORÉNICO Y ÉSTERES DERIVADOS

El punto de fusión de cada compuesto se midió en el aparato FISATROM 430 D (Fig. 13), colocando la sustancia en un tubo capilar seco, de un diámetro interno de 1 mm formando una columna de unos 3 mm de altura, luego se calentó el aparato determinador del punto de fusión hasta una temperatura de 5-10°C por debajo de la temperatura de fusión esperada y se ajustó el calor de forma que la temperatura en la cámara ascienda aproximadamente a razón de 1-2 °C por minuto. El tubo capilar con la sustancia se colocó en una cámara caliente y se anotó la temperatura cuando la sustancia se hizo totalmente transparente; se consideró que ése fue el punto de fusión.



Figura 13. FISATROM 430 D

VI.4 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO (IR)

Los compuestos fueron analizados por IR empleando un espectrofotómetro de infrarrojo marca PerkinElmer, modelo Spectrum Two (Fig.14), en el Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, en la Universidad de los Andes.



Figura 14. Espectrofotómetro de infrarrojo marca Perkin Elmer, modelo Spectrum Two

VI.5 ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Los espectros de RMN de cada uno de los compuestos obtenidos se realizó en el equipo de RMN Bruker-Avance de 300 MHz (Fig. 15), en el Instituto Europeo de Química y Biología (IECB), en la Universidad de Bordeaux, Bordeaux, Francia.



Figura 15. Equipo de RMN Bruker-Avance de 300 MHz

VI.6 ESPECTROMETRÍA DE MASAS

El análisis de los compuestos se realizó en un cromatógrafo de gases modelo 6890, equipado con detector de masas marca Hewlett Packard Modelo 5973 (Fig. 16), inyector automático y una columna capilar HP-5MS de 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm de espesor de la película. Temperatura de la fuente 230 $^{\circ}\text{C}$; temperatura del quádruplo 150 $^{\circ}\text{C}$; gas portador helio ajustado a una velocidad lineal de 34 cm/s; energía de ionización 70 eV; amplitud del scan 40-500 amu; 3,9 scans s^{-1} . El volumen inyectado fue de 1,0 μL de una solución al 5 mg/mL en acetona, con relación de reparto de 1:20. El programa de temperatura fue a la temperatura inicial de 200 $^{\circ}\text{C}$ con incremento de 10 $^{\circ}\text{C}$ por minuto hasta una temperatura final de 300 $^{\circ}\text{C}$, y 10 min adicionales a final, con un tiempo de recorrida de 20 minutos. La determinación de los componentes se realizó mediante comparación de los espectros de masas. Este análisis se realizó en el Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, en la Universidad de los Andes, con la colaboración del Prof. Luis Rojas.

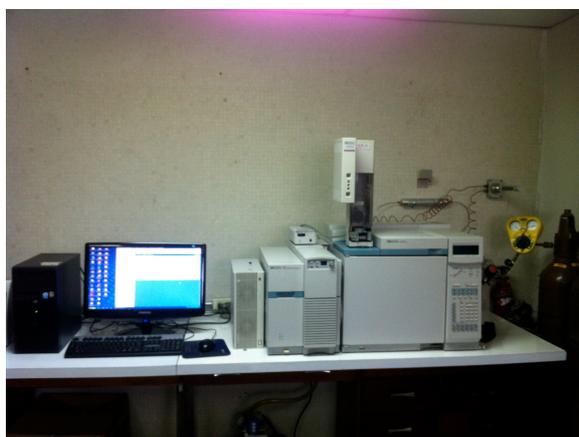


Figura 16. Espectrómetro de masas marca Hewlett Packard modelo 5973.

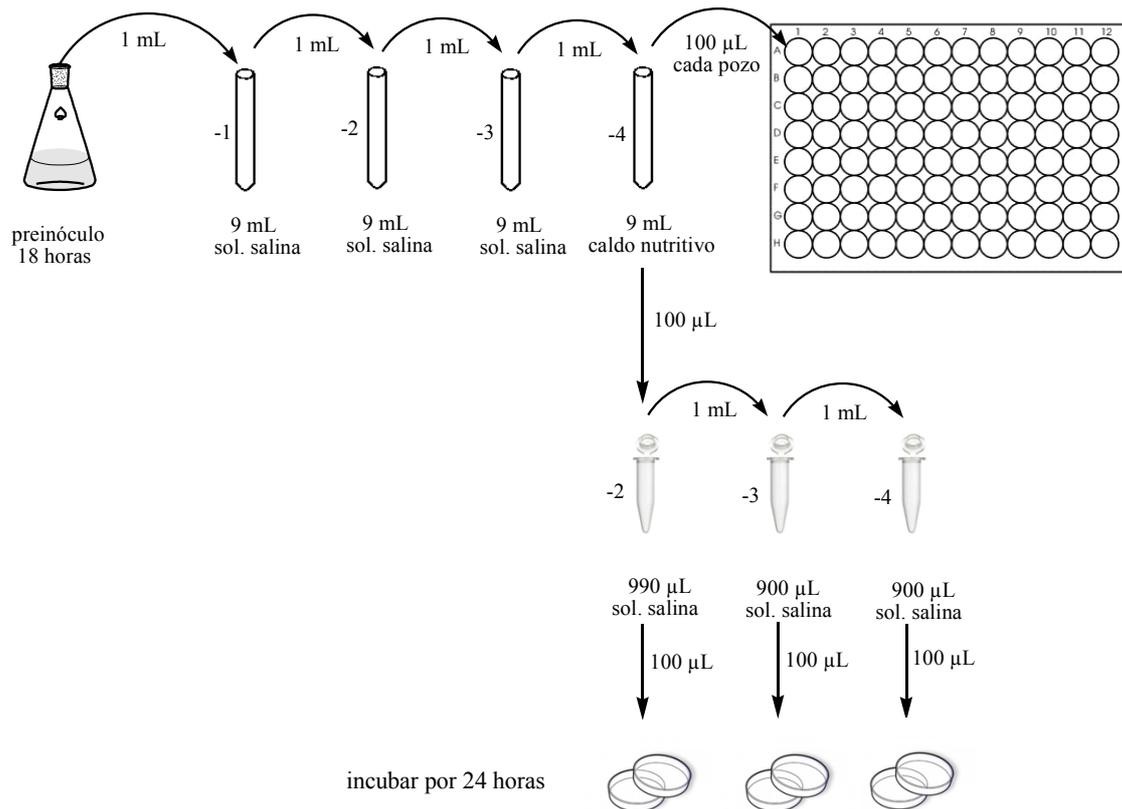
VI.7 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

El ensayo de actividad antibacteriana se realizó por el método de microdilución en caldo, con la colaboración de la Prof. Maria Eugenia Lucena, en el laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de los Andes, descrita por la NCCLS (2004)

VI.7.1 Método de microdilución

VI.7.1.1 Microorganismos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), y *Escherichia coli* (ATCC 25922).

VI.7.1.2 Preparación de la suspensión del inóculo: a partir de cultivos en medio sólido de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433) se prepararon preinóculos con 20 mL de caldo nutritivo, los cuales fueron incubados en una estufa a 37 °C por 18 horas bajo agitación orbital. A partir de estos cultivos se realizaron diluciones en solución salina y caldo nutritivo, y éste último fue utilizado como inóculo con concentración de bacteria en un rango de $1,5-2,5 \times 10^5$ UFC (Esquema 5).



Esquema 35. Preparación de suspensión del inóculo. Método microdilución

VI.7.1.3 Preparación de las muestras: se prepararon 1000 µL de una solución madre de los compuestos a ensayar a una concentración de 8000 ppm en dimetilsulfóxido (DMSO), y luego se realizaron diluciones con caldo nutritivo (Fig. 17).

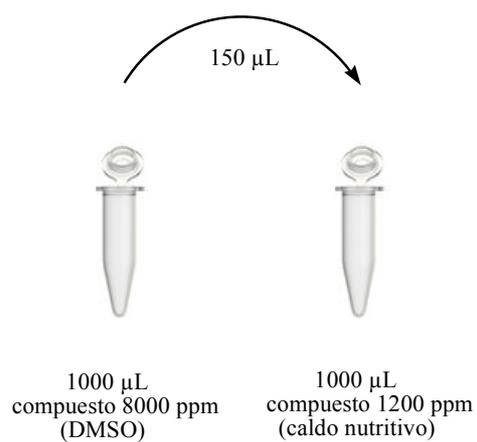


Figura 17. Preparación de las muestras. Método microdilución

VI.7.1.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y mínima bactericida (CMB).

Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y bactericidas (CMB) de los compuestos fueron determinadas a concentraciones de 600 µg/mL, 300 µg/mL, 150 µg/mL, 75 µg/mL. Para el ensayo se depositaron 200 µL de cada muestra en caldo nutritivo a concentración de 1200 ppm (doble concentración de la requerida para el ensayo) en los pozos de la columna 2, y 100 µL de medio en los restantes, para llevar a cabo diluciones seriadas a mitades. Estas placas fueron inoculadas con 100 µL de una suspensión del microorganismo a ensayar, realizada a partir de los preinóculos preparados como se indicó anteriormente. Cada ensayo fue realizado por duplicado y como control se inocularon pozos a las mismas condiciones, pero carentes de muestra y con dimetilsulfóxido a una concentración equivalente a la máxima utilizada en los cultivos problemas. El blanco se preparó añadiendo 200 µL de medio a todos los pozos de la primera columna de la placa. Se tomaron 100 µL de cada suspensión bacterial, y se agregaron en placas Petri a fin de saber la concentración inicial de éstas. Tras 24 horas de incubación, a 37 °C en agitación orbital, se determinó la turbidez de los cultivos. De aquellos pozos que mostraron poco crecimiento, se tomaron alícuotas (100 µL) para efectuar un recuento de viables en placas de Petri con agar nutritivo con el fin de establecer la CMI (mínima concentración de producto a la cual no hubo crecimiento) y CMB (mínima concentración de producto que produjo la muerte del 99,9% de la población inicial) como se esquematiza en la (Fig. 18).

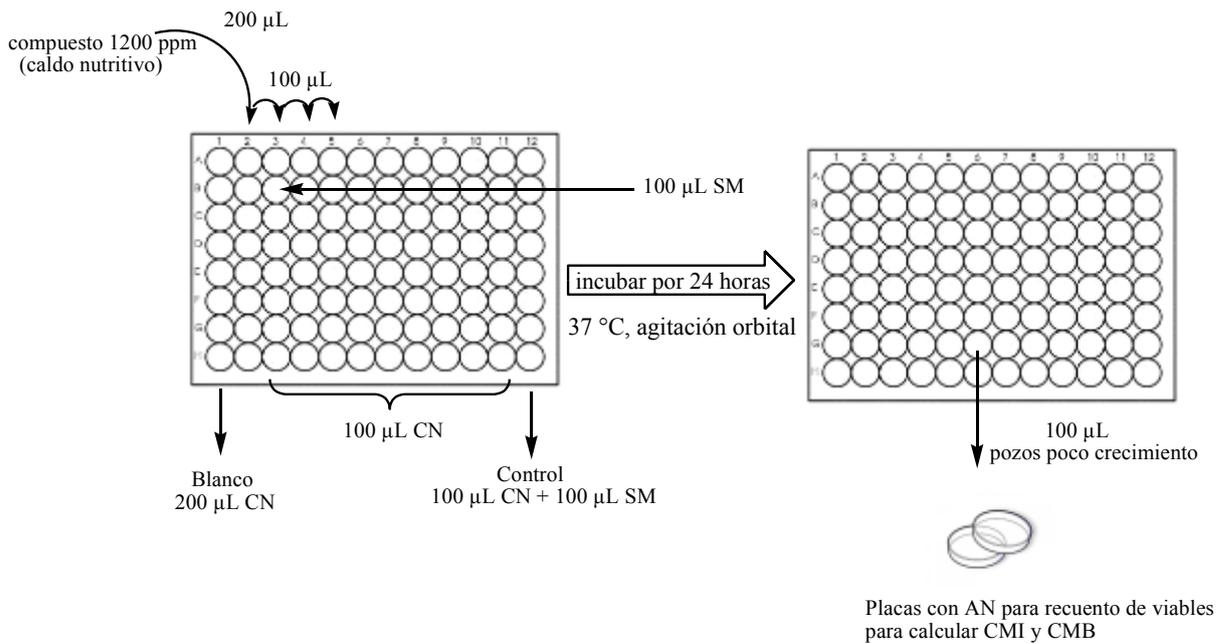


Figura 18. Determinación de CMI y CMB. Método microdilución. Caldo Nutritivo (CN), Suspensión de Microorganismo en CN (SM), Agar nutritivo (AN).

VI.8 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

La actividad antifúngica se evaluó por el método de difusión en disco descrita por la NCCLS (2004), con la colaboración de la Prof. Clara Díaz, en el laboratorio de Micología Dr. Corrada Capretti, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de los Andes.

VI.8.1 Método de difusión en disco

El fundamento de este método es el mismo que para las bacterias, está basado en el estudio de la sensibilidad de las levaduras a los antifúngicos en función del halo de inhibición producido por la difusión del antifúngico en un medio de cultivo sólido (Cantón *et al.*, 2007).

VI.8.1.1 Microorganismos: *Candida albicans* CDC 385 y *Candida krusei* ATCC 6258

VI.8.1.2 Preparación de la suspensión del inóculo: los cultivos de cada uno de los microorganismos fueron reactivados en caldo dextrosa Sabouraud. Se tomo una asada de colonias procedente del cultivo fresco (24 h) de *Candida* preparada en agar dextrosa Sabouraud (ADS) y se suspendió en 5 mL de solución salina fisiológica estéril y se

ajustó hasta alcanzar una turbidez de la escala del patrón McFarland N° 1 equivalente a una concentración aproximada de 3×10^8 UFC/mL.

VI.8.1.3 Preparación de las placas: para la preparación de las placas se utilizó el medio agar Mueller Hinton modificado (2 % glucosa + azul de metileno); previamente reconstituido, esterilizado, enfriado y se mantuvo a 45 °C, posteriormente se agregó 1 ml de suspensión del inóculo para cada 100 mL del medio de cultivo, mezclados asépticamente, se agitó suavemente y se repartió en placas de petri a razón de 20 mL por placa, se dejó solidificar y se rotuló con el nombre de la levadura testigo, posteriormente se incubó a 37 °C por 18-24 horas.

VI.8.1.4 Preparación de las muestras: los compuestos a ensayar fueron preparados a una concentración de 5000 µg/mL en DMSO.

VI.8.1.5 Preparación de los discos: con ayuda de un sacabocado se cortaron discos de papel (Carl Schleicher & Shuell. Co N° 740-E) de 6 mm de diámetro, los cuales se esterilizaron con luz ultravioleta durante toda la noche. Previo a la preparación del inóculo los discos se impregnaron con 20 µL de solución de cada compuesto, y del DMSO (control negativo). Posteriormente se dejaron media hora en luz UV.

VI.8.1.6 Controles positivos: disco de fluconazol (100 µg) para *Candida albicans* y disco de Voriconazol (400 µg) para *Candida krusei*.

Una vez colocados los discos sobre las placas se dejaron por 24 horas a 4 °C, posteriormente se incubaron en estufa a 37 °C durante 24 horas. Las pruebas se realizaron por duplicado.

VI.8.1.7 Lectura e interpretación de resultados: luego de transcurrido el tiempo de incubación se procedió a realizar la lectura correspondiente con la observación de las zonas claras de inhibición del crecimiento, mediante el registro de los diámetros en milímetros (mm). Se considero como resultado positivo (actividad antifúngica) cuando un halo de inhibición de crecimiento fúngico se observe alrededor del disco. En el caso contrario, la ausencia de halo se interpretará como resultado negativo o resistente (sin actividad antifúngica).

VI.8.1.8 Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM): La CIM, se preparando diluciones de los compuestos con DMSO (600 µg/mL, 300 µg/mL, 150 µg/mL).

µg/mL, 75 µg/mL), luego se impregnaron los discos de papel filtro con 20 µL de cada dilución. Un control negativo fue incluido en el estudio usando papel filtro impregnado con DMSO para comprobar la posible actividad de ese solvente con la cepa ensayada. El estudio se realizó por duplicado.

VI.9 ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

VI.9.1 Método de edema auricular inducido por xilol

La actividad antiinflamatoria se evaluó *in vivo* siguiendo el protocolo CEBIOULA/082 aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad de los Andes. La actividad se realizó en el Bioterio de la Universidad de los Andes.

VI.9.1.1 Animales de experimentación: los animales a utilizar fueron proporcionados por el Bioterio de la Universidad de los Andes. Para el estudio de la actividad antiinflamatoria se utilizaron ratones BIO:NMRI machos con un peso entre 20-30g . Los animales se mantuvieron con dieta comercial y agua ad libitum, se colocaron en un ambiente climatizado de 22 ± 1 °C; con ciclos de 12 horas de luz y oscuridad. Todo el ensayo se realizó en el Bioterio de la ULA de acuerdo a normas éticas para el uso y cuidado de animales.

VI.9.1.2 Preparación de las muestras: los compuestos solubles en agua fueron disueltos en solución fisiológica, y en caso contrario se preparó una suspensión con Tween 80 al 7% en solución fisiológica. Los compuestos fueron administrados por vía intramuscular y se ensayaron tres dosis: 64 mg/kg, 32 mg/kg y 16mg/kg, estas dosis fueron seleccionadas considerando que al evaluar la actividad antiinflamatoria aguda de compuestos puros es conveniente no sobrepasar los 100 mg/kg (CYTED, 1995).

VI.9.1.3 Preparación de controles positivos: la actividad antinflamatoria se estudió frente a fármacos de conocida actividad antiinflamatoria como son dexametasona[®] (4 mg/kg, 1 mg/kg), diclofenac[®] (25 mg/kg, 10mg/kg) y ketoprofeno[®] (10 mg/kg, 5mg/kg), los cuales fueron administrados por vía intramuscular (IM) en la pata derecha del animal.

VI.9.1.4 Preparación de control negativo: se utilizó como control negativo una solución de tween 80 al 7% en solución fisiológica, la cual fue administrada por vía IM en la pata derecha del animal.

VI.9.1.5 Agente irritante: el xilol (20 µL) fue utilizado como agente irritante inductor de la inflamación aguda, aplicado con una micropipeta en la superficie interna de la oreja derecha.

VI.9.1.6 Protocolo de experimentación (Esquema 36):

- a. Rotular las cajas de los animales de experimentación por grupo: grupo control negativo, grupo control positivo, grupo muestra.
- b. Pesar cada uno de los ratones e identificar con marcadores de colores cada ratón por grupo.
- c. Aplicar vía IM en pata derecha 0,2 mL de solución de tween 80 al 7% en solución fisiológica a los animales del grupo control negativo, luego de 30 minutos aplicar 20 µl de xilol en la superficie interna de la oreja derecha, ayudar a secar con secador luego de aplicar a todos los ratones. Luego de 3 horas después de aplicar el xilol, sacrificar a los animales por dislocación cervical.
- d. Tomar secciones circulares (6 mm) de ambas orejas, y pesar en balanza analítica.
- e. Determinar grado del edema en oreja (ΔE) por diferencia entre la oreja derecha e izquierda

$$\Delta E = OD - OI$$

Ecuación 1. Grado del edema en oreja (ΔE). Peso de oreja derecha (OD);
Peso de oreja izquierda (OI);

- f. Realizar los cálculos del porcentaje de inflamación (% I) y porcentaje de inhibición de inflamación (% Inh).

$$\% I = \Delta E_{ge} \times 100 / \Delta E_{gc}$$

Ecuación 2. Porcentaje de inflamación (%I). Grado edema oreja del grupo ensayado (ΔE_{ge}); Grado edema oreja del grupo control negativo (ΔE_{gc}).

$$\% Inh = 100 - \% I$$

Ecuación 3. Porcentaje de inhibición de inflamación (% Inh).

g. Repetir el paso (c) para cada uno de los grupos a ensayar.

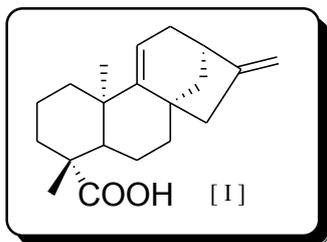
Los resultados obtenidos de la prueba de edema auricular inducido por xilol fueron evaluados estadísticamente por análisis de varianza (ANOVA) con comparación post prueba Sheffé con valor de significancia de $p < 0,05$ y todos los resultados se expresaron como la media \pm la desviación estándar. Para los análisis estadísticos se emplearon los programas Excel (Microsoft) y SPSS versión 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.). El análisis estadístico fue realizado con la colaboración del Dr. Gustavo Velazco, profesor titular de la Universidad de los Andes.



Esquema 36. Método de edema auricular inducido por xilol.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VII.1 Ácido Grandiflorénico [I]



$C_{20}H_{28}O_2$

PM= 300,451 g/mol

Pf= 158-160 °C

Aspecto: polvo blanco

El ácido grandiflorénico proporcionado fue un sólido de color blanco cuyo punto de fusión se determinó entre 158-160 °C, con fórmula molecular $C_{20}H_{28}O_2$, de acuerdo al espectro de masas (Fig. 23, Tabla 6) que mostró un ión molecular a m/z : 314. Sobre la base de dicha fórmula y tomando en cuenta los demás datos espectroscópicos se puso en evidencia que el compuesto [I] es un ácido diterpénico tetracíclico perteneciente a la serie del kaurano doblemente insaturado. En el espectro de infrarrojo (Fig. 19, Tabla 4) se observa una banda amplia correspondiente a la vibración de tensión del grupo hidroxilo de un ácido carboxílico [3064 cm^{-1} (-O-H), 1690 cm^{-1} (-C=O), 1237 cm^{-1} (C-O)], las bandas características que demuestran la presencia de insaturaciones se observan a 2934 cm^{-1} (vibración de tensión), 1476 cm^{-1} (C=C) y 876 cm^{-1} (=C-H). La presencia de las dos insaturaciones se confirma en el espectro de RMN- ^1H (Fig. 20, Tabla 5) con un singlete ancho a δ_{H} : 5,25 ppm (H-11, =CH, 1H, *s/a*) asignado para un doble enlace trisustituido que se encuentra acoplado con un metileno H-12 (δ_{H} : 2,43 ppm, H-12, -CH $_2$ -, 2H), además de un par de singletes a δ_{H} : 4,93 ppm (H-17a, =CH $_2$, 1H, *s*) y δ_{H} : 4,80 ppm (H-17b, =CH $_2$, 1H, *s*) característico de protones de un doble enlace metilénico, los cuales presentan una correlación a tres enlaces con los carbonos C-13 (δ_{C} : 41,26 ppm, >CH-) y C-15 (δ_{C} : 50,33 ppm, -CH $_2$ -). Además es importante resaltar en el espectro de RMN- ^1H la presencia de los grupos metilos (-CH $_3$) en las posiciones H-18 (δ_{H} : 1,25 ppm, H-18, -CH $_3$, 3H, *s*) y H-20 (δ_{H} : 1,03 ppm, H-20, -CH $_3$, 3H, *s*). Esta información se verifica con el espectro de RMN- ^{13}C y DEPT-135 (Fig. 21, Tabla 5) destacando la presencia de un carbonilo del ácido carboxílico a δ_{C} : 184,6 ppm (C-19, -COOH), de un doble enlace metilénico a δ_{C} : 158,5 ppm (C-16, =C<) y δ_{C} : 105,6 ppm (C-17, =CH $_2$), el doble enlace trisustituido δ_{C} : 156,2 ppm (C-9, >C=) y δ_{C} : 114,9 ppm (C-11, =CH-). Sobre la base de lo anteriormente mencionado y el análisis de HMQC (Fig. 22) permitió correlacionar la mayoría de los carbonos con sus respectivos

hidrógenos y aquellos que se encontraban en situaciones ambiguas quedaron establecidas con ayuda del espectro $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY, HMBC.

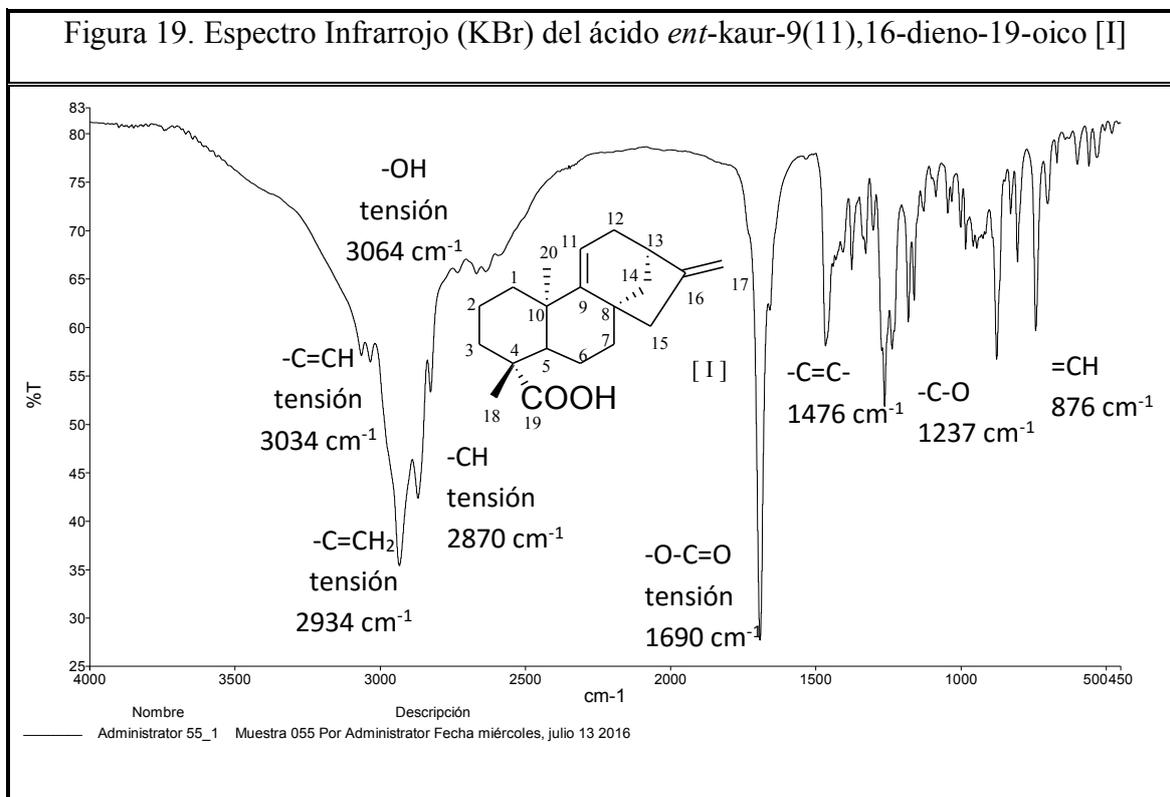


Tabla 4. Bandas de absorción en el espectro IR del ácido *ent*-kaur-9(11),16-dieno-19-oico [I]

ν máx (cm^{-1})	3064	3034	2934	2870	1690	1237	876
Asignación	-OH	-C=CH	-C=CH ₂	-CH	-O-C=O	-C-O	=CH

Figura 20. Espectro de RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz) del ácido *ent*-kaur-9(11),16-dieno-19-oico [I]

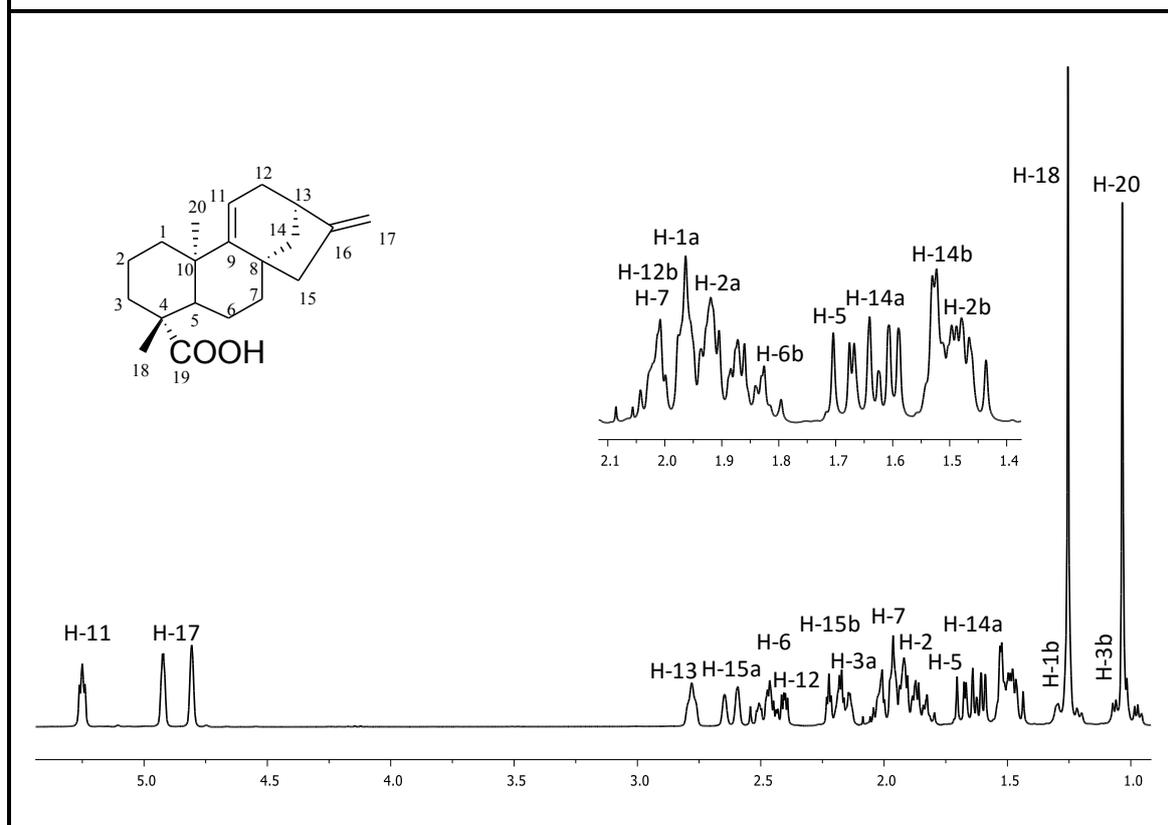


Figura 21. Espectro de RMN-¹³C (CDCl₃, 75 MHz) del ácido *ent*-kaur-9(11),16-dieno-19-oico [I]

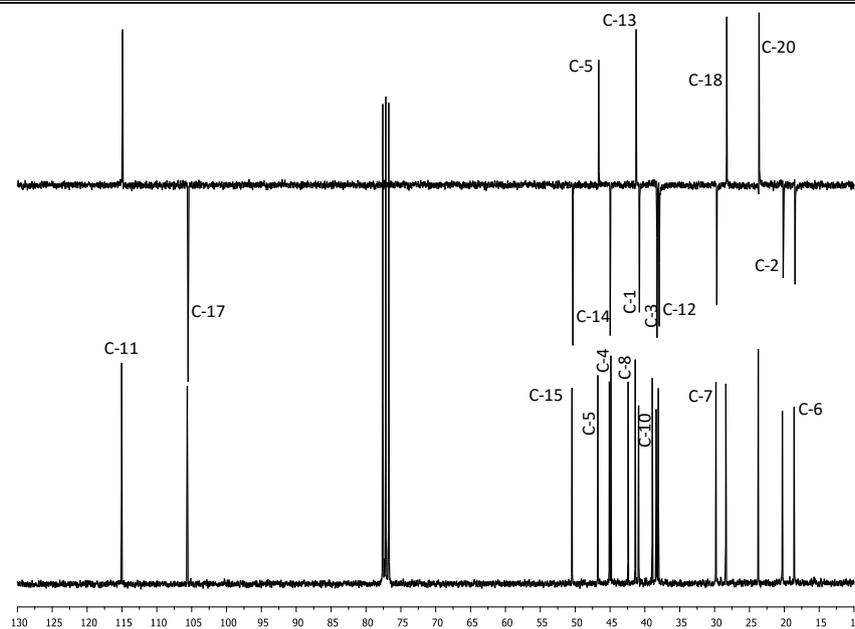
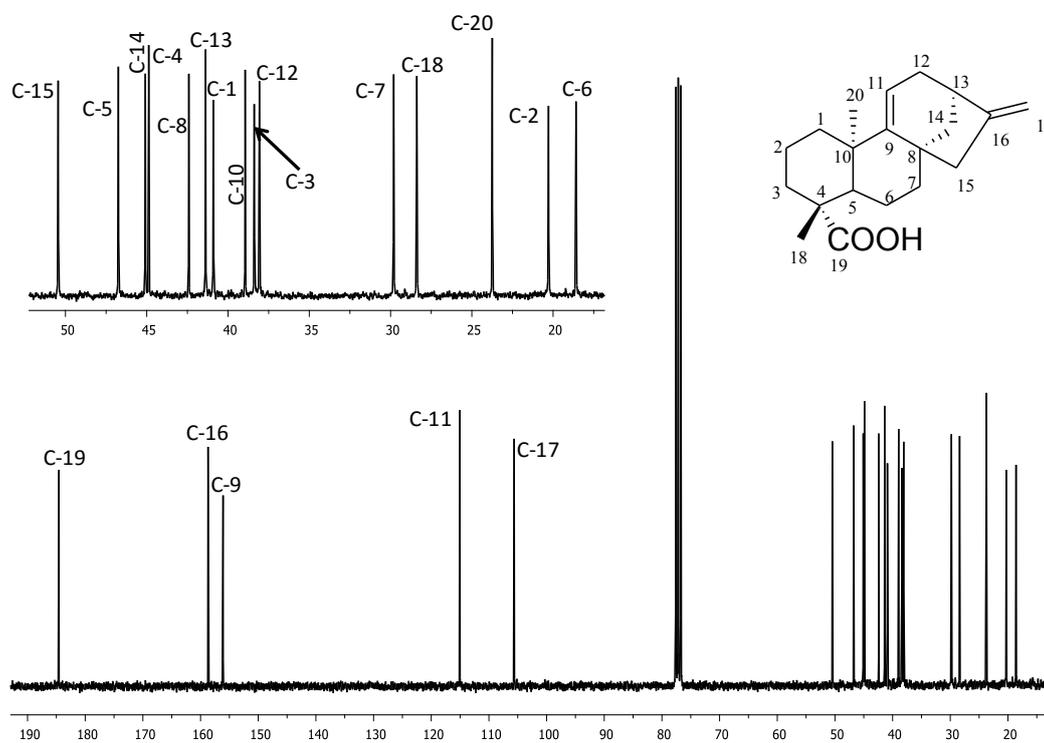


Figura 22. Espectro HMQC (CDCl₃) del ácido *ent*-kaur-9(11),16-dieno-19-oico [I]

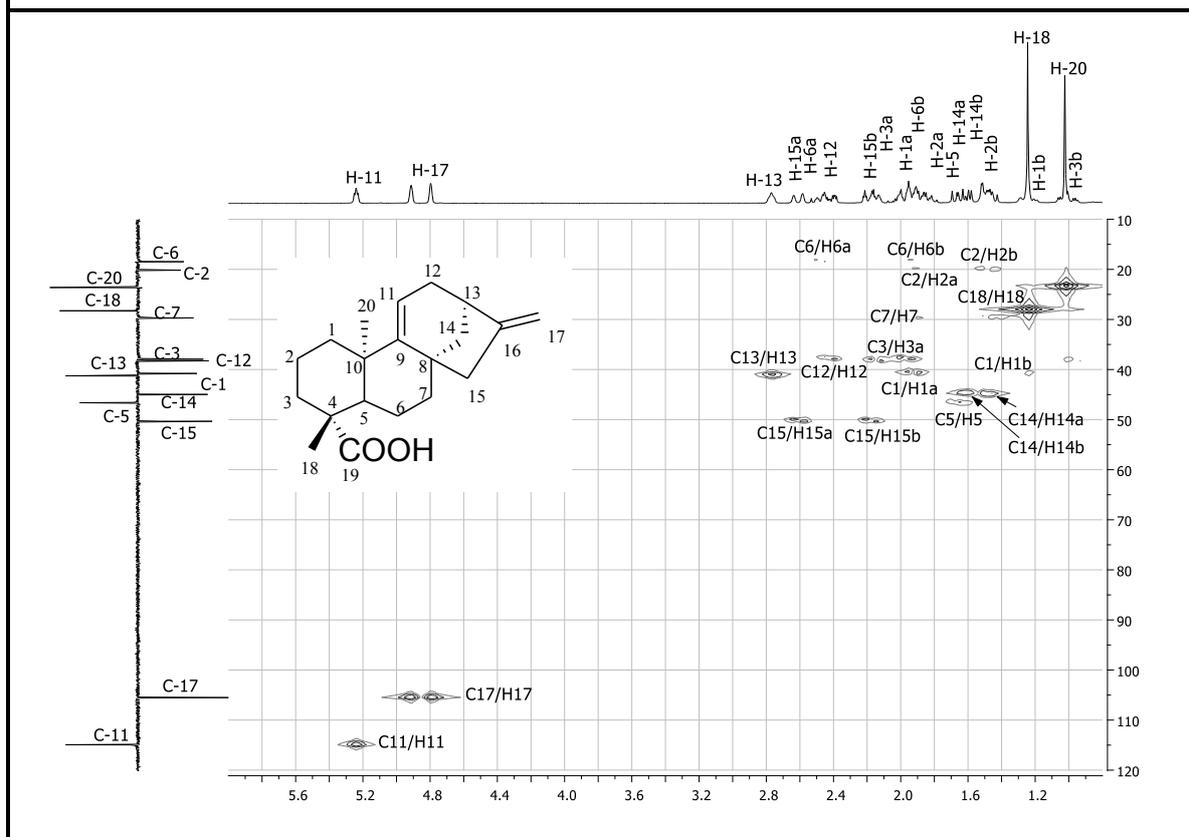


Tabla 5. Datos de RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 300 MHz y 75 MHz) del ácido <i>ent</i> -kaur-9(11),16-dieno-19-oico [I]				
Posición	δ _c (ppm)	Tipo de carbono	multiplicidad	δ _H (ppm)
1	40,78	CH ₂	<i>m</i>	Ha:1,93; Hb:1,23
2	20,16	CH ₂	<i>m</i>	Ha:1,91; Hb:1,52
3	38,26	CH ₂	<i>m</i>	Ha:2,00; Hb:1,00
4	44,75	C	-	-
5	46,62	CH	<i>m</i>	H:1,66
6	18,47	CH ₂	<i>m</i>	Ha:2,50; Hb:1,94
7	29,68	CH ₂	<i>m</i>	H:1,89
8	42,29	C	-	-
9	156,23	C (sp ²)	-	-
10	38,82	C	-	-
11	114,92	CH(sp ²)	<i>s (ancho)</i>	H:5,25
12	37,94	CH ₂	<i>m</i>	Ha:2,43
13	41,26	CH	<i>s (ancho)</i>	H:2,78
14	44,96	CH ₂	<i>m</i>	Ha:1,62; Hb:1,47
15	50,33	CH ₂	<i>d (J:16,7 Hz)</i>	Ha:2,65
			<i>m</i>	Hb:2,17
16	158,58	C(sp ²)	-	-
17	105,67	CH ₂ (sp ²)	<i>s (ancho)</i>	Ha:4,93; Hb:4,80
18	28,26	CH ₃	<i>s</i>	H:1,25
19	184,60	C(sp ²)	-	-
20	23,62	CH ₃	<i>s</i>	H:1,03

Para realizar el espectro de masas del ácido grandiflorénico, fue necesaria la metilación del compuesto por medio de la reacción con diazometano (CH_2N_2), presentando un ión molecular m/z : 314,0 congruente con la fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_2$, observándose los siguientes picos de mayor abundancia descritos de la siguiente manera; m/z : 299,2 indica la pérdida de un grupo metilo ($-\text{CH}_3$), continuando con m/z : 239,1 que refleja la pérdida del grupo $-\text{COOCH}_3$ a partir del ión molecular.

Figura 23. Espectro de Masas (impacto electrónico) del éster metílico del ácido 9(11),16-dieno-*ent*-kaureno

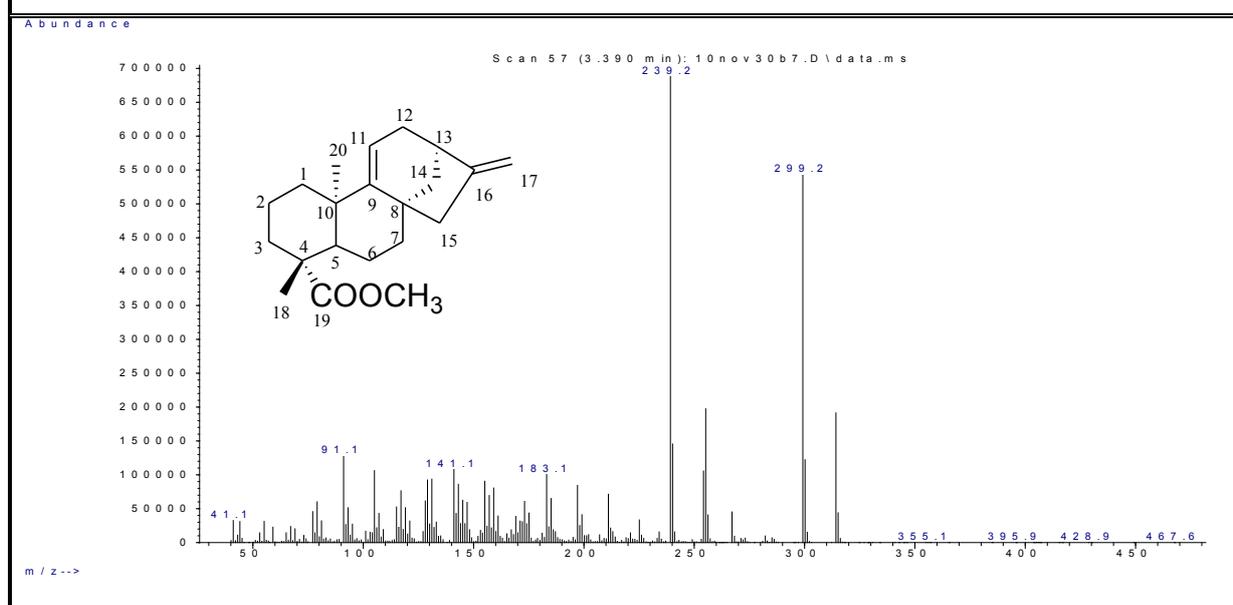
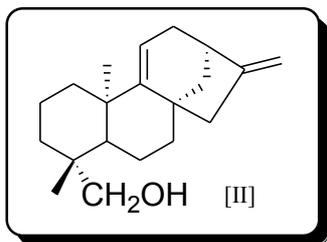


Tabla 6. Fragmentos m/z más notables en el espectro de masas del éster metílico del ácido 9(11),16-dieno-*ent*-kaureno

m/z	314,0	299,2	255,2	239,1
Abundancia relativa	30,7	76,9	9,9	100,0
m/z	197,1	105,0	91,0	55,1
Abundancia relativa	14,56	25,3	41,7	16,5

VII.2 *ent*-Kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II]



$C_{20}H_{30}O$

PM= 286 g/mol, Pf= 116-117 °C

Aspecto: polvo blanco

Rendimiento= 99% (471,8 mg)

El compuesto [II] puede adquirirse comercialmente con el número de registro CAS 36100-67-1, sin embargo se sintetizó de acuerdo con la metodología descrita en VI.2.1, obteniendo 471,8 mg (99%) de un polvo blanco cuyo punto de fusión fue de 116-117 °C. Su espectro de masas (Fig. 28, Tabla 9) muestra el ión molecular m/z 286,2 y el mismo corresponde con la fórmula $C_{20}H_{30}O$, deducida del EM y corroborada por datos de RMN, dicha fórmula corresponde a un compuesto que presenta absorciones típicas de dobles enlaces a 3020 cm^{-1} (vibración de tensión), 1660 cm^{-1} ($>C=C<$), 874 ($=C-H$) cm^{-1} y una banda ancha e intensa característica del grupo hidroxilo del alcohol [3338 cm^{-1} ($-O-H$) (vibración de tensión), 1025 cm^{-1} ($C-O$)], como se observa en el espectro de infrarrojo (Fig. 25, Tabla 7).

En el espectro de $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) (Fig. 25; Tabla 8) se observaron los singuletes característicos de un metilo angular [δ_{H} : 0,95 ppm (H-20, $-\text{CH}_3$, 3H, s)] y de un metileno terciario [δ_{H} : 1,03 ppm (C-18, $-\text{CH}_3$, 3H, s (ancho))], también se detecta la señal de un hidrógeno alílico situado en la cabeza de puente [δ_{H} : 2,76 ppm (C-13, $-\text{CH}$, 1H, s (ancho))]. La existencia del doble enlace entre C-16 y C-17 quedó reflejada en este espectro al estar localizadas a δ_{H} : 4,93 (H-17a, $=\text{CH}_2$, 1H, s) y δ_{H} : 4,80 ppm (H-17b, $=\text{CH}_2$, 1H, s) el par de singuletes típicos de los hidrógenos metilénicos olefinicos. La señal de otro protón olefinico se observa a δ_{H} : 5,17 (H-11, $=\text{CH}$, 1H, s (ancho)) y fue asignada al hidrógeno de un doble enlace trisustituido. Se confirmó la reducción del ácido carboxílico (C-19) del AG al grupo alcohol por la aparición en el espectro $^1\text{H-NMR}$ de un doblete correspondiente al metileno [δ_{H} : 3,85 (H-19a, $>\text{CH}_2$, 1H, d) y 3,59 ppm (H-19b, $>\text{CH}_2$, 1H, d)], y en el espectro $^{13}\text{C-NMR}$ se evidencia la presencia de un $>\text{CH}_2$ [δ_{C} : 64,64 ppm (C-19)], el cual pudo confirmarse por medio del DEPT-135°.

En el espectro de $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) (Fig. 26; Tabla 8) presenta veinte picos, destacándose los picos de los carbonos del doble enlace metilénico [δ_{C} : 158,68

ppm (C-16)], doble enlace trisustituido [δ_c : 157,29 ppm (C-9); δ_c : 113,67 ppm (C-11)], y de los metilos [δ_c : 25,43 ppm (C-18); δ_c : 26,07 ppm (C-20)].

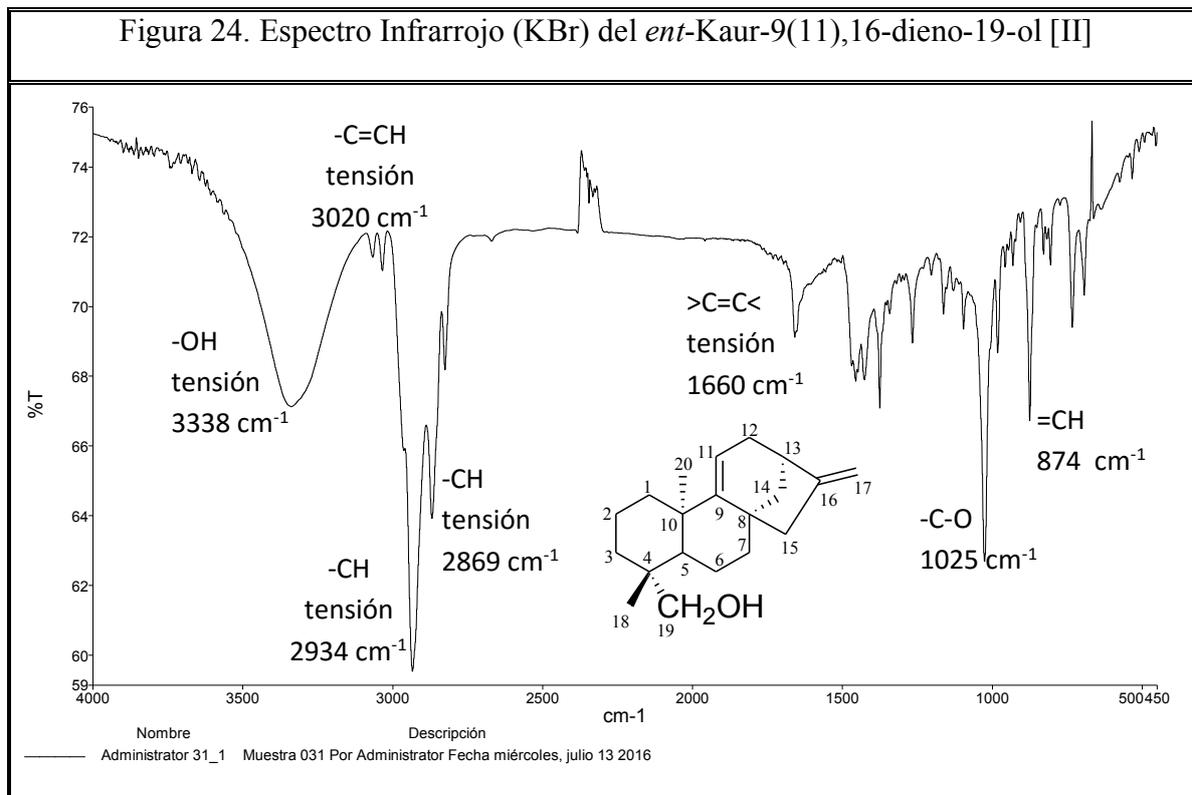


Tabla 7. Bandas de absorción en el espectro IR del *ent*-Kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II]

ν máx (cm^{-1})	3338	3020	2934	2869	1660	1025	874
Asignación	-OH	-C=CH	-CH	-CH	>C=C<	-C-O	=CH

Figura 25. Espectro de RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz) del *ent*-Kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II]

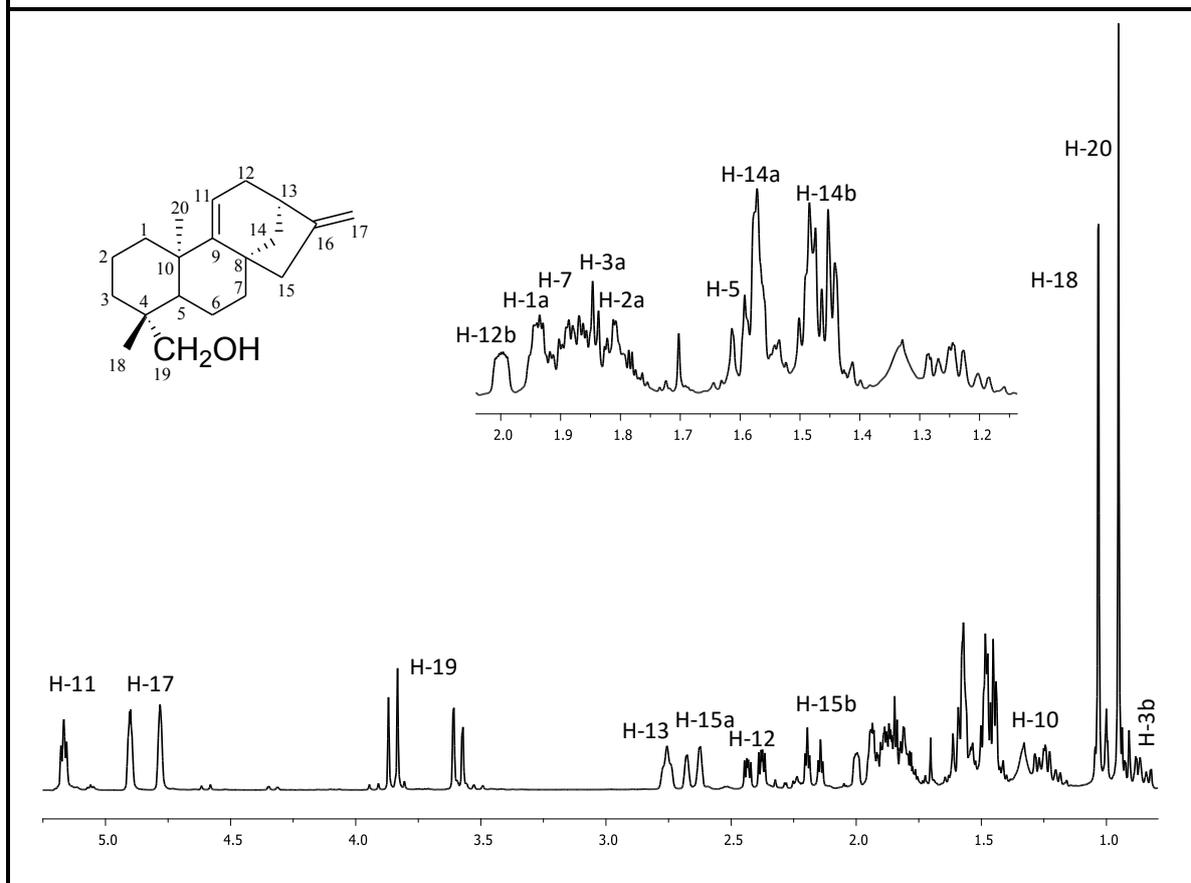


Figura 26. Espectro de RMN-¹³C (CDCl₃, 75 MHz) del *ent*-Kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II]

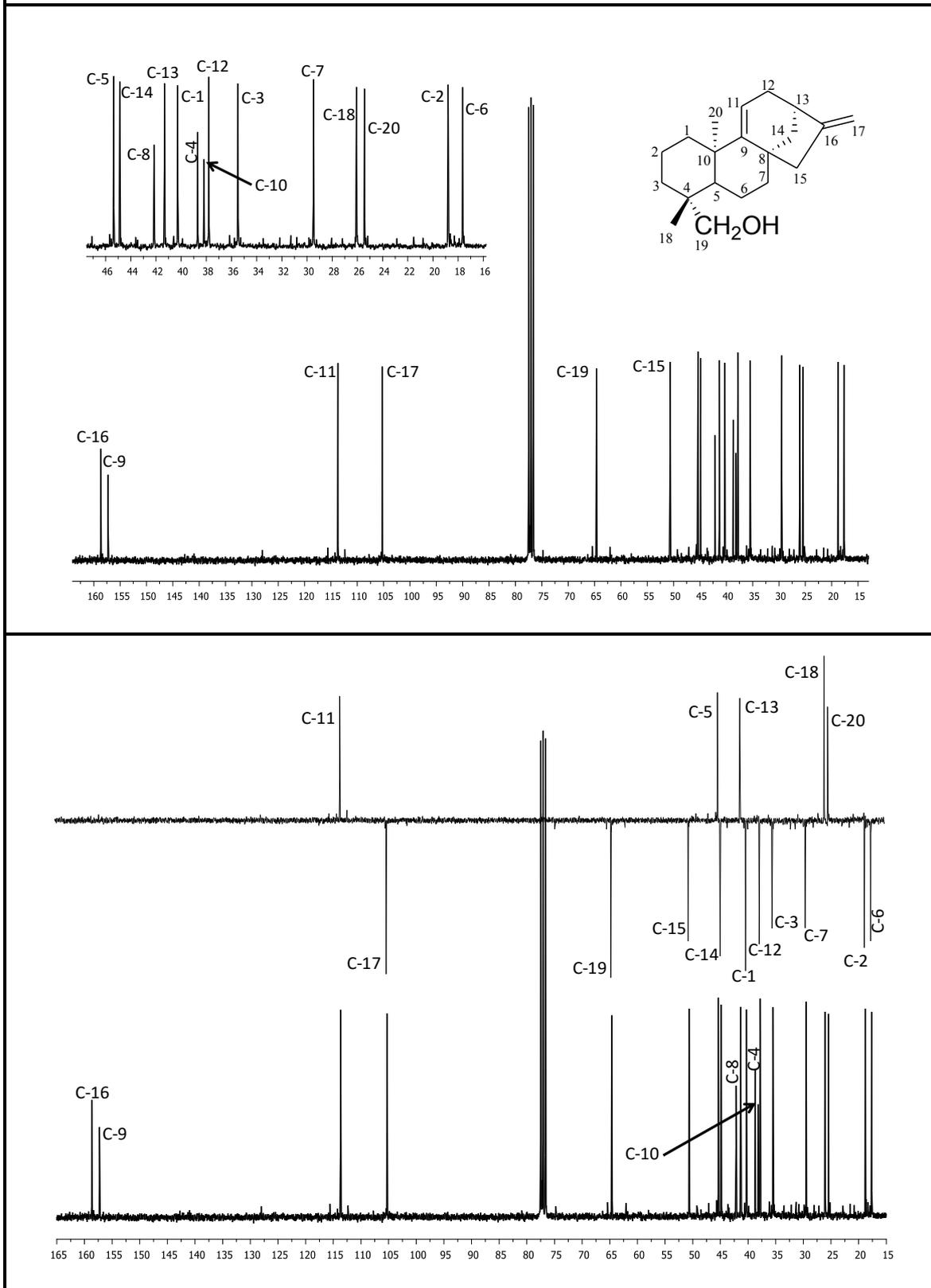


Figura 27. Espectro HMQC (CDCl_3) del *ent*-Kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II]

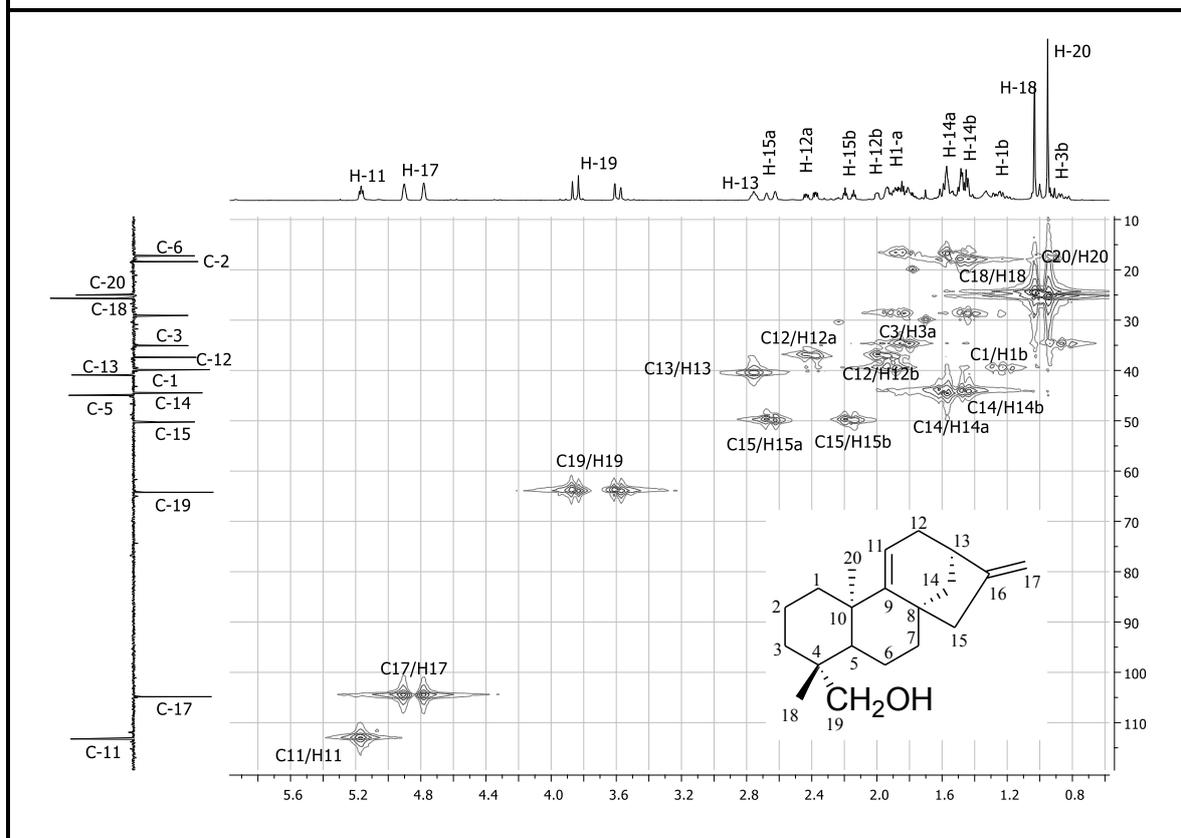


Tabla 8. Datos de RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 300 MHz y 75 MHz) del <i>ent</i> -Kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II]				
Posición	δ _c (ppm)	Tipo de carbono	multiplicidad	δ _H (ppm)
1	40,27	CH ₂	<i>m</i>	Ha:1,90; Hb:1,22
2	18,79	CH ₂	<i>m</i>	Ha:1,92; Hb:1,50
3	35,49	CH ₂	<i>m</i>	Ha:2,01; Hb:0,90
4	38,68	C	-	-
5	45,36	CH	<i>m</i>	H:1,61
6	17,64	CH ₂	<i>m</i>	H:1,85
7	29,48	CH ₂	<i>m</i>	H:2,00
8	42,15	C	-	-
9	157,29	C (sp ²)	-	-
10	38,19	C	-	-
11	113,67	CH(sp ²)	<i>s (ancho)</i>	H:5,17
12	37,85	CH ₂	<i>m</i>	Ha:2,41; Hb:1,93
13	41,32	CH	<i>s (ancho)</i>	H:2,76
14	44,87	CH ₂	<i>m</i>	Ha:1,57; Hb:1,46
15	50,65	CH ₂	<i>d (J:15,7 Hz)</i>	Ha:2,65
			<i>m</i>	Hb:2,18
16	158,68	C(sp ²)	-	-
17	105,27	CH ₂ (sp ²)	<i>s (ancho)</i>	Ha:4,93; Hb:4,80
18	25,43	CH ₃	<i>s</i>	H:1,03
19	64,64	CH ₂	<i>d (J:10,9 Hz)</i>	H: 3,85; H: 3,59
20	26,07	CH ₃	<i>s</i>	H:0,95

Figura 28. Espectro de Masas (impacto electrónico) del *ent*-Kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II]

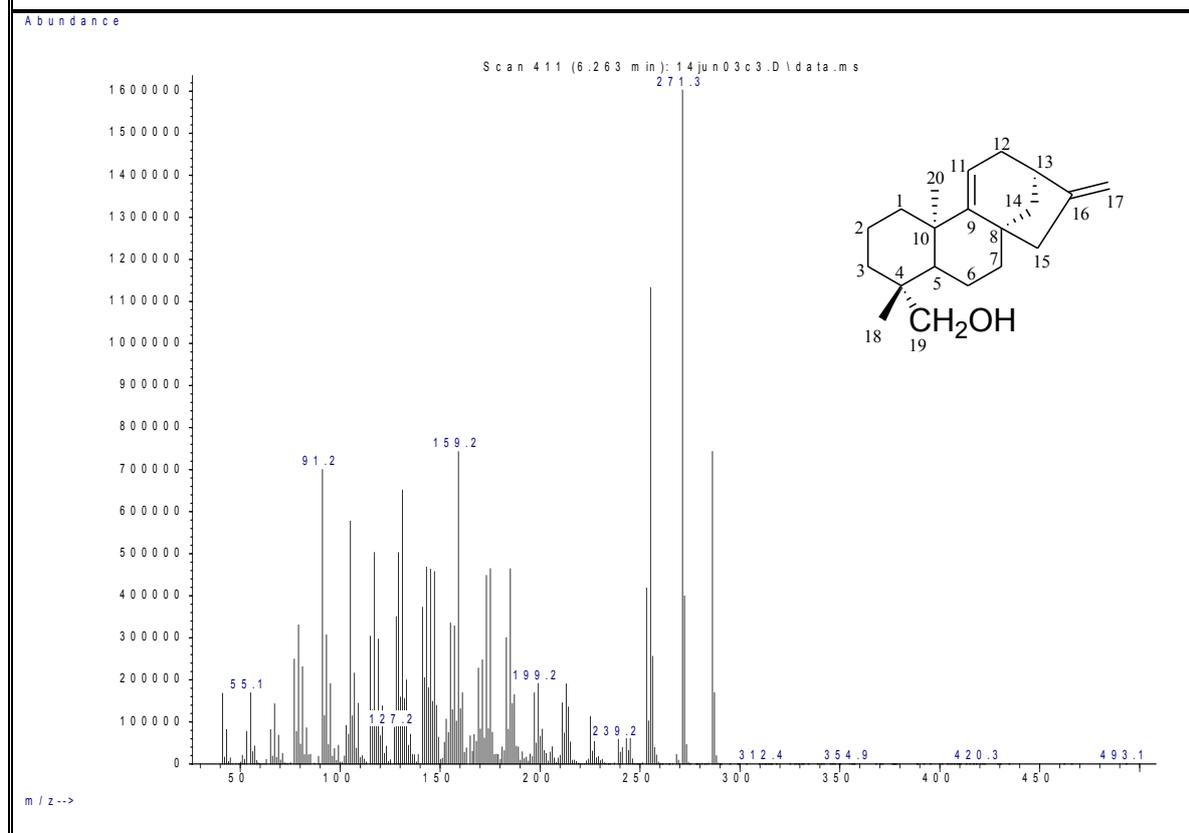


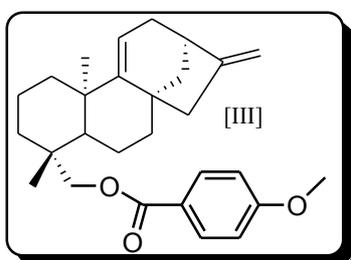
Tabla 9. Fragmentos m/z más notables en el espectro de masas del *ent*-Kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II]

m/z	288,3	271,3	255,2	199,2
Abundancia relativa	36,3	100,0	61,2	16,5
m/z	159,2	127,2	91,2	55,1
Abundancia relativa	54,4	54,7	73,6	45,9

VII.3 Ésteres derivados del *ent*-kaur-9(11),16-dieno-19-ol [III-XIV]

El *ent*-kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II] fue esterificado empleando diversos ácidos carboxílicos (Tabla 3). En los espectros de RMN uni- y bidimensionales de los derivados obtenidos, las señales del núcleo diterpénico, no presentan prácticamente ninguna modificación. Por esta razón, se hará especial énfasis en las regiones aromáticas de los espectros RMN-¹H y RMN-¹³C de los ésteres obtenidos con la finalidad de centrar la atención en el fragmento ácido que se ha acoplado al alcohol [II] y al AG [I] para el caso del compuesto [XVI].

VII.3.1 9(11),16-dieno-19-(4-metoxibenzoil)-*ent*-kaureno [III]



C₂₈H₃₆O₃

PM= 420 g/mol, Pf= 125-128°C

Aspecto: polvo blanco

Rendimiento= 129 mg (88%)

Después de tratar el *ent*-kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II] bajo las condiciones de reacción descritas en el procedimiento general VI.2.2, en presencia de ácido 4-metoxibenzoico, se obtuvo un polvo blanco (142 mg) purificado por cromatografía de columna con silica gel (ciclohexano), eluida con ciclohexano/AcOEt (90:10), obteniendo un polvo blanco (129 mg, 88%), que se reveló como una mancha homogénea sobre la TLC. Se confirmó que el compuesto [III] presentaba un grado de insaturación igual a once (11) y al examinar los análisis espectroscópicos obtenidos de IR (Fig. 29, Tabla 10), RMN-¹H (Fig. 30, Tabla 11), RMN-¹³C (Fig. 31, Tabla 11) y HMBC (Fig. 33) nos permitió corroborar que la sustancia se trataba del diterpeno denominado 9(11),16-dieno-19-(4-metoxibenzoil)-*ent*-kaureno [III].

El análisis comparativo de sus espectros con los del producto de partida [II], permitió caracterizar el esqueleto del derivado [III] de la siguiente manera:

1. En el espectro de IR (Fig. 29, Tabla 10) destaca la desaparición de la vibración de tensión OH del compuesto de partida [II], por el contrario se observan

absorciones atribuibles al grupo éster debido a una banda intensa correspondiente al grupo carbonilo ($C=O$; ν_{\max} : 1712 cm^{-1}) que se confirma con la vibración de tensión de los enlaces $-C-O$ a 1101 cm^{-1} . La presencia del anillo aromático se evidencia por la banda débil en 3034 cm^{-1} correspondiente a la absorción de tensión $C-H$, además se observan las bandas de tensión $-C=C-$ a $1606\text{ cm}^{-1} - 1458\text{ cm}^{-1}$ características del anillo bencénico. Las vibraciones junto con los sobretonos y bandas de combinación entre 2000 y 1667 cm^{-1} indican la presencia de un compuesto aromático sustituido en posición *para* que se comprueba con la vibración de flexión $=C-H$ a 790 cm^{-1} .

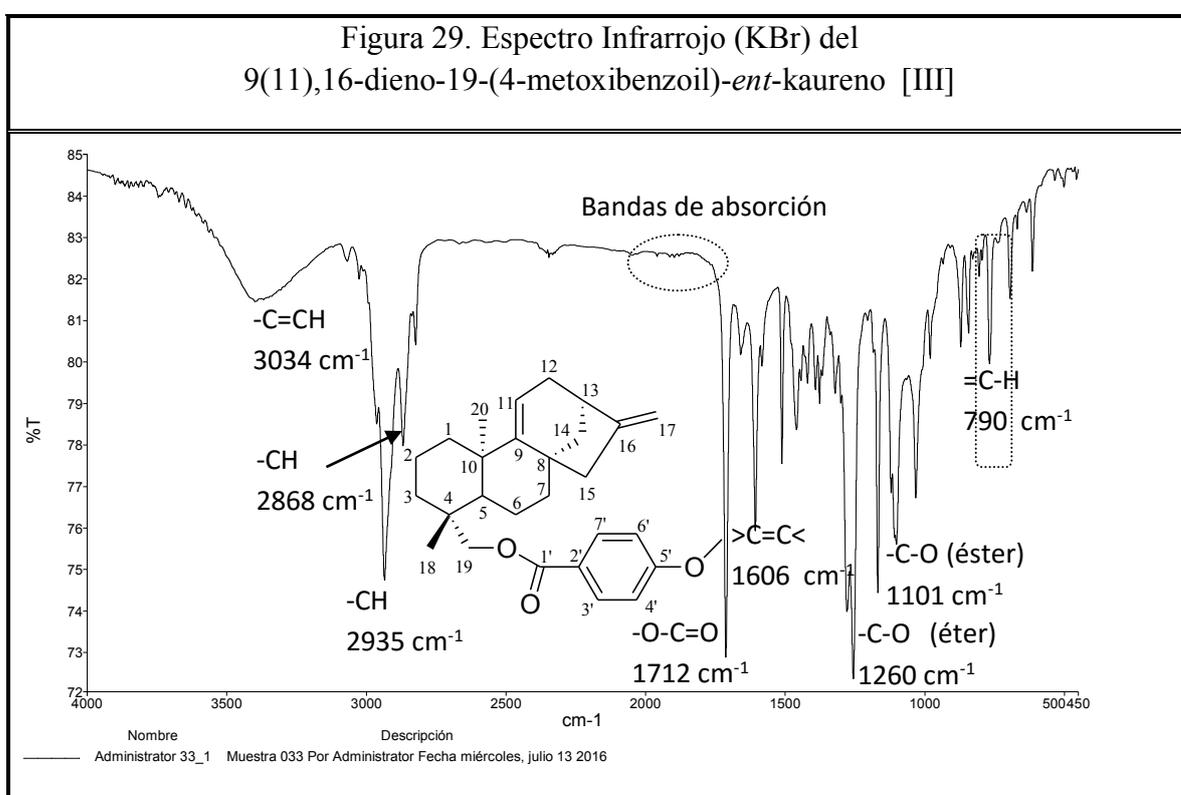
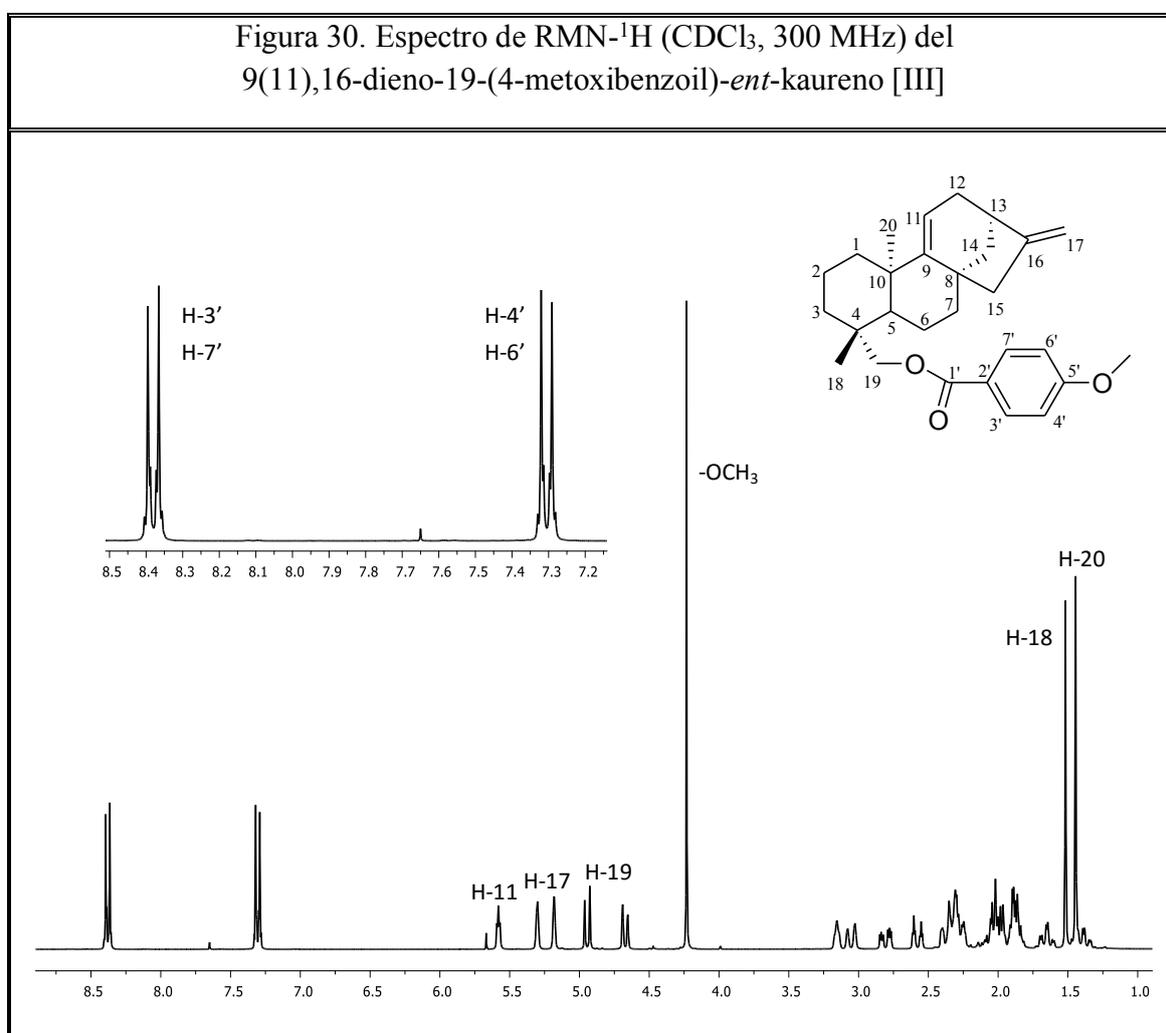


Tabla 10. Bandas de absorción en el espectro IR del 9(11),16-dieno-19-(4-metoxibenzoil)-*ent*-kaureno [III]

ν máx (cm^{-1})	3034	2935	2868	1712	1606	1260-1101
Asignación	$-C=CH$	$-CH$	$-CH$	$-O-C=O$	$>C=C<$	$-C-O$

2. En su espectro de RMN-¹H (Fig. 30, Tabla 11) resalta principalmente el desplazamiento a campos bajos de los dobletes correspondientes a los protones H-19 del compuesto [II] (δ : 3,85 ppm H-19a y δ : 3,59 ppm H-19b d J : 10,9 Hz) de la señal asignada a los hidrógenos del oximetileno H-19 en [III] (δ_{H} : 4,55 ppm H-19a y $\Delta\delta$: 4,28 ppm H-19b d J : 11 Hz), debido al efecto desapantallante del carbonilo del éster, y se verifica la presencia del anillo aromático por la aparición de dos dobletes que integran para 4H, indicando que se trata de un anillo bencénico 1,4-disustituido ($\Delta\delta$: 7,99 ppm H-3' - H-7' d J : 8,9 Hz y $\Delta\delta$: 6,92 ppm H-4' - H-6' d J : 8,9 Hz), adicionalmente se observa la presencia del grupo metoxi (-OCH₃) ubicado en posición *para* en el anillo aromático ($\Delta\delta$: 3,85 ppm).



3. En el espectro de RMN-¹³C (Fig. 31, Tabla 11) se observa la presencia de 28 carbonos los cuales pudieron ser discriminados según su orientación en el DEPT-135. La señal que aparece a δ_c : 167,1 ppm revela la presencia del carbono carbonílico del grupo éster identificado como C-1', también se puede apreciar el desplazamiento a campo más bajo de la señal del C-19 asignada en el compuesto [II] a δ_c : 64,64 ppm mientras que en el compuesto [III] se encuentra a δ_c : 67,02 ppm. Asimismo observamos las señales de los carbonos del anillo bencénico 1,4 disustituido como son δ_c : 123,7 ppm (C-2'), 131,9 ppm (C-3' y C-7'), 114,1 ppm (C-4' y C-6'), 163,7 ppm (C-5').

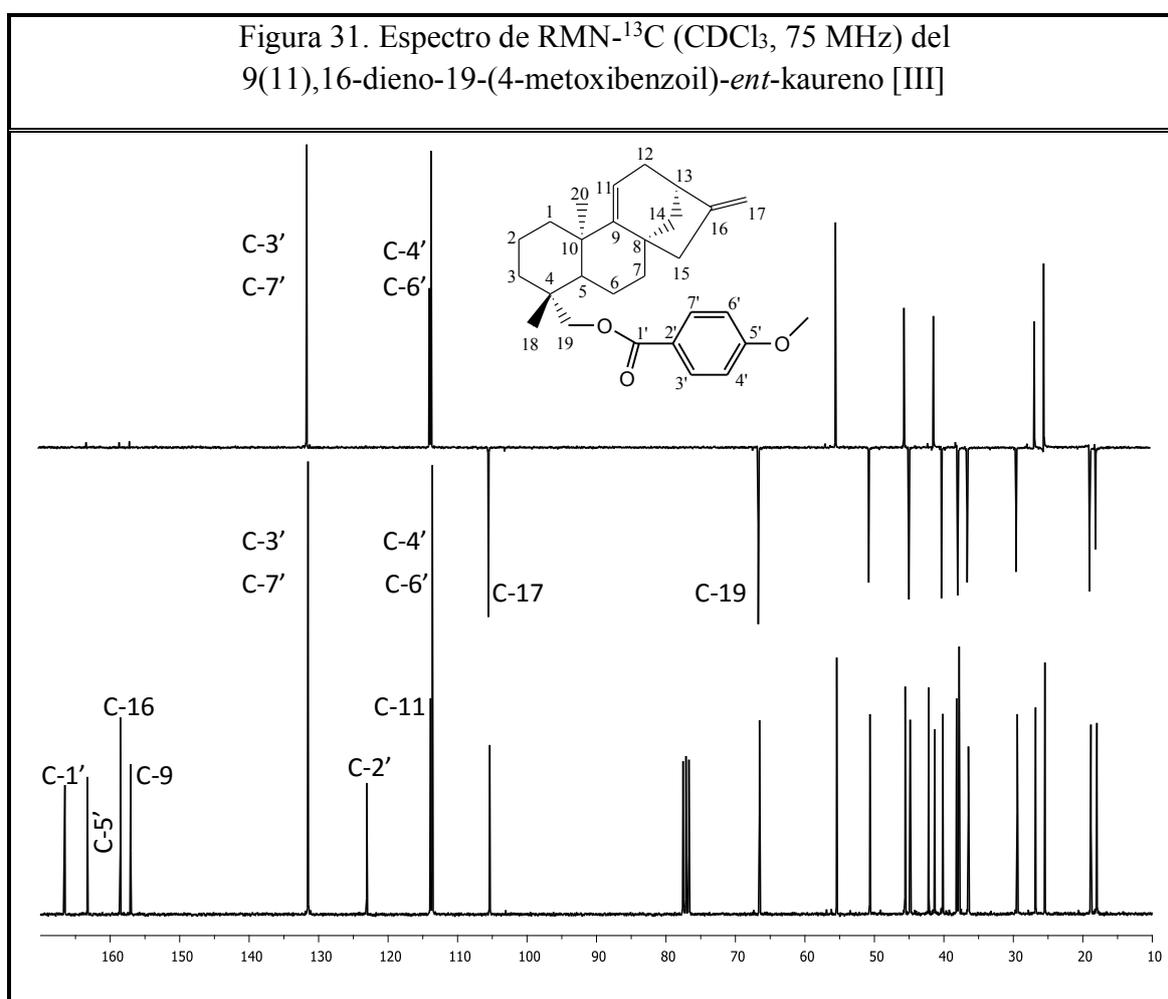


Tabla 11. Desplazamientos Químicos (δ) en los Espectros de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 300 y 75 MHz), del fragmento que corresponde al 4-metoxibenzoato del éster [III]						
H	H-3' y H-7'		H-4' y H-6'		-OCH ₃	
δ_{H} (ppm)	7,99		6,92		3,85	
M	<i>d</i>		<i>d</i>		<i>s</i>	
<i>J</i> (Hz)	8,9		8,9		-	
C	C-1'	C-2'	C-3' y C-7'	C-4' y C-6'	C-5'	-OCH ₃ (5')
δ_{C} (ppm)	167,1	123,7	131,9	114,1	163,7	55,9
Tipo	-O-C=O	=C<	=CH	=CH	=C-O	-OCH ₃

4. Finalmente en el espectro HMBC (Fig. 33) se observan las correlaciones entre los protones H-19a (δ_{H} : 4,55 ppm) y H-19b (δ_{H} : 4,28 ppm) con el carbono cuaternario del grupo carbonilo señalado como C-1' (δ_{C} : 167,1 ppm) permitiendo confirmar que la molécula se encuentra unida por medio de un enlace éster.

De acuerdo al número de hidrógenos y carbonos que conforman la molécula, así como los grupos funcionales que están presentes en la misma, queda en evidencia que el producto obtenido de la reacción de Steglich se trata del compuesto 9(11),16-dieno-19-(4-metoxibenzoil)-*ent*-kaureno [III], es importante resaltar que es la primera vez que se obtiene por hemisíntesis este compuesto, por lo tanto es el primer reporte sobre esta molécula.

Figura 32. Correlación del espectro HMBC (CDCl_3 , 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(4-metoxibenzoil)-*ent*-kaureno [III]

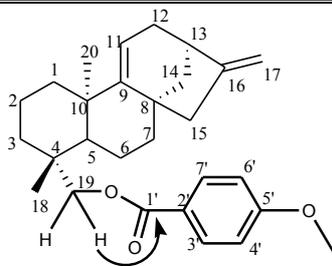
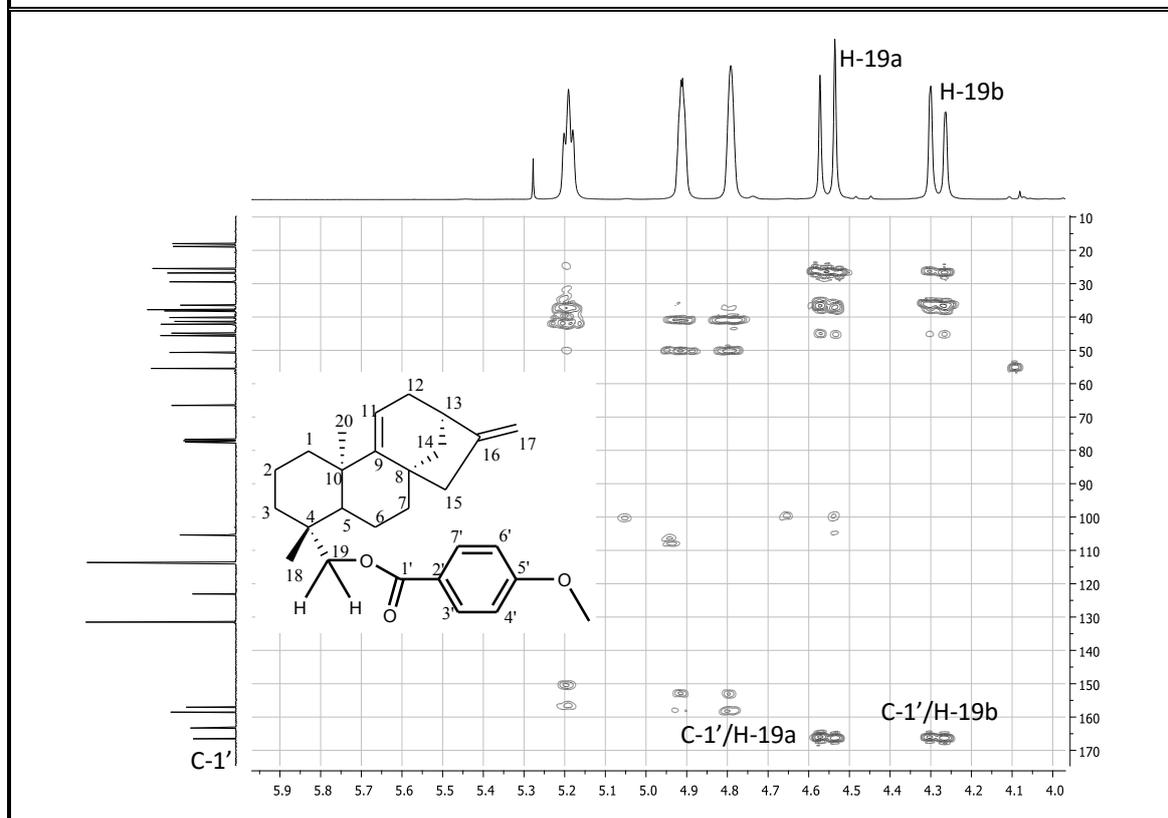
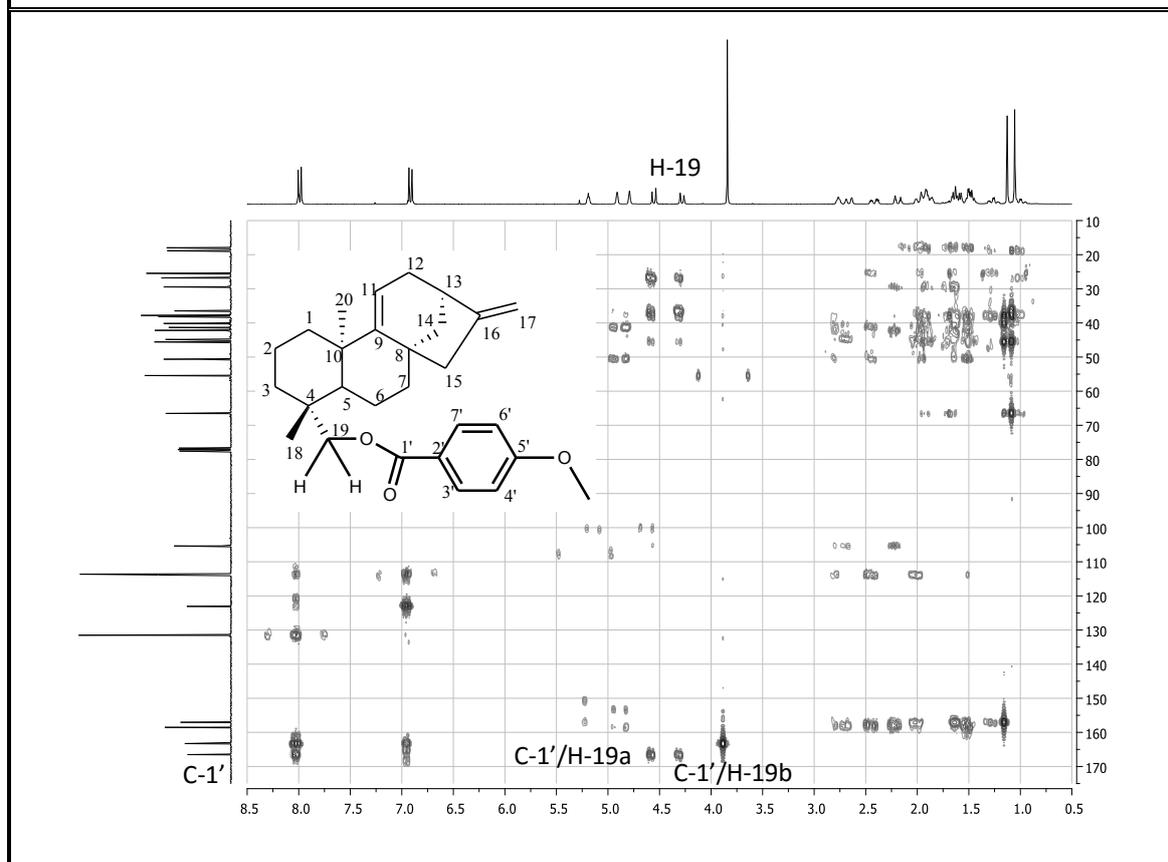
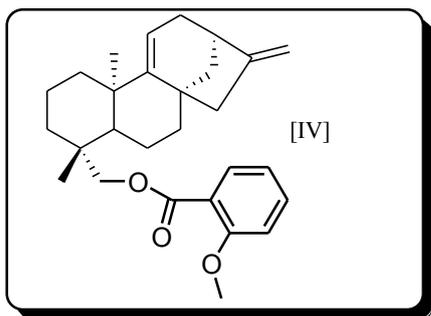


Figura 33. Espectro de HMBC (CDCl₃, 75 MHz) del
9(11),16-dieno-19-(4-metoxibenzoil)-*ent*-kaureno [III]



VII.3.2 9(11),16-dieno-19-(2-metoxibenzoil)-*ent*-kaureno [IV]



$C_{28}H_{36}O_3$

PM= 420 g/mol

Aspecto: oleoso incoloro

Rendimiento= 134 mg (92%)

Al hacer reaccionar el *ent*-kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II] con el ácido 2-metoxibenzoico bajo las condiciones de reacción descritas en el procedimiento general VI.2.2, se obtuvo un compuesto oleoso incoloro (161 mg) purificado por cromatografía de columna con silica gel (ciclohexano), eluida con ciclohexano/AcOEt (95:5) obteniendo 134 mg de un compuesto oleoso incoloro. Su fórmula molecular $C_{28}H_{36}O_3$, se estableció al determinar, a través de sus espectros de RMN- 1H (Fig. 35; Tabla 13), RMN- ^{13}C , DEPT-135 (Fig. 36; Tabla 13) el número y naturaleza de los carbonos que integran la molécula. Está fórmula concuerda para el derivado esperado, 9(11),16-dieno-19-(2-metoxibenzoil)-*ent*-kaureno [IV].

A continuación se resaltan las características que revelan la presencia del grupo funcional éster y un anillo aromático en el compuesto 9(11),16-dieno-19-(2-metoxibenzoil)-*ent*-kaureno [IV]:

1. En el espectro de IR (Fig. 34, Tabla 12) destaca la desaparición de la vibración de tensión OH del compuesto de partida [II], por el contrario se observan absorciones atribuibles al grupo éster debido a una banda intensa correspondiente al grupo carbonilo (C=O; ν_{max} : 1726 cm^{-1}) que se confirma con la vibración de tensión de los enlaces -C-O a 1131 cm^{-1} . La presencia del anillo aromático se evidencia por la banda débil en 3020 cm^{-1} correspondiente a la absorción de tensión C-H, además se observan las bandas de tensión -C=C- a 1600 cm^{-1} – 1406 cm^{-1} características del anillo bencénico. Las vibraciones junto con los sobretonos y bandas de combinación entre 2000 y 1667 cm^{-1} indican la presencia de un compuesto aromático disustituido en posición *orto* que se comprueba con la vibración de flexión =C-H a 755 cm^{-1} .

Figura 34. Espectro Infrarrojo (KBr) del
9(11),16-dieno-19-(2-metoxibenzoil)-*ent*-kaureno [IV]

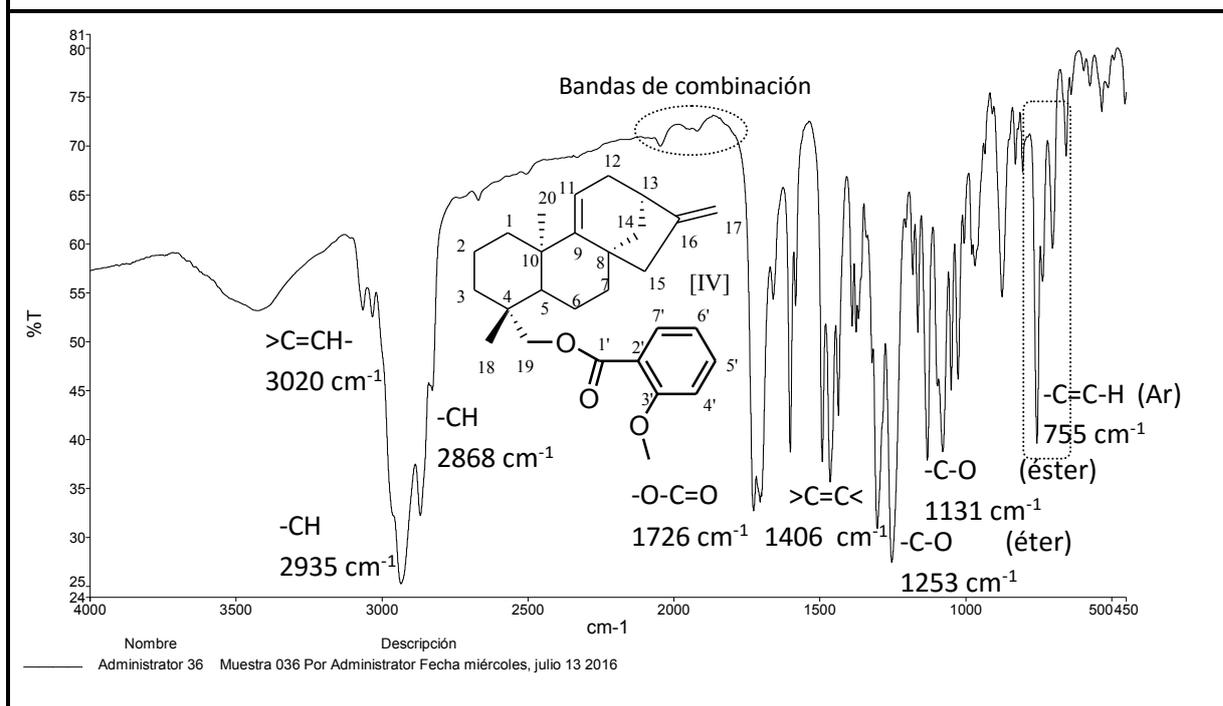
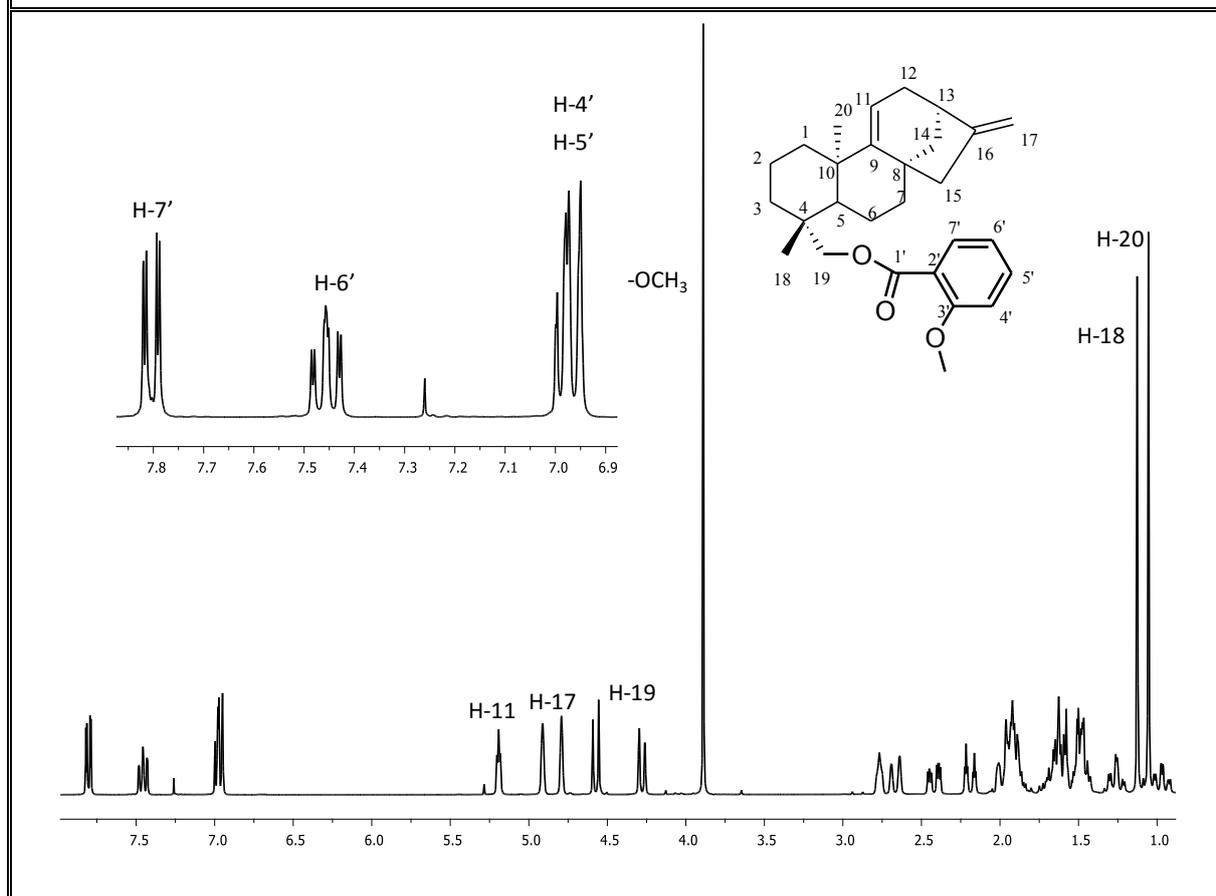


Tabla 12. Bandas de absorción en el espectro IR del
9(11),16-dieno-19-(2-metoxibenzoil)-*ent*-kaureno [IV]

ν máx (cm ⁻¹)	3020	2935	2868	1726	1600-1406	1131-1253	755
Asignación	>C=CH-	-CH	-CH	-O-C=O	>C=C<	-C-O	-C=C-H (Ar)

2. En su espectro de RMN-¹H (Fig. 35, Tabla 13) resalta principalmente el desplazamiento a campos bajos de los dobletes correspondientes a los protones H-19 del compuesto [II] (δ : 3,85 ppm H-19a y δ : 3,59 ppm H-19b d J : 10,9 Hz) de la señal asignada a los hidrógenos del oximetileno H-19 en [IV] (δ _H: 4,57 ppm H-19a y $\Delta\delta$: 4,28 ppm H-19b d J : 11 Hz), debido al efecto desapantallante del carbonilo del éster, y se verifica la presencia del anillo aromático por la aparición de multipletes a δ _H: 6,98 ppm, 1H, (H-4' y H-5'); δ _H: 7,46 ppm 1H, (H-6'); y doblete de doblete a δ _H: 7,80 ppm, 1H, (H-7'), indicando que se trata de un anillo bencénico 1,2-disustituido, adicionalmente se observa la presencia un singlete correspondiente al grupo metoxi a δ _H: 3,89 ppm, 3H, (-OCH₃).

Figura 35. Espectro de RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(2-metoxibenzoil)-*ent*-kaureno [IV]



3. En el espectro de RMN-¹³C (Fig. 36, Tabla 13) se observa la presencia de 28 carbonos los cuales pudieron ser discriminados según su orientación en el DEPT-135, principalmente destaca la identificación en el espectro de RMN-¹³C de una nueva señal a δ_c : 166,3 ppm C-1' propia del carbonilo de un éster (-O-C=O), además se puede apreciar el desplazamiento a campo más bajo de la señal del C-19 asignada en el compuesto [II] a δ_c : 64,64 ppm mientras que en el compuesto [IV] se encuentra a δ_c : 66,80 ppm. Asimismo observamos las señales de los carbonos del anillo bencénico 1,2 disustituido como son a δ_c : 120,1 ppm (C-2'), δ_c : 158,9 ppm (C-3'), δ_c : 113,7 ppm (C-4'), δ_c : 119,9 ppm (C-5'), δ_c : 131,4 ppm (C-6'), 133,2 ppm (C-7'), adicionalmente se confirma la presencia del grupo -OCH₃ a 55,9 ppm.

Figura 36. Espectro de RMN-¹³C (CDCl₃, 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(2-metoxibenzoil)-*ent*-kaureno [IV]

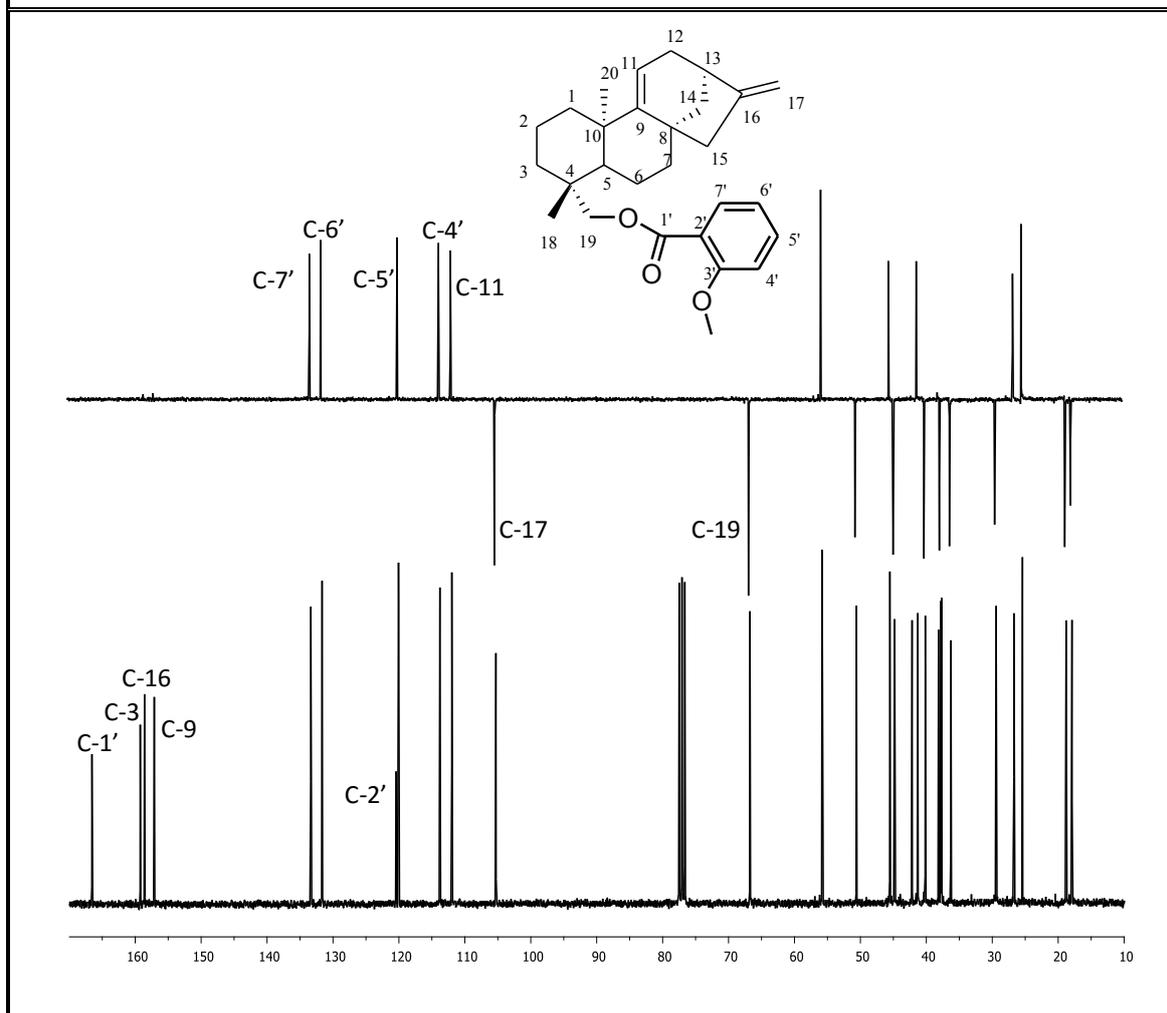


Tabla 13. Desplazamientos Químicos (δ) en los Espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C (CDCl₃, 300 MHz y 75 MHz), del fragmento que corresponde al del 2-metoxibenzoato del éster [IV]

H	H-4'	H-5'	H-6'	H-7'	-OCH ₃		
δ_H (ppm)	6,98	6,98	7,46	7,80	3,89		
multiplicidad	<i>m</i>	<i>m</i>	<i>m</i>	<i>dd</i>	<i>s</i>		
<i>J</i> (Hz)	-	-	-	7,9 y 1,8	-		
C	C-1'	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'	C-6'	C7'
δ_c (ppm)	166,3	120,1	158,9	113,7	119,9	131,3	133,2
Tipo	-O-C=O	=C<	=C-O-	=CH	=CH	=CH	=CH

4. En el espectro de HMBC (Fig. 38) se confirma la naturaleza del éster, mediante la secuencia de correlaciones H-19 \leftrightarrow C-1', es evidente que la ubicación del éster quedo establecida de manera inequívoca en C-19, a raíz de la observación en el espectro HMBC de un cruce entre la señal asignada a los hidrógenos H-19a (δ_H : 4,57 ppm) y H-19b (δ_H : 4,28 ppm) con la señal atribuida al carbonilo del éster (C-1').

En conclusión la estructura del compuesto en estudio corresponde al 9(11),16-dieno-19-(2-metoxibenzoil)-*ent*-kaureno [IV], el cual no se ha descrito con anterioridad en la literatura, y en consecuencia es la primera vez que se obtiene por hemisíntesis este éster derivado del *ent*-kaureno.

Figura 37. Correlación del espectro HMBC (CDCl₃, 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(2-metoxibenzoil)-*ent*-kaureno [IV]

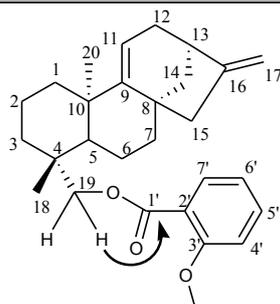
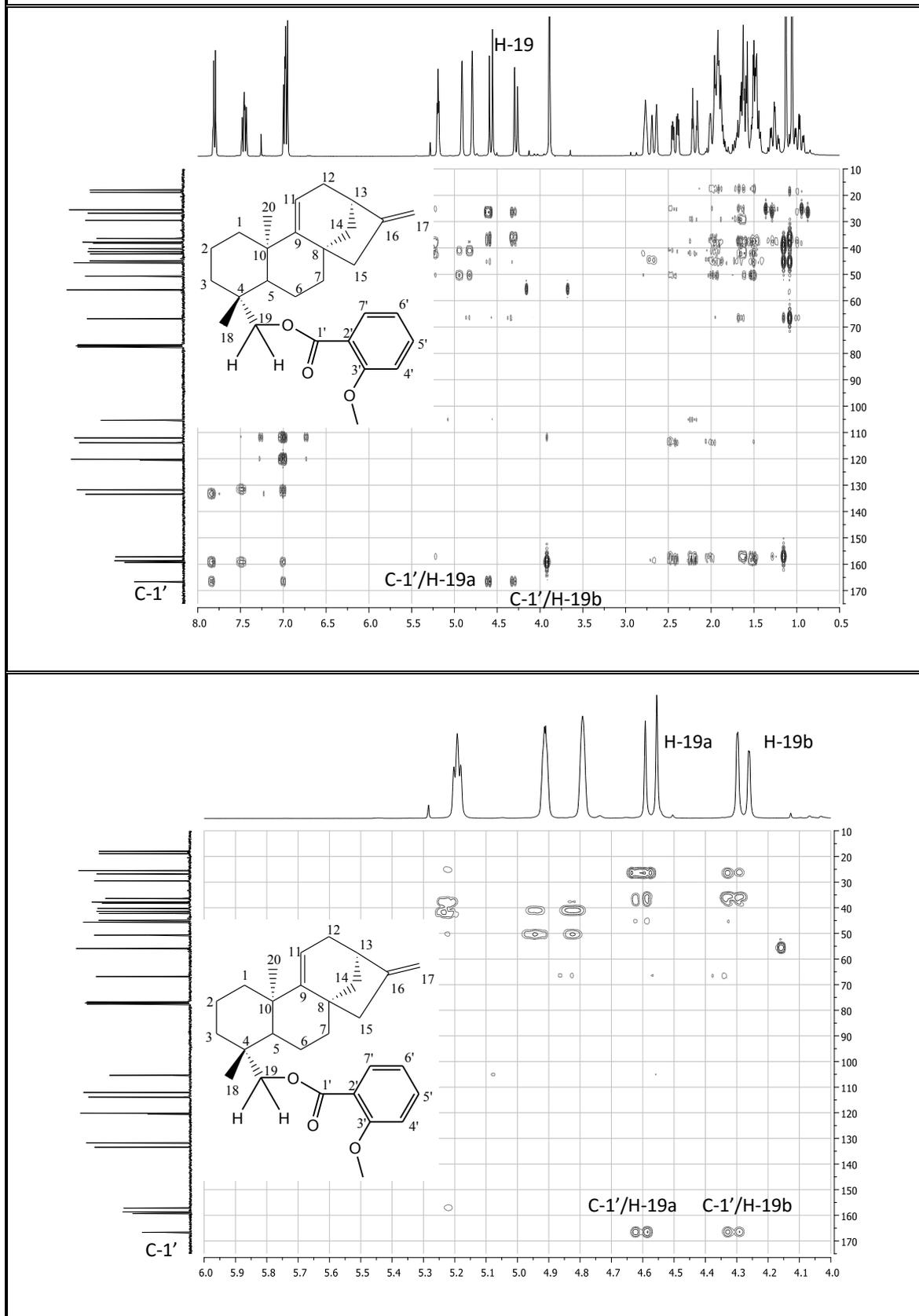
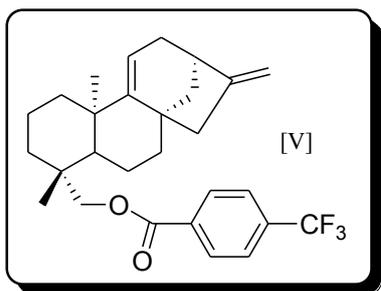


Figura 38. Espectro de HMBC (CDCl₃, 75 MHz) del
9(11),16-dieno-19-(2-metoxibenzoil)-*ent*-kaureno [IV]



VII.3.3 9(11),16-dieno-19-(4-trifluorometilbenzoil)-*ent*-kaureno [V]



$C_{28}H_{33}O_2F_3$

PM= 458 g/mol

Aspecto: oleoso incoloro

Rendimiento= 130 mg (81%)

El producto obtenido al tratar el *ent*-kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II] con el ácido 4-trifluorometilbenzoico en diclorometano a temperatura ambiente (ver parte experimental procedimiento general VI.2.2), fue purificado por cromatografía de columna con silica gel (eluida con ciclohexano/AcOEt (95:5)), obteniendo un compuesto oleoso incoloro (130 mg, 81%), que se reveló como una mancha homogénea sobre la TLC.

Al tomar en cuenta la información aportada por su espectro de RMN- ^{13}C y DEPT-135 (Fig. 41; Tabla 15), sobre el número y naturaleza de los carbonos presentes en la molécula, se calculó su fórmula molecular, $C_{28}H_{33}O_2F_3$. Al cotejar la fórmula molecular del alcohol de partida [II] ($C_{20}H_{30}O$) con la de este derivado resulta obvio la ganancia de ocho carbonos, cuatro hidrógenos y un átomo de oxígeno, lo cual concuerda perfectamente con la sustitución del hidroxilo del alcohol primario por el grupo benzoilo. La exploración de sus datos espectrales: IR (Fig. 39; Tabla 14), RMN- 1H (Fig. 40; Tabla 15), RMN- ^{13}C (Fig. 41, Tabla 15), y HMBC (Fig. 43), reveló que en efecto, se trata del compuesto 9(11),16-dieno-19-(4-trifluorometilbenzoil)-*ent*-kaureno [V]. Los espectros de este derivado guardan mucha similitud con los del producto de partida, por lo que solo se destacarán aquellos rasgos que sustentan la presencia del nuevo grupo benzoilo en la molécula, como lo son:

1. En el espectro de IR (Fig. 39, Tabla 14) se evidencian la presencia de un grupo éster al lado de un anillo aromático debido a una banda intensa correspondiente al grupo carbonilo (C=O) en 1724 cm^{-1} , la cual se confirma con la vibración de tensión de los enlaces -C-O a 1100 cm^{-1} . La presencia del anillo aromático se confirma por la banda débil en 3035 cm^{-1} correspondiente a la absorción de tensión C-H, que se encuentra a la izquierda de la banda típica saturada C-H

(2868 cm^{-1}), además se observan las bandas de tensión -C=C- a 1600 cm^{-1} – 1412 cm^{-1} características del anillo bencénico. Las vibraciones junto con los sobretonos y bandas de combinación entre 2000 y 1667 cm^{-1} indican la presencia de un compuesto aromático disustituido en posición *para* que se constata con la vibración de flexión fuera del plano =C-H a 800 cm^{-1} .

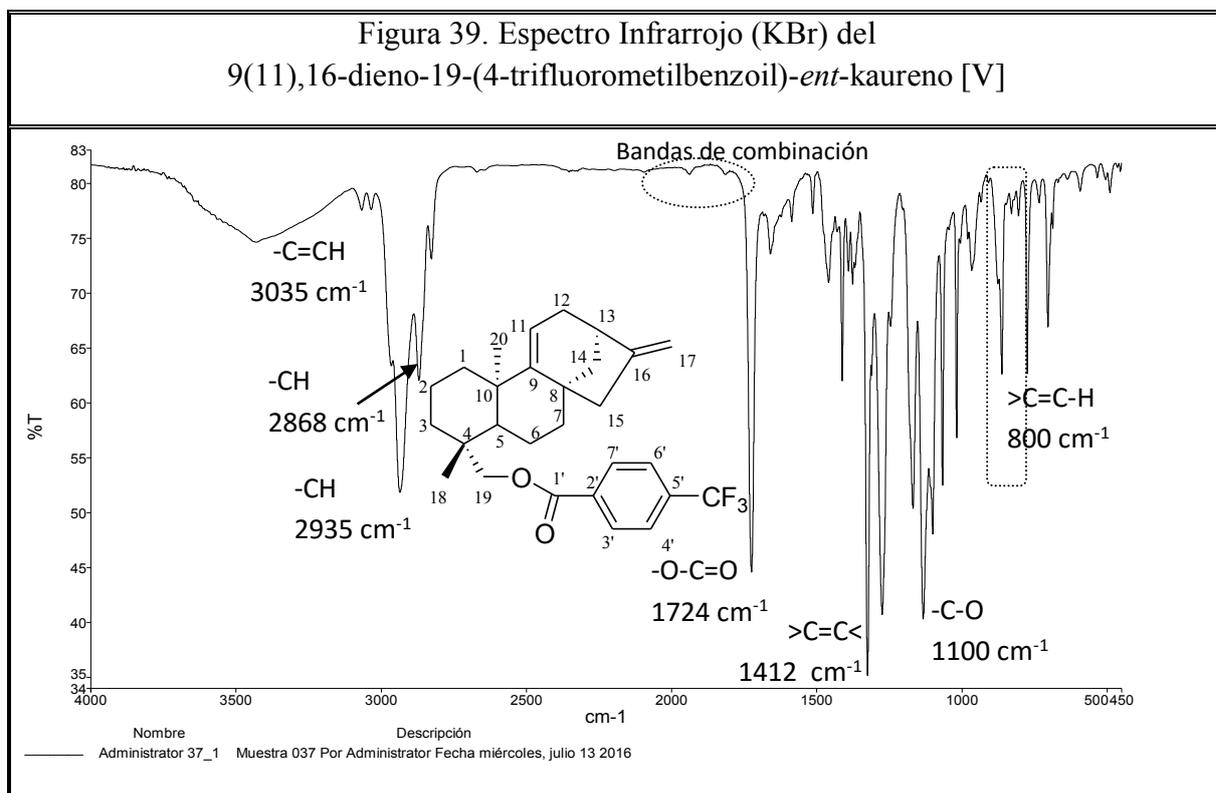
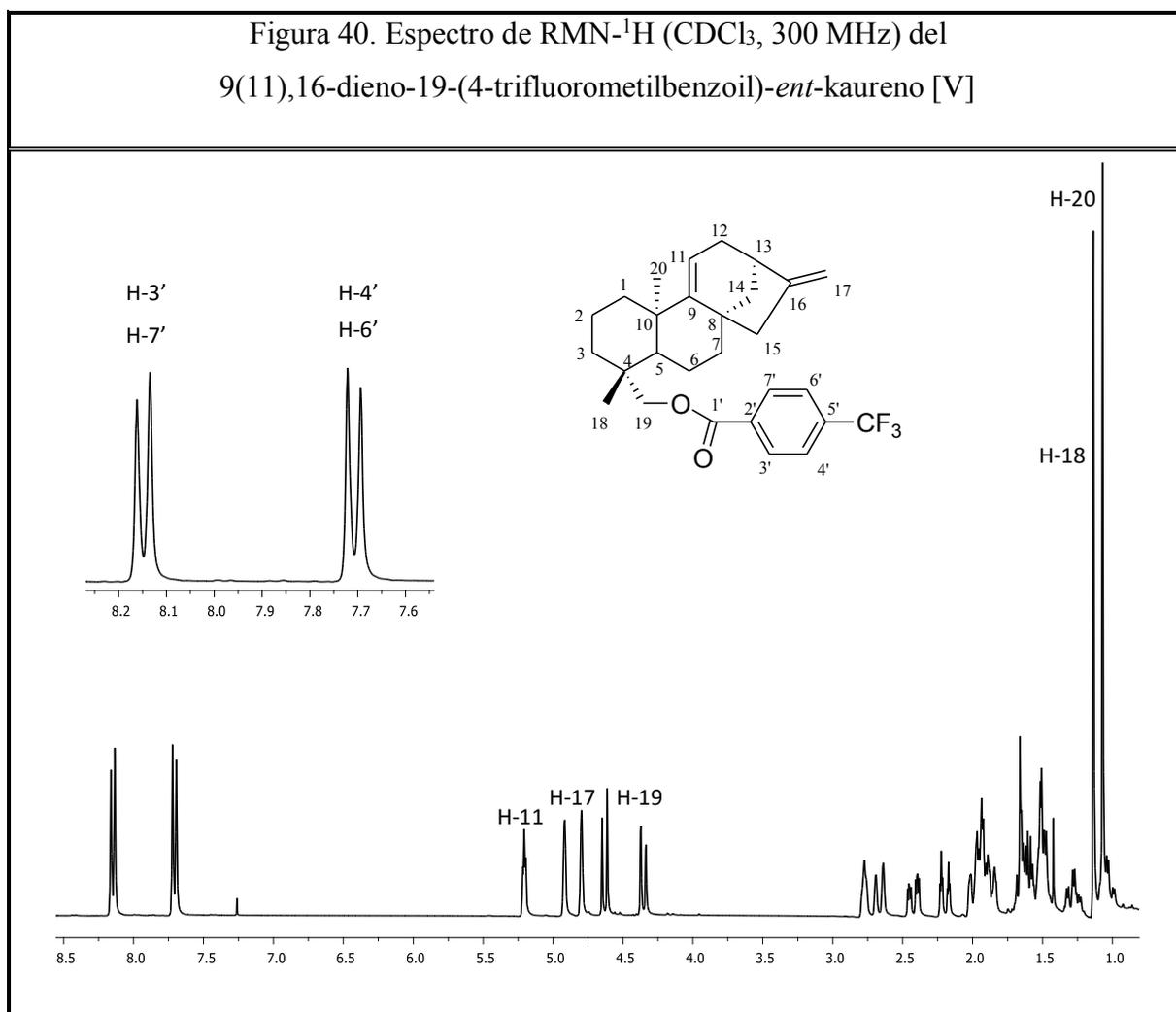


Tabla 14. Bandas de absorción en el espectro IR del 9(11),16-dieno-19-(4-trifluorometilbenzoil)-*ent*-kaureno [V]

ν máx (cm^{-1})	3035	2935	2868	1724	1412	1100	800
Asignación	>C=CH	-CH	-CH	-O-C=O	>C=C<	-C-O	>C=C-H

2. En su espectro de $\text{RMN-}^1\text{H}$ (Fig. 40, Tabla 15) es importante resaltar el desplazamiento a campos bajos de los dobletes correspondientes a los protones H-19 del compuesto [II] (δ : 3,85 ppm H-19a y δ : 3,59 ppm H-19b d J : 10,9 Hz) de la señal asignada a los hidrógenos del oximetileno H-19 en [V] (δ_{H} : 4,63 ppm H-19a y $\Delta\delta$: 4,35 ppm H-19b d J : 11 Hz), debido al efecto desapantallante del

carbonilo del éster, además se observan dos nuevas señales correspondientes a los protones del anillo aromático a δ_H : 7,71 ppm (H-3, H-7') [dobletes, 2H, (J : 8,2 Hz)] y δ_H : 8,15 ppm (H-4', H-6') [dobletes, 2H, (J : 8,1 Hz)], indicando que se trata de un anillo bencénico 1,4-disustituido.



- La existencia en el espectro de RMN- ^{13}C (Fig. 41, Tabla 15) de un pico a δ_c : 165,7 ppm se atribuye a un carbono carbonílico propio de ésteres, que asociado a la diferencia de desplazamiento químico en la posición del pico asignado al C-19 en el alcohol de partida [II] (δ_c : 64,64) versus el producto de reacción 9(11),16-dieno-19-(4-trifluorometilbenzoil)-*ent*-kaureno [V] (δ_c : 67,62) valida la formación del grupo funcional éster. La detección de dos nuevas señales a δ_c : 130,1 (CH, C-3', C-7') y δ_c : 125,6 (CH, C-4', C-6') nos permite confirmar que

el anillo aromático que forma parte del compuesto [V] se encuentra disustituido en posiciones 1,4.

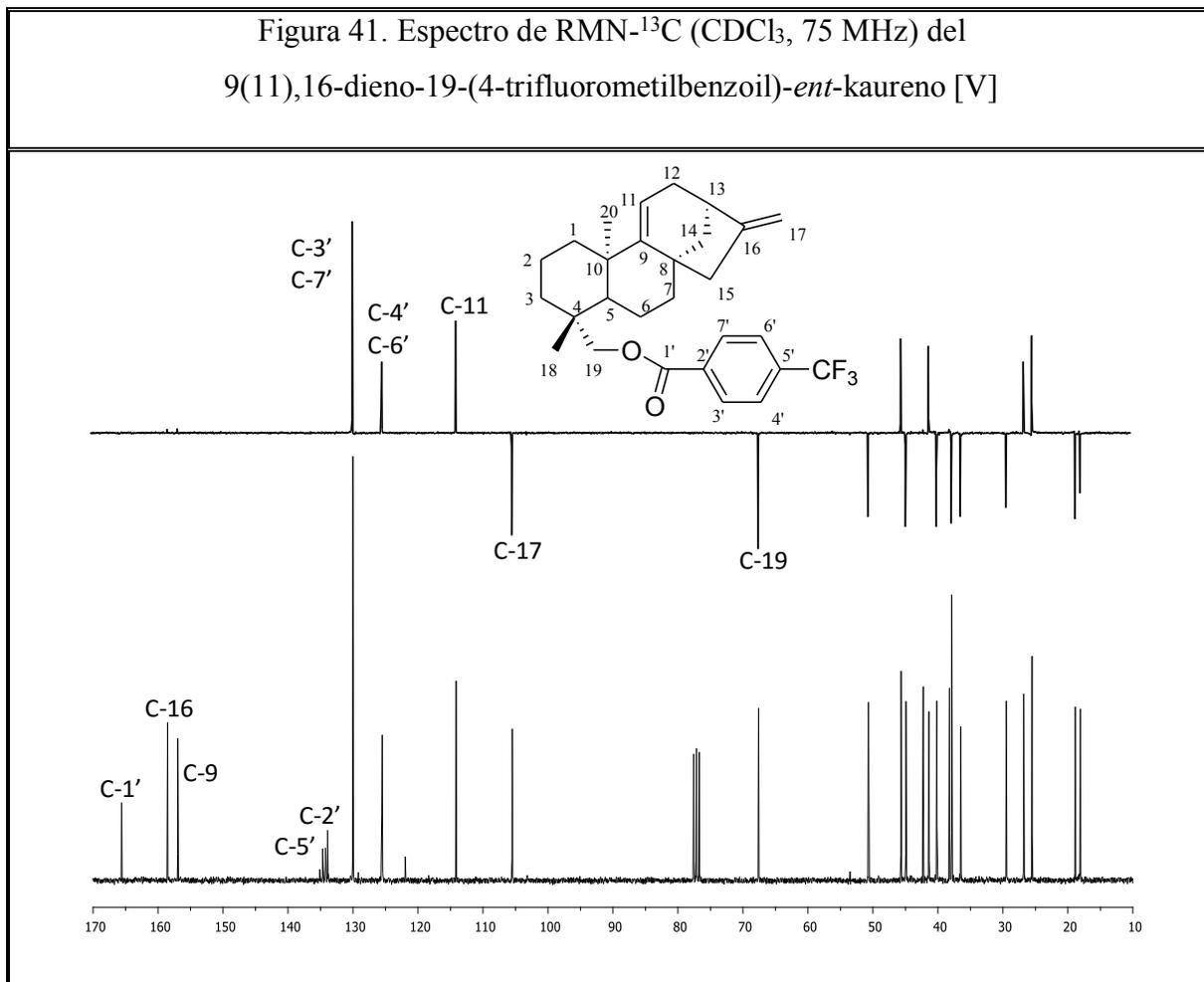


Tabla 15. Desplazamientos Químicos (δ) en los Espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C (CDCl₃, 300 MHz y 75 MHz), del fragmento que corresponde al 4-trifluorobenzoato del éster [V]

H	H-3'	H-4'	H-6'	H-7'			
δ_H (ppm)	8,15	7,71	7,71	8,15			
M	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>			
<i>J</i> (Hz)	8,1	8,2	8,2	8,1			
C	C-1'	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'	C-6'	C-7'
δ_C (ppm)	165,7	135,1	130,1	125,6	134,4	125,6	130,1
Tipo	-O-C=O	=C<	=CH	=CH	=C-CF ₃	=CH	=CH

4. Las correlaciones en el HMBC (Fig. 43) de los protones H-19 con el carbono cuaternario carbonílico asignado como C-1' nos permiten demostrar la formación del grupo funcional éster de manera inequívoca en C-19.

De acuerdo con los datos anteriores se demuestra que el producto de la reacción entre el *ent*-kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II] y el ácido 4-trifluorometilbenzoico es el compuesto 9(11),16-dieno-19-(4-trifluorometilbenzoil)-*ent*-kaureno [V], cabe resaltar que es la primera vez que se obtiene por hemisíntesis este derivado *ent*-kaureno, por lo tanto es el primer reporte sobre esta molécula.

Figura 42. Correlación del espectro HMBC (CDCl₃, 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(4-trifluorometilbenzoil)-*ent*-kaureno [V]

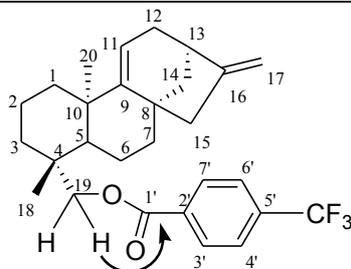
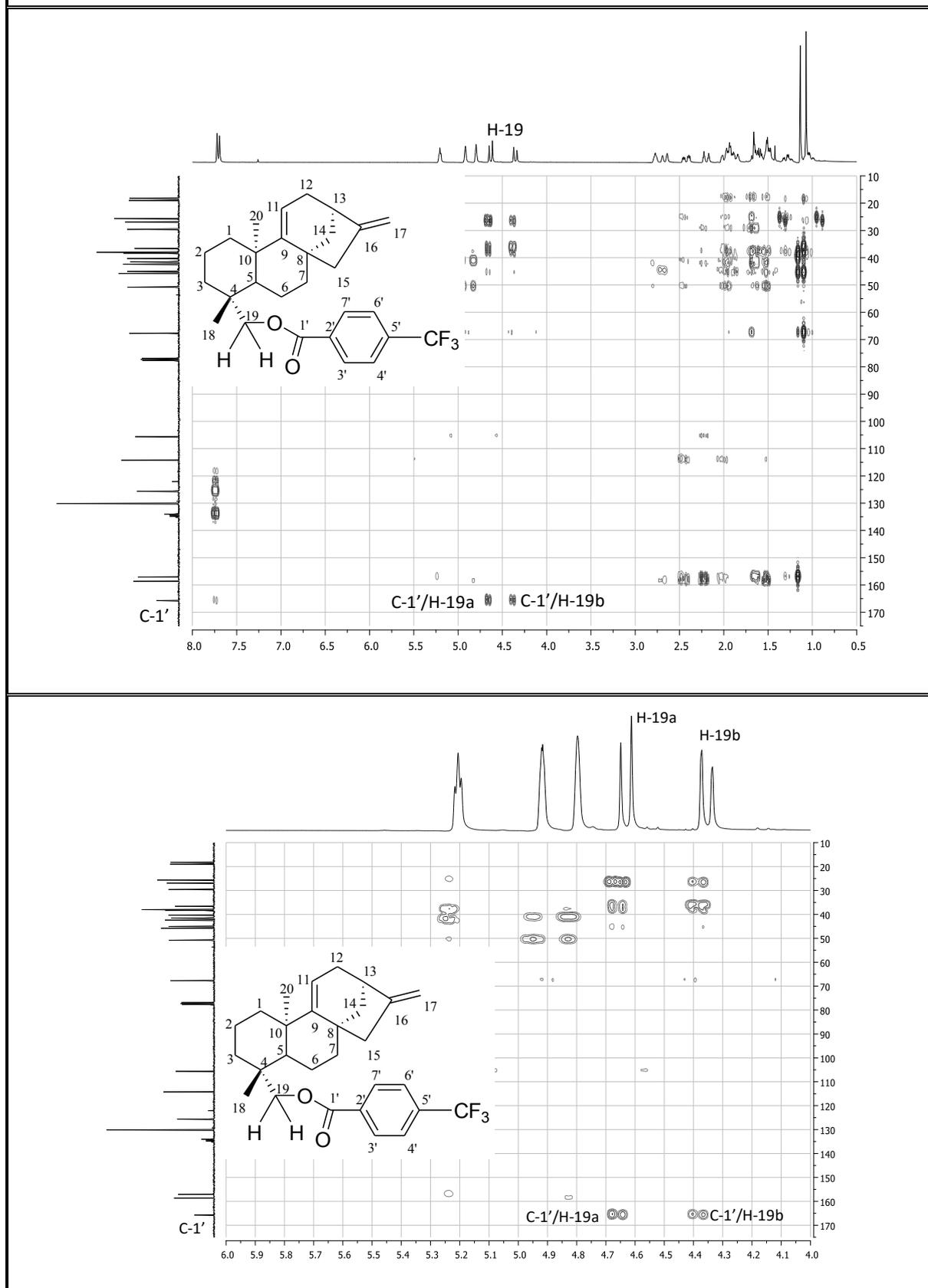
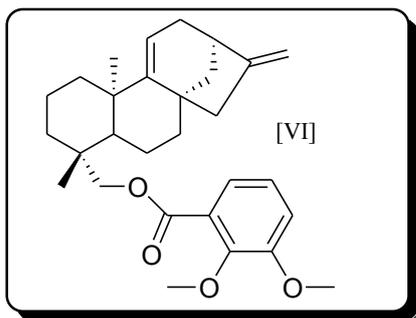


Figura 43. Espectro de HMBC (CDCl₃, 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(4-trifluorometilbenzoil)-*ent*-kaureno [V]



VII.3.4 9(11),16-dieno-19-(2,3-dimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [VI]



$C_{29}H_{38}O_4$

PM= 450 g/mol

Aspecto: oleoso incoloro

Rendimiento= 146 mg (93%)

El compuesto 9(11),16-dieno-19-(2,3-dimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [VI] resulto ser oleoso e incoloro, producto de la reacción del *ent*-kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II] con el ácido 2,3-dimetoxibenzoico, purificado por cromatografía de columna con silica gel (ciclohexano), eluida con ciclohexano/AcOEt (90:10) a partir de 302 mg de un residuo oleoso incoloro. Considerando el origen del compuesto (bajo las condiciones de reacción descritas en el procedimiento general VI.2.2), y el análisis de los datos derivados de su espectro RMN- 1H (Fig. 45; Tabla 17), RMN- ^{13}C (Fig. 46; Tabla 17), permitieron determinar su fórmula molecular, $C_{29}H_{38}O_4$. Al comparar sus datos espectrales con los del alcohol de partida [II] se observan los siguientes cambios significativos que permitieron confirmar la formación del compuesto [VI]:

1. En el espectro de IR (Fig.44, Tabla 16) se evidencian la presencia de un grupo éster al lado de un anillo aromático debido a una banda intensa correspondiente al grupo carbonilo (C=O) en 1727 cm^{-1} , la cual se confirma con la vibración de tensión de los enlaces -C-O a 1058 cm^{-1} . La presencia del anillo aromático se corrobora por la banda débil en 3034 cm^{-1} correspondiente a la absorción de tensión C-H, que se encuentra a la izquierda de la banda típica saturada C-H (2869 cm^{-1}), además se observan las bandas de tensión -C=C- a 1600 cm^{-1} – 1412 cm^{-1} características del núcleo bencénico. Las vibraciones junto con los sobretonos y bandas de combinación entre 2000 y 1667 cm^{-1} indican la presencia de un compuesto aromático trisustituido en las posiciones 1,2 y 3 del anillo que se constata con las vibraciones de flexión fuera del plano =C-H a 780 cm^{-1} y 745 cm^{-1} . Es importante resaltar la desaparición de la vibración de tensión OH del compuesto de partida [II], y el solapamiento de la señal del doble enlace olefínico C=C 1660 por la presencia del grupo carbonilo.

Figura 44. Espectro Infrarrojo (KBr) del 9(11),16-dieno-19-(2,3-dimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [VI]

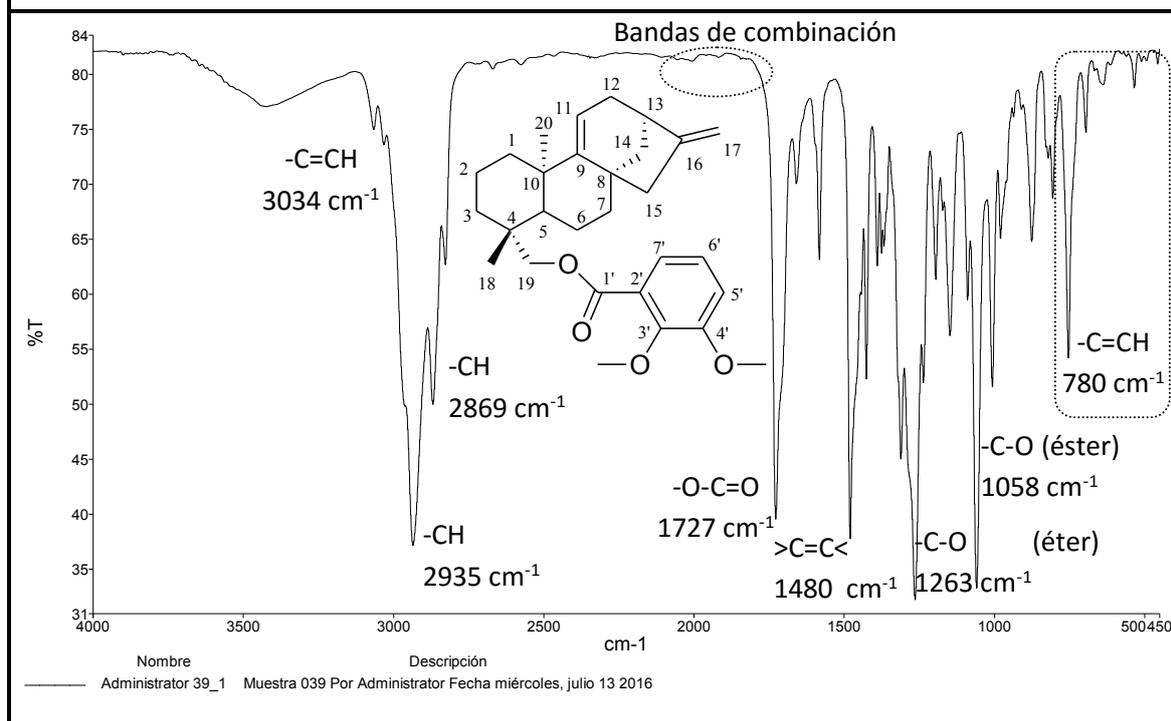
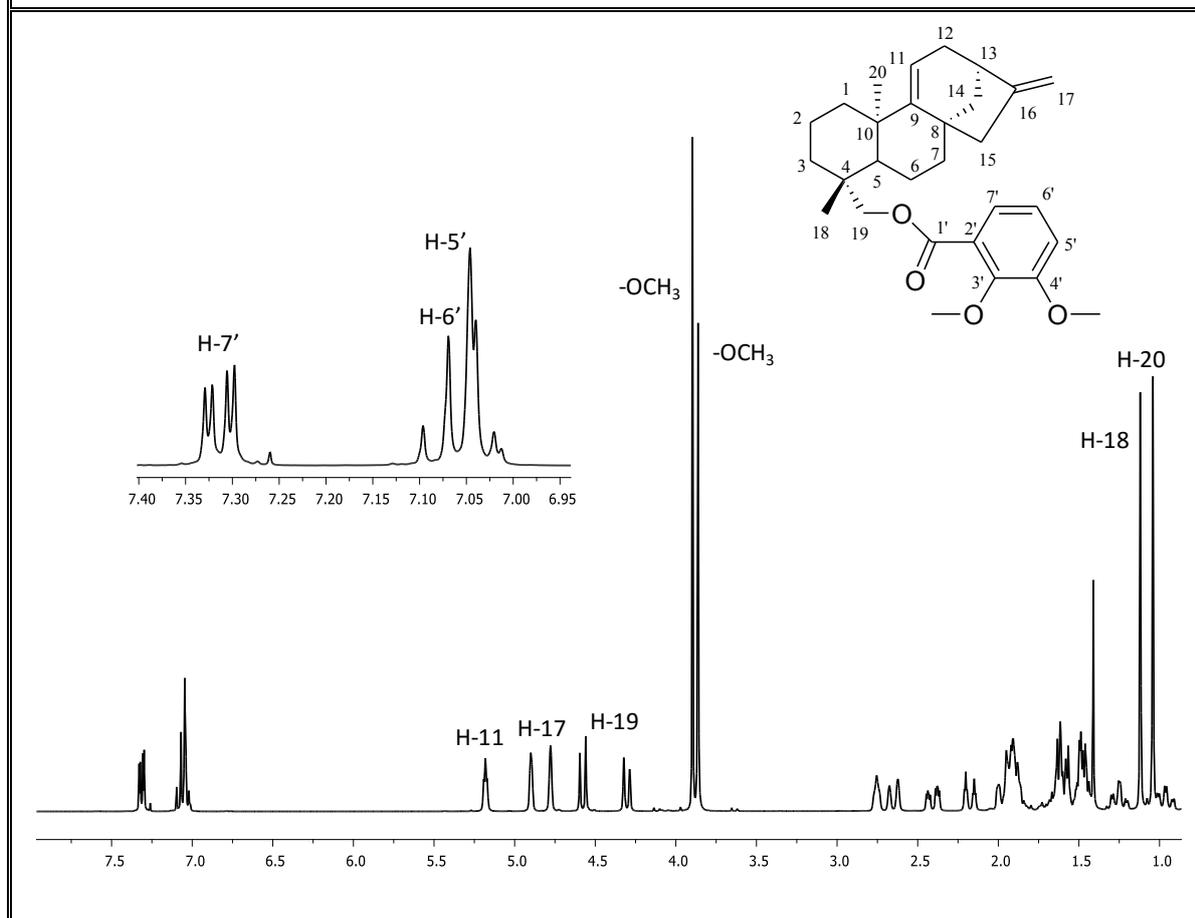


Tabla 16. Bandas de absorción en el espectro IR del 9(11),16-dieno-19-(2,3-dimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [VI]

ν máx (cm ⁻¹)	3034	2935	2869	1727	1480	1058-1263
Asignación	-C=CH	-CH	-CH	-O-C=O	>C=C<	-C-O

2. En su espectro de RMN-¹H (Fig. 45, Tabla 17) resalta principalmente el desplazamiento a campos bajos de los dobletes correspondientes a los protones H-19 del compuesto [II] (δ : 3,85 ppm H-19a y δ : 3,59 ppm H-19b d J : 10,9 Hz) de la señal asignada a los hidrógenos del oximetileno H-19 en [VI] (δ _H: 4,58 ppm H-19a y $\Delta\delta$: 4,30 ppm H-19b d J : 11 Hz), debido al efecto desapantallante del carbonilo del éster, se verifica la presencia de un anillo aromático 1,2,3-trisustituido por las señales a $\Delta\delta$: 7,09-6,99 ppm H-5', 1H, *m*; $\Delta\delta$: 7,09-6,99 ppm H-6', 1H, *m* y $\Delta\delta$: 7,33 ppm H-7', 1H, *dd*. Adicionalmente se observa la presencia de dos grupos metoxi (-OCH₃) ubicados en las posiciones 3' ($\Delta\delta$: 3,91 ppm) y 4' ($\Delta\delta$: 3,85 ppm) en el anillo aromático.

Figura 45. Espectro de RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(2,3-dimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [VI]



3. En el espectro de RMN-¹³C (Fig. 46, Tabla 17) se observa la presencia de 29 carbonos los cuales pudieron ser discriminados según su orientación en el DEPT-135. La señal que aparece a δ_c : 166,5 ppm revela la presencia del carbono carbonílico del grupo éster identificado como C-1', también se puede apreciar el desplazamiento a campo más bajo de la señal del C-19 asignada en el compuesto [II] a δ_c : 64,64 ppm mientras que en el compuesto [VI] se encuentra a δ_c : 67,18 ppm. Asimismo observamos las señales de los carbonos del anillo bencénico 1,2,3 disustituido como son δ_c : 126,7 ppm (C-2'), 153,5 ppm (C-3'), 149,2 ppm (C-4'), 122,3 ppm (C-5'), 115,7 ppm (C-6') y 123,7 ppm (C-7'), adicionalmente se confirma la presencia de los grupos metoxi (-OCH₃) a 61,58 (C-3') ppm y 56,16 ppm (C-4').

Figura 46. Espectro de RMN-¹³C (CDCl₃, 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(2,3-dimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [VI]

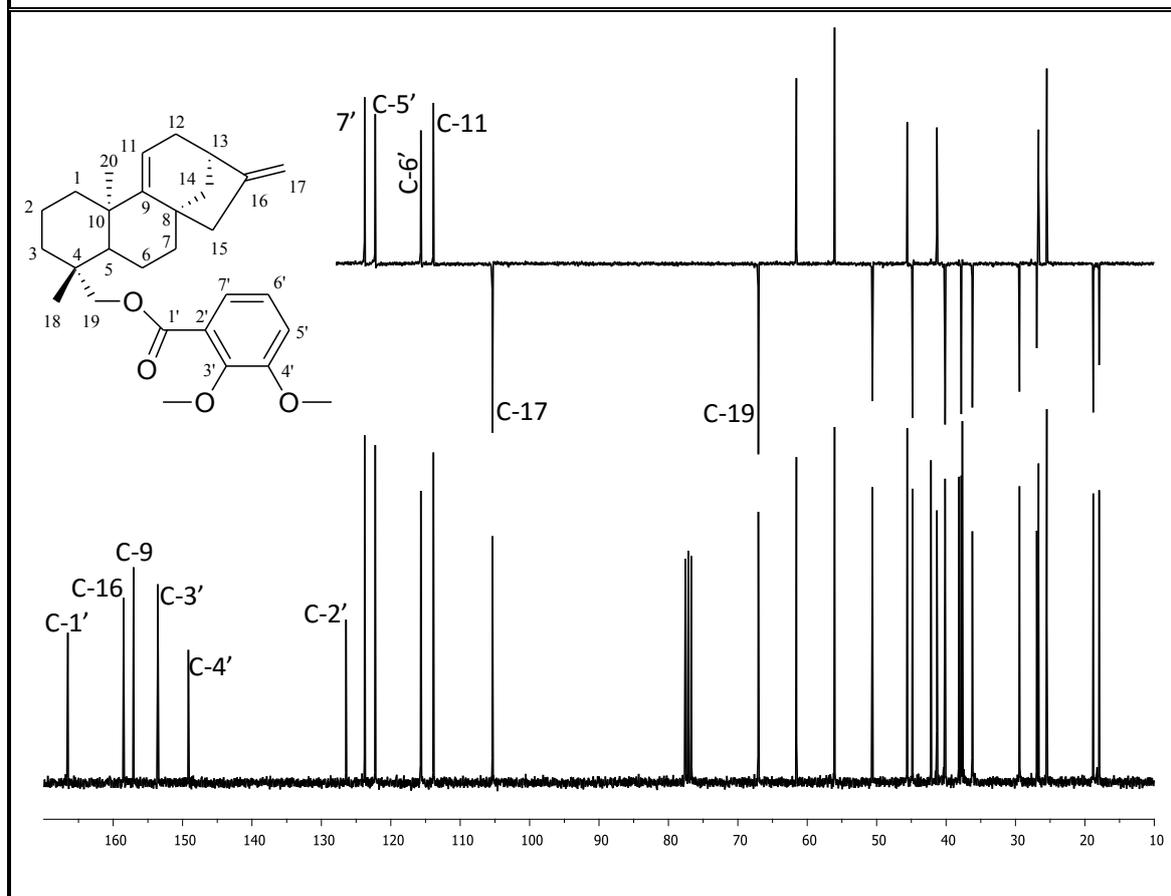


Tabla 17. Desplazamientos Químicos (δ) en los Espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C (CDCl₃, 300 MHz y 75 MHz), del fragmento que corresponde al 2,3-dimetoxibenzoato del éster [VI]

H	H-5'	H-6'	H-7'	-OCH ₃ (C-3')	-OCH ₃ (C-4')		
δ_H (ppm)	7,09-6,99	7,09-6,99	7,33	3,91	3,85		
M	<i>m</i>	<i>m</i>	<i>dd</i>	<i>s</i>	<i>s</i>		
<i>J</i> (Hz)	-	-	7,1 y 2,4	-	-		
C	C-1'	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'	C-6'	C-7'
δ_C (ppm)	166,5	126,4	153,5	149,2	122,3	115,7	123,7
Tipo	-O-C=O	=C<	=C-O	=C-O	=CH	=CH	=CH

4. En el espectro de HMBC (Fig. 48) se verifica la naturaleza del éster, mediante la secuencia de correlaciones $H-19 \leftrightarrow C-1'$, es evidente que la ubicación del éster quedo establecida de manera inequívoca en C-19, a raíz de la observación en el espectro HMBC de un cruce entre la señal asignada a los hidrógenos H-19 y el pico atribuido al carbonilo del éster (C-1').

Al tomar en cuenta los grados de insaturación que exige la fórmula molecular, el número y la naturaleza de los protones que conforman la molécula y los grupos funcionales presentes en la misma, queda claro que el producto de la reacción es el derivado 9(11),16-dieno-19-(2,3-dimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [VI], es importante resaltar que este derivado del *ent*-kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II], es nuevo y es el primer reporte que se tiene al respecto.

Figura 47. Correlación del espectro HMBC ($CDCl_3$, 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(2,3-dimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [VI]

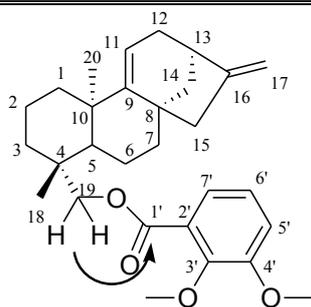
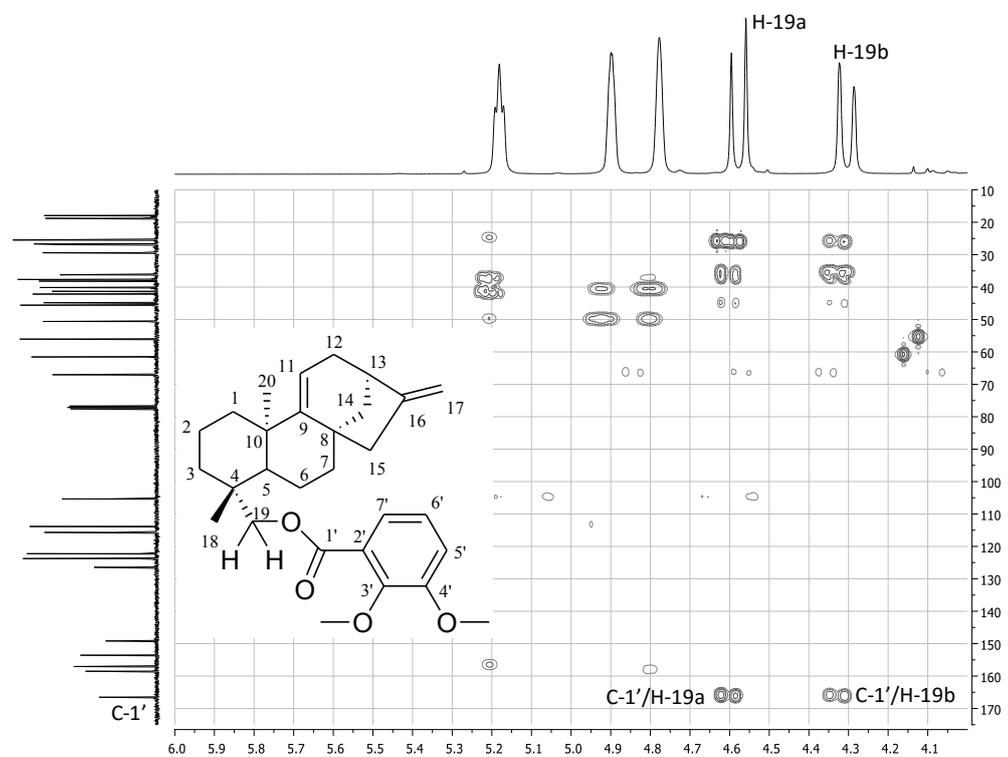
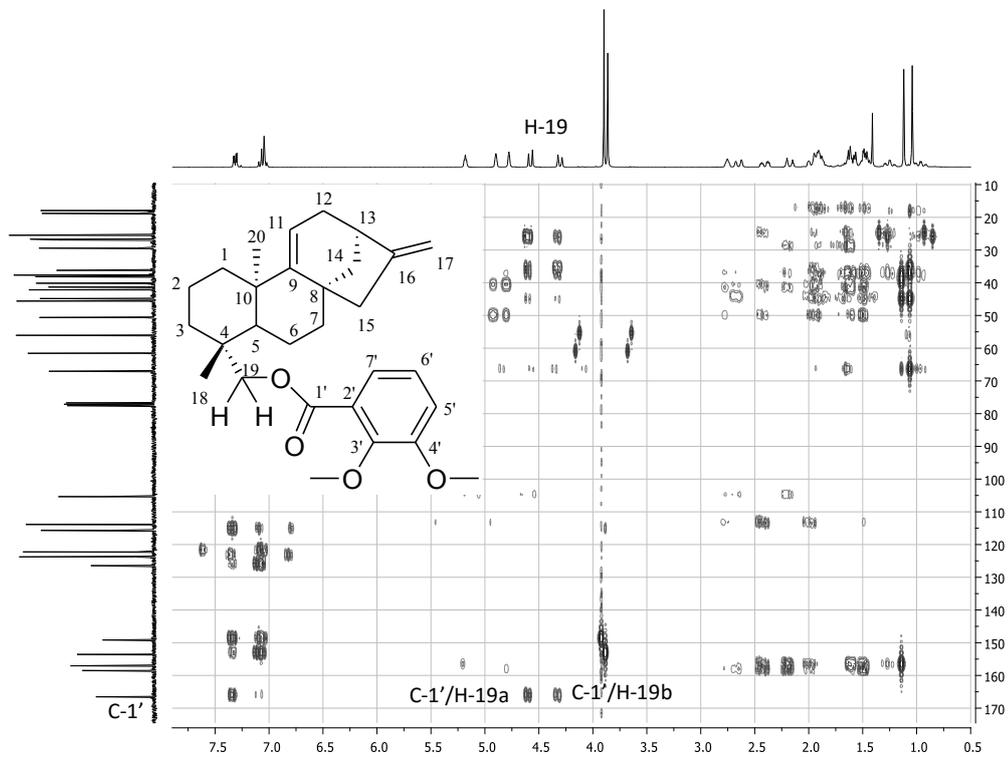
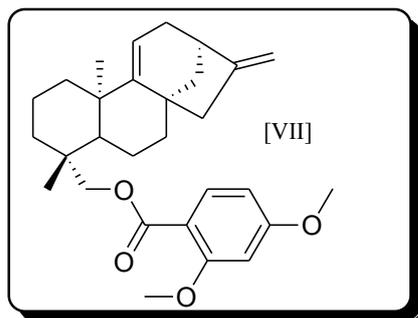


Figura 48. Espectro de HMBC (CDCl₃, 75 MHz) del
9(11),16-dieno-19-(2,3-dimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [VI]



VII.3.5 9(11),16-dieno-19-(2,4-dimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [VII]



$C_{29}H_{38}O_4$

PM= 450 g/mol

Aspecto: oleoso incoloro

Rendimiento= 142 mg (90%)

El compuesto [II] denominado *ent*-kaur-9(11),16-dieno-19-ol se utilizó como material de partida para la realización de la reacción de esterificación con el ácido 2,4-dimetoxibenzoico en presencia de EDCI y DMAP a temperatura ambiente (procedimiento VI.2.2). Posteriormente después del proceso de extracción se observó la aparición de un sólido oleoso e incoloro (340 mg), que fue purificado por cromatografía de columna con silica gel (ciclohexano), eluida con los solventes ciclohexano/AcOEt (90:10) para obtener el compuesto [VII], que se presentó como un sólido oleoso incoloro con un peso de 142 mg y un porcentaje de rendimiento igual a 90 %. Considerando el origen del compuesto (bajo las condiciones de reacción descritas en el procedimiento general VI.2.2), y el análisis de los datos derivados de sus espectros de IR (Fig. 49, Tabla 18), RMN-¹H (Fig. 50; Tabla 19), RMN-¹³C (Fig. 51; Tabla 19) nos permitió confirmar que la sustancia se trataba del diterpeno denominado 9(11),16-dieno-19-(2,4-dimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [VII], cuyo esqueleto fue caracterizado comparando sus datos espectrales con los del compuesto de partida [II] de la siguiente manera:

1. En su espectro de IR (Fig. 49, Tabla 18) se hace referencia principalmente a la desaparición de la vibración de tensión OH del compuesto de partida [II], seguidamente se observan las bandas de absorción correspondientes a la vibración de tensión del enlace =C-H a 3034 cm^{-1} de los anillos aromáticos, además de mostrar las bandas de absorción atribuibles a las vibraciones de tensión simétricas y asimétricas del enlace C-H *sp*³ a 2869 cm^{-1} . También resalta una banda intensa indicando la presencia del grupo carbonilo de la función éster a 1720 cm^{-1} la cual se corrobora con la correspondiente vibración de tensión del enlace C-O-C a 1138 cm^{-1} . Las bandas de absorción que permitieron complementar la información acerca de la presencia de un anillo aromático son

las bandas de combinación presentes entre 2000 cm^{-1} y 1600 cm^{-1} que a pesar de no visualizarse con claridad en el espectro la existencia de vibraciones de flexión $-\text{C}=\text{CH}$ fuera del plano específicamente en 810 cm^{-1} y 730 cm^{-1} ratifican que se trata de un anillo bencénico 1,2,4 trisustituido.

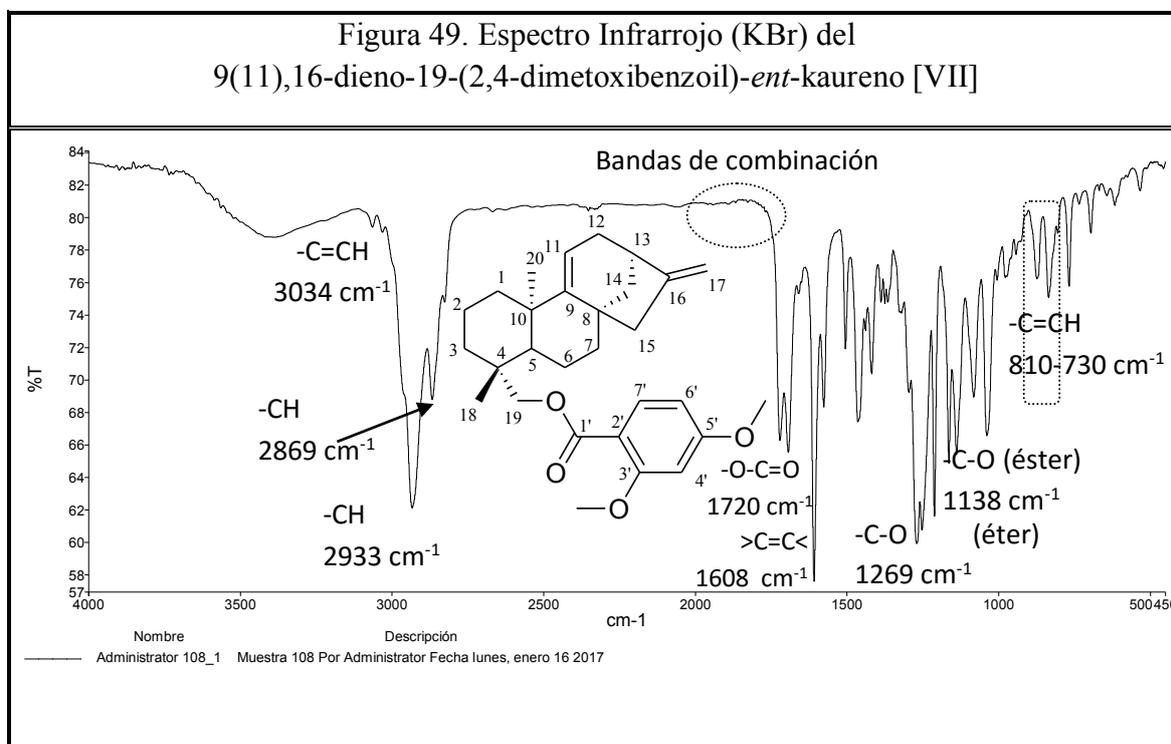
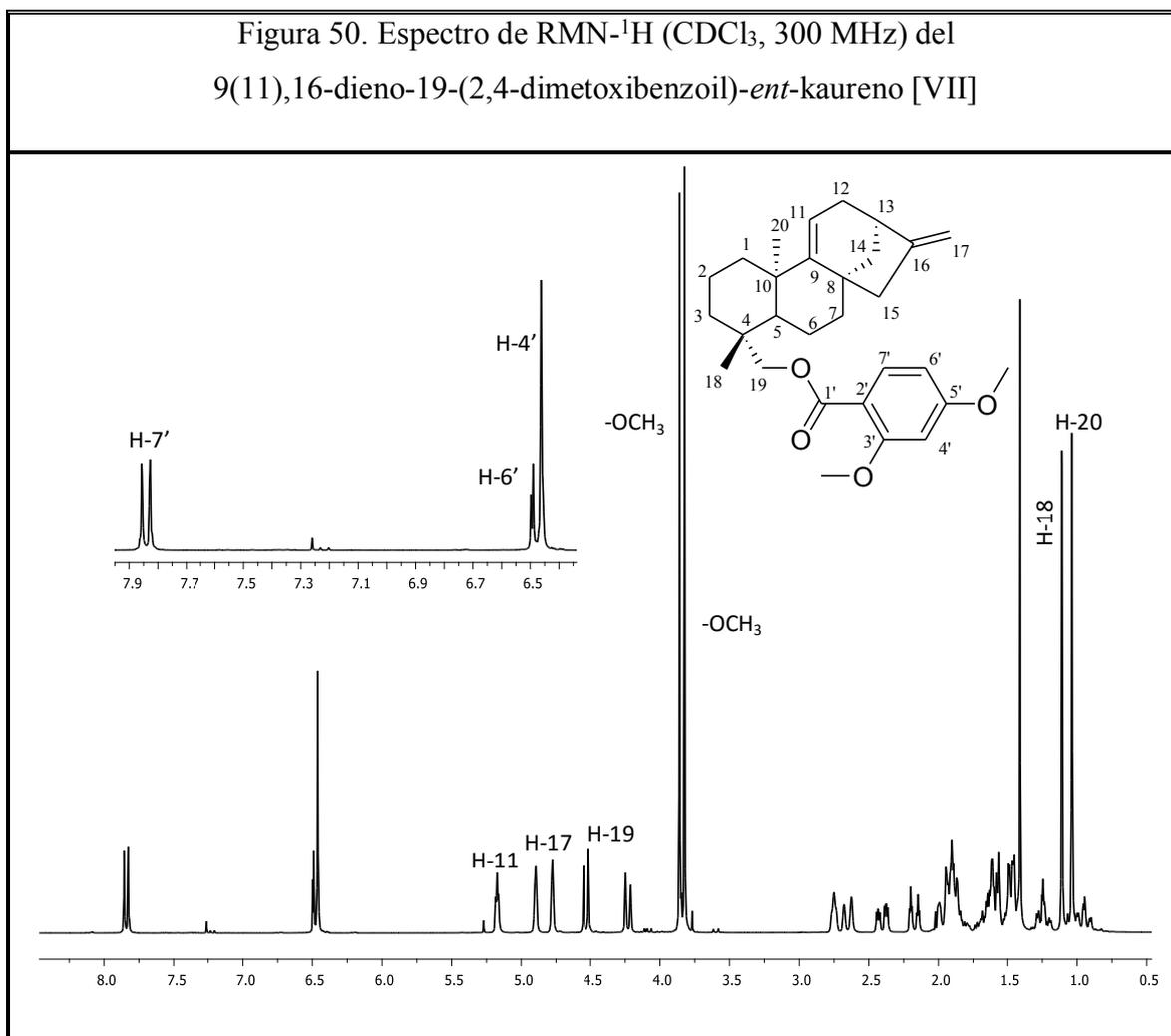


Tabla 18. Bandas de absorción en el espectro IR del
9(11),16-dieno-19-(2,4-dimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [VII]

ν máx (cm^{-1})	3034	2933	2869	1720	1608	1269-1138
Asignación	$-\text{C}=\text{CH}$	$-\text{CH}$	$-\text{CH}$	$-\text{O}-\text{C}=\text{O}$	$>\text{C}=\text{C}<$	$-\text{C}-\text{O}$

2. En su espectro de RMN- H^1 (Fig. 50, Tabla 19) distinguen principalmente la aparición de las señales típicas de los protones de un anillo aromático 1,2,4-trisustituido que integran para 3H, dichos protones se encuentran asignados en la estructura del compuesto [VII] en las posiciones 4', 6', 7' y su rango de desplazamiento corresponde a δ_{H} : 6,46 ppm (H-4', 1H, s); δ_{H} : 6,49 ppm (H-6', 1H, d, J: 2,6 Hz); δ_{H} : 7,84 ppm (H-7', 1H, d, J: 9,5 Hz), también se observan variaciones considerables en la posición de las señales atribuidas a H-19 (δ_{H} :

3,85 ppm H-19a y δ_H : 3,59 ppm H-19b, *d*, *J*: 10,9 Hz) [II] vs [VII] [δ_H : 4,54 ppm H-19a y δ_H : 4,24 ppm H-19b, *d*, *J*: 11 Hz). Así mismo los grupos metoxi (-OCH₃) presentes en las posiciones 3' y 5' en el anillo aromático se confirma por las señales presentes a δ_H : 3,82 ppm, 3H, *s* (-OCH₃ en C-3') y δ_H : 3,87 ppm, 3H, *s*, (-OCH₃ en C-5').



3. En el espectro de RMN-¹³C (Fig. 51, Tabla 19) se observa la presencia de veintinueve carbonos, los cuales pudieron ser discriminados según su orientación en el experimento DEPT-135, principalmente se puede apreciar la aparición de las señales correspondientes al anillo aromático a δ_c : 112,6 (C-2'); δ_c : 164,3 (C-3'); δ_c : 99,0 (C-4'); δ_c : 161,3 (CH, C-5'); δ_c : 104,6 (CH, C-6'). y δ_c : 133,7 (CH, C-7'), además existe una variación importante en la posición del pico asignado al C-19 en el compuesto [VII] que aparece a δ_c : 66,37 ppm y

anteriormente en el compuesto de partida [II] se encontraba a δ_c : 64,64 ppm, finalmente la detección en el espectro de RMN- ^{13}C de un pico a δ_c : 165,9 ppm atribuible a un carbono carbonílico propio de ésteres garantiza la formación del producto de reacción. El resto de los carbonos según el DEPT-135 pertenecen a las señales correspondientes a la molécula de partida, excepto los carbonos asignados a los grupos metoxi (-OCH₃) ubicados en las posiciones 3' y 5' del anillo bencénico los cuales aparecen a δ_c : 55,86 ppm y δ_c : 55,46 ppm respectivamente.

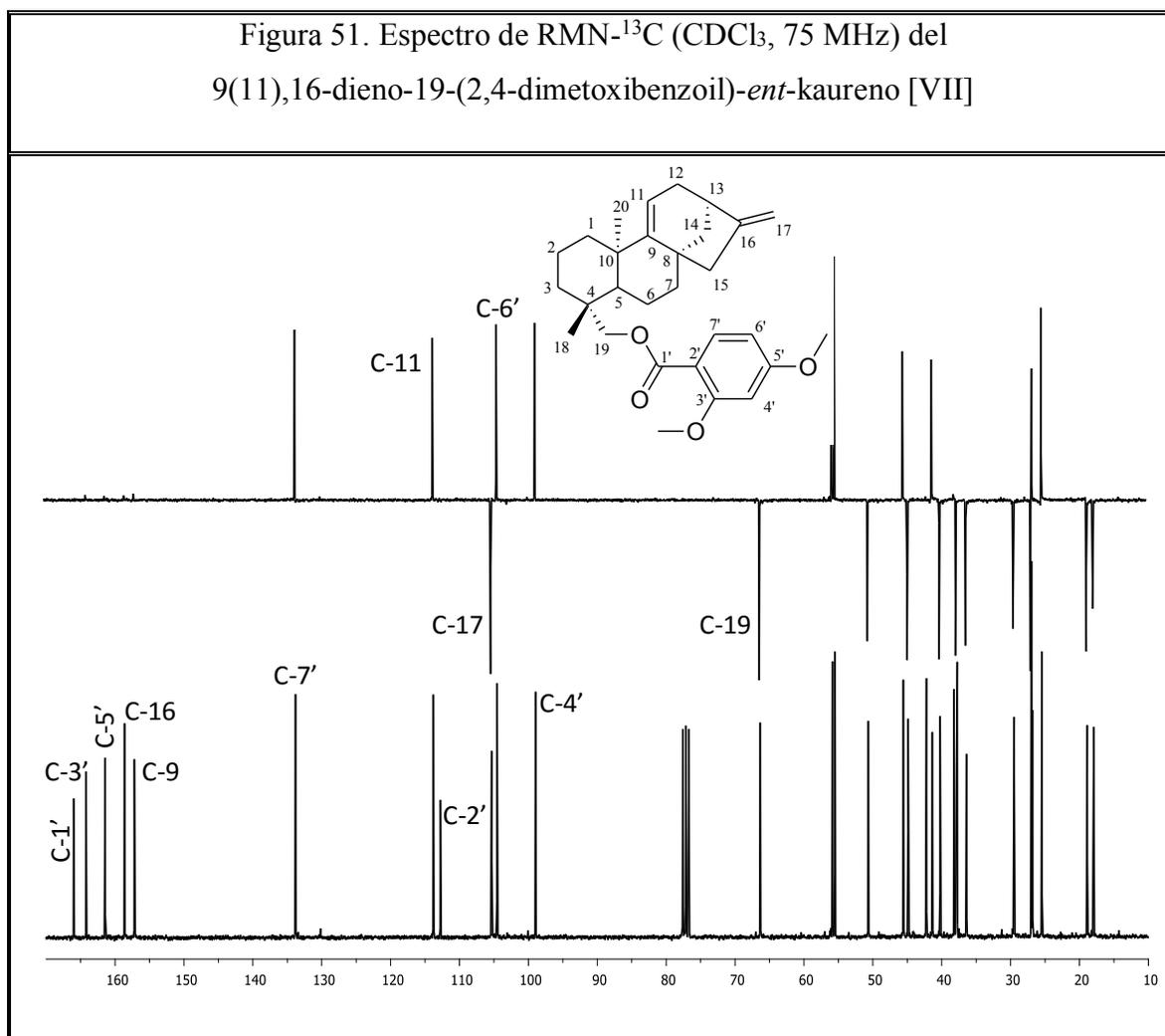


Tabla 19. Desplazamientos Químicos (δ) en los Espectros de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 300 MHz y 75 MHz), del fragmento que corresponde al 2,4-dimetoxibenzoato del éster [VII]

H	H-4'	H-6'	H-7'	-OCH ₃ (C-3')	-OCH ₃ (C-5')
δ_{H} (ppm)	6,46	6,49	7,84	3,82	3,87
M	<i>s</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>s</i>	<i>s</i>
<i>J</i> (Hz)	-	2,6	9,5	-	-

C	C-1'	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'	C-6'	C-7'
δ_{C} (ppm)	165,9	112,6	164,3	99,0	161,3	104,6	133,9
Tipo	-O-C=O	=C<	=C-O	=CH	=C-O	=CH	=CH

4. El espectro de HMBC (Fig. 53) confirma la naturaleza del éster, mediante la secuencia de correlaciones $\text{H-19} \leftrightarrow \text{C-1}'$, es evidente que la ubicación del éster quedo establecida de manera inequívoca en C-19, a raíz de la observación en el espectro HMBC de un cruce entre la señal asignada a los hidrógenos H-19 y el pico atribuido al carbonilo del éster (C-1').

Con base a lo anteriormente descrito, queda claro que el producto de la reacción es el derivado 9(11),16-dieno-19-(2,4-dimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [VII], es importante resaltar que este derivado del *ent*-kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II], es nuevo y es el primer reporte que se tiene al respecto.

Figura 52. Correlación del espectro HMBC (CDCl_3 , 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(2,4-dimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [VII]

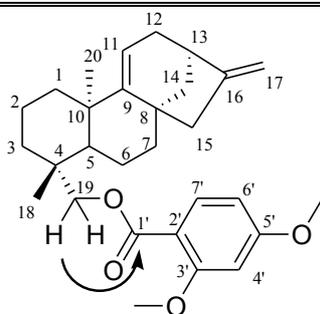
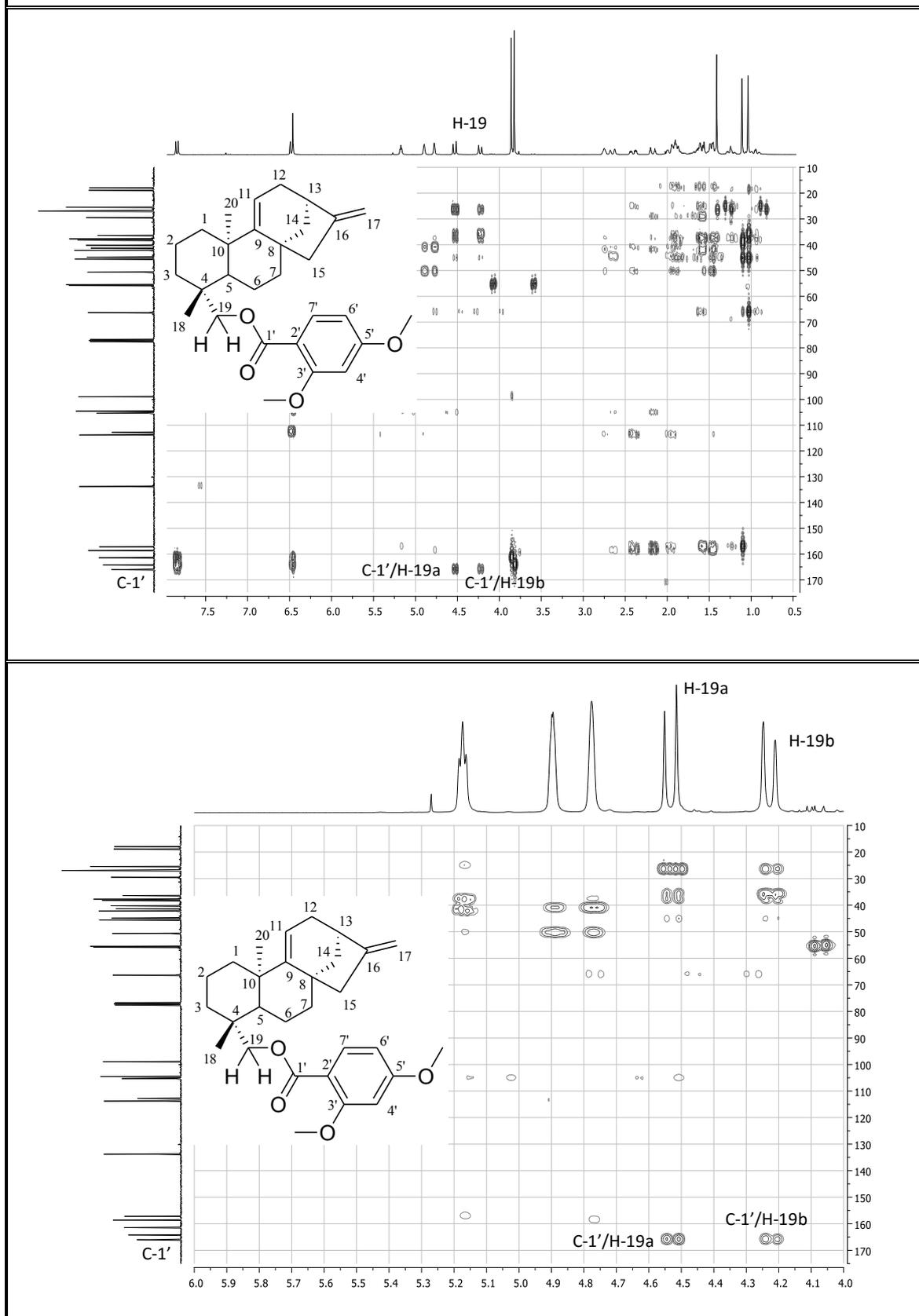
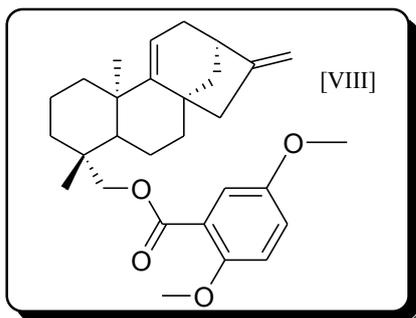


Figura 53. Espectro de HMBC (CDCl₃, 75 MHz) del
9(11),16-dieno-19-(2,4-dimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [VII]



VII.3.6 9(11),16-dieno-19-(2,5-dimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [VIII]



$C_{29}H_{38}O_4$

PM= 450 g/mol

Aspecto: oleoso incoloro

Rendimiento= 108 mg (69%)

El ácido 2,5-dimetoxibenzoico, el EDCI y DMAP fueron suspendidos en CH_2Cl_2 bajo atmósfera de argón. Posteriormente, se adicionó el derivado *ent*-kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II] previamente disuelto en el mismo solvente y bajo las condiciones descritas en el apartado VI.2.2, la suspensión resultante se agitó por 12 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se logró obtener un residuo oleoso amarillo con un peso de 316 mg que fue purificado por cromatografía de columna con sílica gel (ciclohexano), eluida con ciclohexano/AcOEt (90:10) para así obtener el compuesto VIII puro, que se presentó como un sólido oleoso incoloro con un peso de 108 mg y un porcentaje de rendimiento de 69 %.

Los datos espectrales de este producto indican que se trata de otro diterpeno estructuralmente relacionado con el *ent*-kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II]. Su fórmula molecular, $C_{29}H_{38}O_4$, fue deducida a través de su espectro de RMN- 1H (Fig. 55; Tabla 21), RMN- ^{13}C (Fig. 56; Tabla 21) indicando que se trata de un compuesto con cinco grados de insaturación más que el compuesto de partida [II]. En consecuencia, si se asume que la reacción de esterificación fue efectiva, es obvio que el compuesto VIII posee un doble enlace correspondiente al carbonilo del éster en vez del grupo alcohol, dicho compuesto fue caracterizado de la siguiente manera:

1. En el espectro IR (Fig. 54; Tabla 20) resalta una banda intensa típica del grupo carbonilo de la función éster a 1726 cm^{-1} la cual se corrobora con la correspondiente vibración de tensión del enlace C-O a 1047 cm^{-1} , además la desaparición de la banda ancha del enlace OH del compuesto de partida [II] ratifica lo expuesto anteriormente. La existencia de un doble enlace de naturaleza exometilénica quedó confirmada por la vibración de estiramiento $>C=CH_2$ que

aparece a 2933 cm^{-1} , la cual se diferencia notablemente de las bandas de absorción correspondientes a la vibración de tensión del enlace $=\text{C}-\text{H}$ a 3030 cm^{-1} de los anillos aromáticos. Las bandas de absorción que permitieron complementar la información acerca de la presencia de un anillo aromático fueron las correspondientes a las vibraciones $\text{C}=\text{C}$ ubicadas a 1600 cm^{-1} y 1500 cm^{-1} , debido a que el espectro de IR no aportó más información sobre el hecho de que el núcleo bencénico se encuentra 1,2,5-trisustituido nos apoyamos en las señales presentes en el espectro de RMN- ^1H para confirmarlo como se describe más adelante.

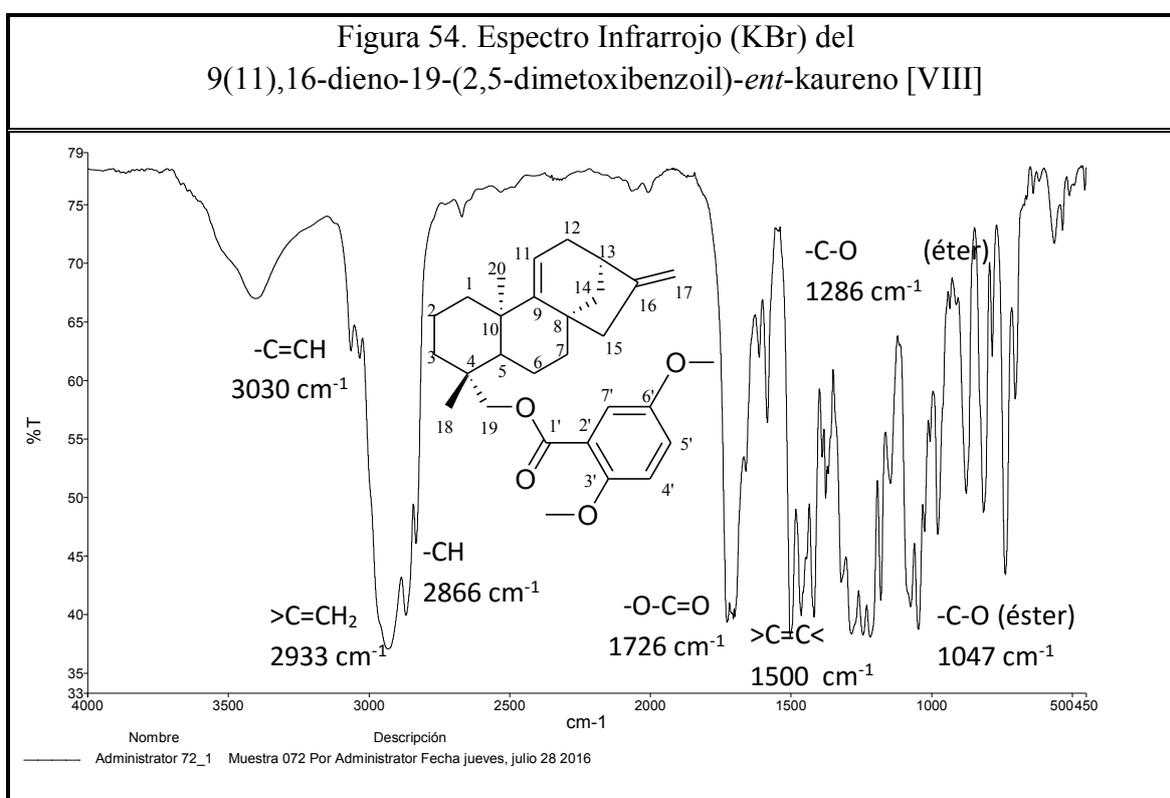
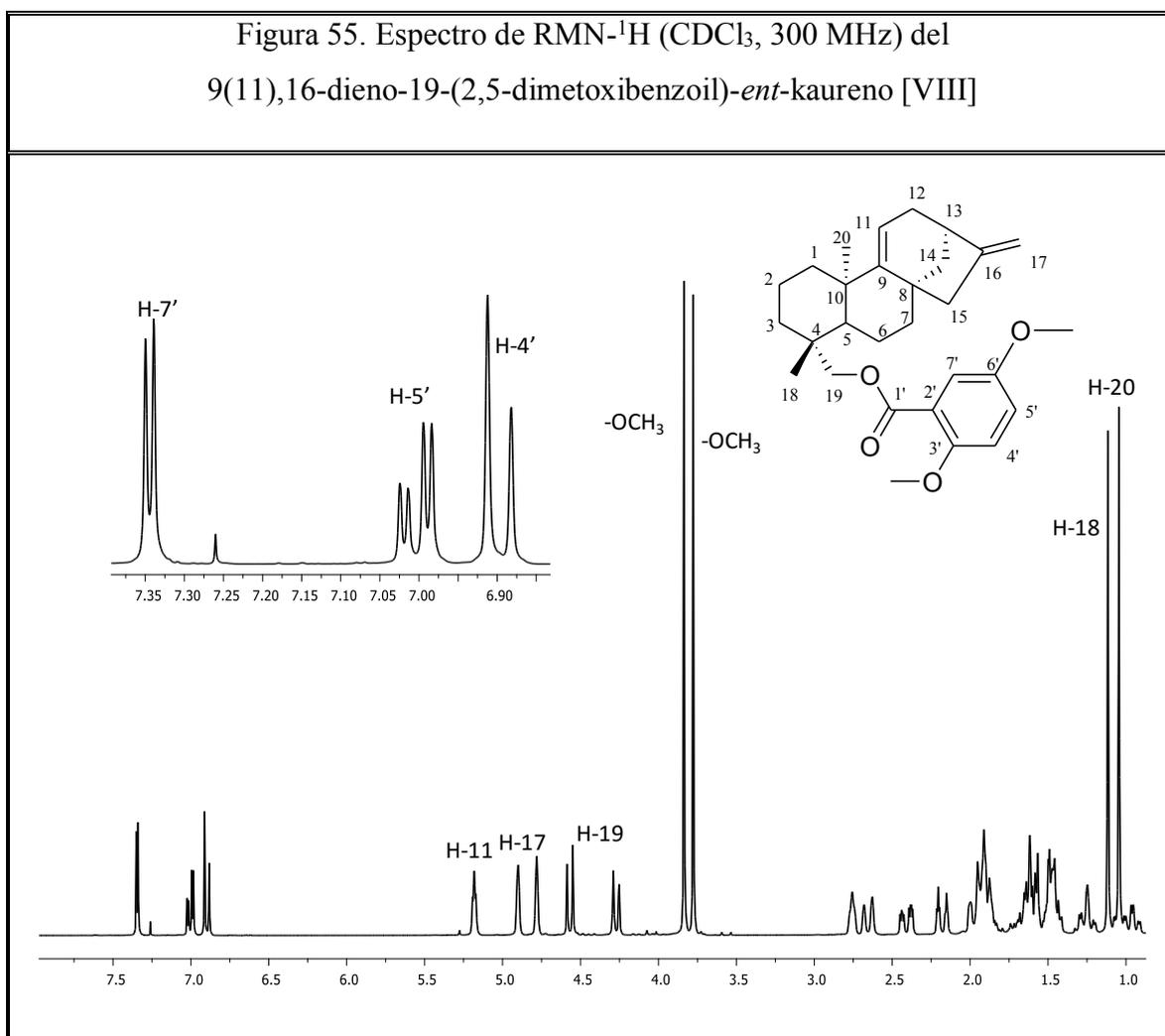


Tabla 20. Bandas de absorción en el espectro IR del
9(11),16-dieno-19-(2,5-dimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [VIII]

ν máx (cm^{-1})	3030	2933	2866	1726	1600-1500	1047-1286
Asignación	$-\text{C}=\text{CH}$	$>\text{C}=\text{CH}_2$	$-\text{CH}$	$-\text{O}-\text{C}=\text{O}$	$>\text{C}=\text{C}<$	$-\text{C}-\text{O}$

2. Al asumir un esqueleto *ent*-kaureno y comprobar en el RMN-¹H (Fig. 55, Tabla 21) variaciones considerables en la posición de las señales atribuidas a H-19 (δ_{H} : 3,85 ppm H-19a y δ_{H} : 3,59 ppm H-19b *d J*: 10,9 Hz) en el compuesto de partida [II] vs el producto [VIII] [δ_{H} : 4,55 ppm H-19a y δ_{H} : 4,27 ppm H-19b *d J*: 9,5 Hz), es lógico suponer que los protones que aparecen a δ_{H} : 5,19 ppm y 4,90-4,78 ppm corresponden a los dobles enlaces ubicados en H-16 y H-17 respectivamente. La presencia del núcleo bencénico se corrobora con las señales típicas de un anillo aromático 1,2,5-trisustituido observadas a δ_{H} : 6,90 ppm H-4', 1H, *d, J*: 9,1 Hz; δ_{H} : 7,0 ppm H-5', 1H, *dd, J*: 9,0-3,2 Hz; y δ_{H} : 7,34 ppm H-7', 1H, *d, J*: 3,2 Hz, además es evidente la existencia de grupos metoxi (-OCH₃) en las posiciones 3' (δ_{H} : 3,84 ppm, 3H, *s*) y 4' (δ_{H} : 3,78 ppm, 3H, *s*) .



3. En el espectro de RMN-¹³C (Fig. 56, Tabla 21) se observa la presencia de veintinueve carbonos, los cuales pudieron ser discriminados según su orientación en el experimento DEPT-135, principalmente se puede apreciar la aparición de las señales correspondientes al anillo aromático a δ_c : 120,5 (C-2'); δ_c : 153,1 (C-3'); δ_c : 113,5 (C-4'); δ_c : 118,7 (CH, C-5'); δ_c : 152,5 (CH, C-6'). y δ_c : 115,8 (CH, C-7'), además existe una variación importante en la posición del pico asignado al C-19 en el compuesto [VIII] que aparece a δ_c : 66,61 ppm y anteriormente en el compuesto de partida [II] se encontraba a δ_c : 64,64 ppm, finalmente la detección en el espectro de RMN-¹³C de un pico a δ_c : 166,1 ppm atribuible a un carbono carbonílico propio de ésteres garantiza la formación del producto de reacción. También se observan los carbonos asignados a los grupos metoxi (-OCH₃) ubicados en las posiciones 3' y 6' del anillo bencénico los cuales aparecen a δ_c : 55,98 ppm y δ_c : 55,40 ppm respectivamente.

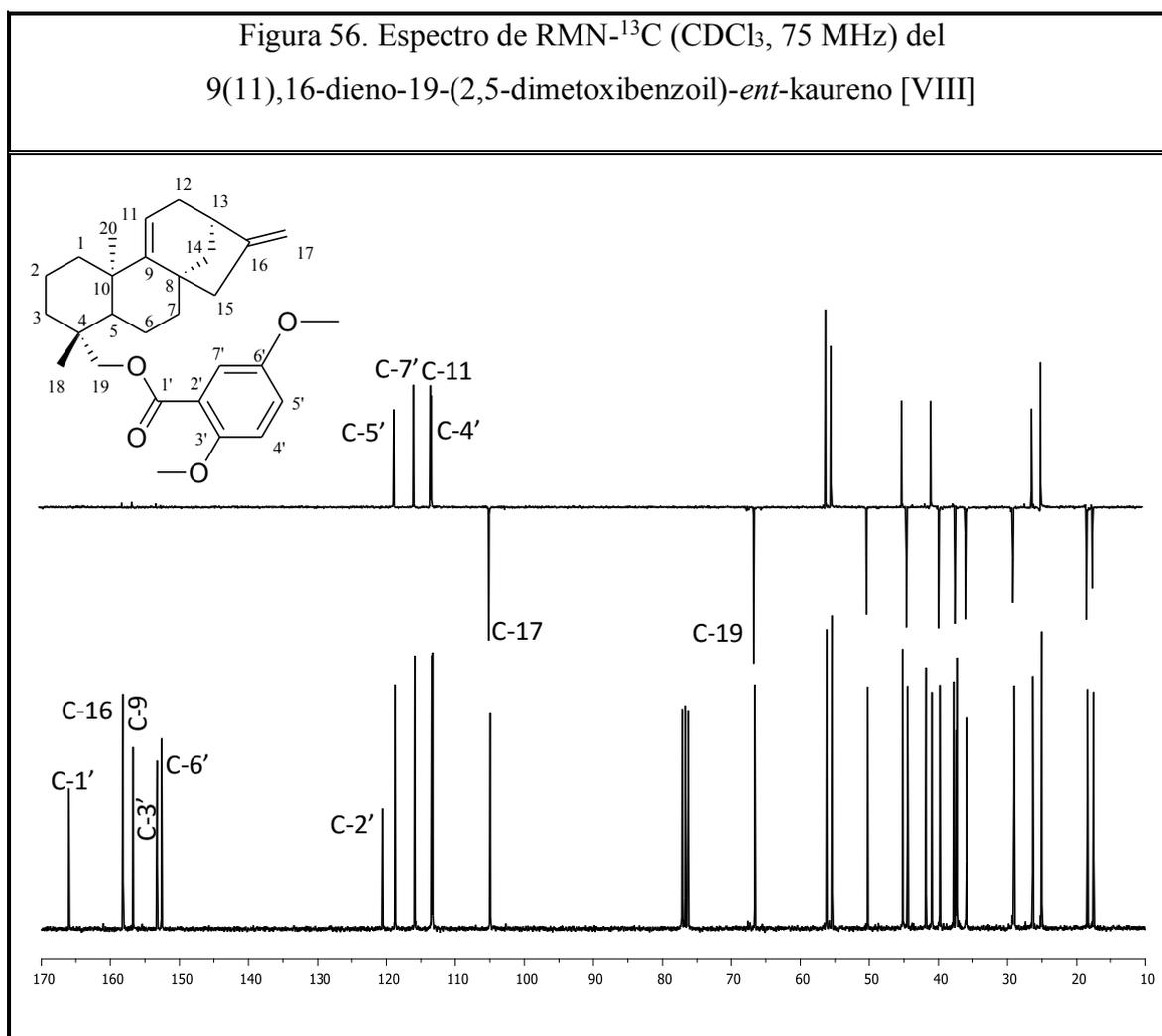


Tabla 21. Desplazamientos Químicos (δ) en los Espectros de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 300 MHz y 75 MHz), del fragmento que corresponde al 2,5-dimetoxibenzoato del éster [VIII]

H	H-4'	H-5'	H-7'	-OCH ₃ (C-3')	-OCH ₃ (C-6')
δ_{H} (ppm)	6,90	7,0	7,34	3,84	3,78
M	<i>d</i>	<i>dd</i>	<i>d</i>	<i>s</i>	<i>s</i>
<i>J</i> (Hz)	9,1	9,0 y 3,2	3,2	-	-

C	C-1'	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'	C-6'	C-7'
δ_{C} (ppm)	166,1	120,5	153,1	113,5	118,7	152,5	115,8
Tipo	-O-C=O	=C<	=C-O	=CH	=CH	=C-O	=CH

4. La estructura del compuesto [VIII] quedó definitivamente establecida al ubicar, a través del HMBC (Fig. 58) la naturaleza del éster, mediante la secuencia de correlaciones $\text{H-19} \leftrightarrow \text{C-1}'$, es evidente que la ubicación del éster quedó establecida de manera inequívoca en C-19, a raíz de la observación en el espectro HMBC de un cruce entre la señal asignada a los hidrógenos H-19 y el pico atribuido al carbonilo del éster (C-1').

Al tomar en cuenta los grados de insaturación que exige la fórmula molecular, el número y la naturaleza de los protones que conforman la molécula y los grupos funcionales presentes en la misma, queda claro que el producto de la reacción es el derivado 9(11),16-dieno-19-(2,3-dimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [VI], destacando que es primer reporte que se tiene al respecto.

Figura 57. Correlación del espectro HMBC (CDCl_3 , 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(2,5-dimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [VIII]

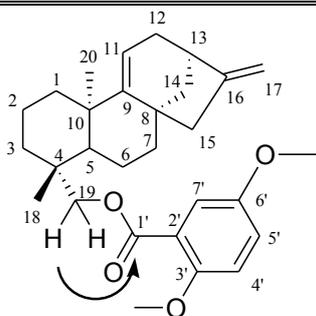
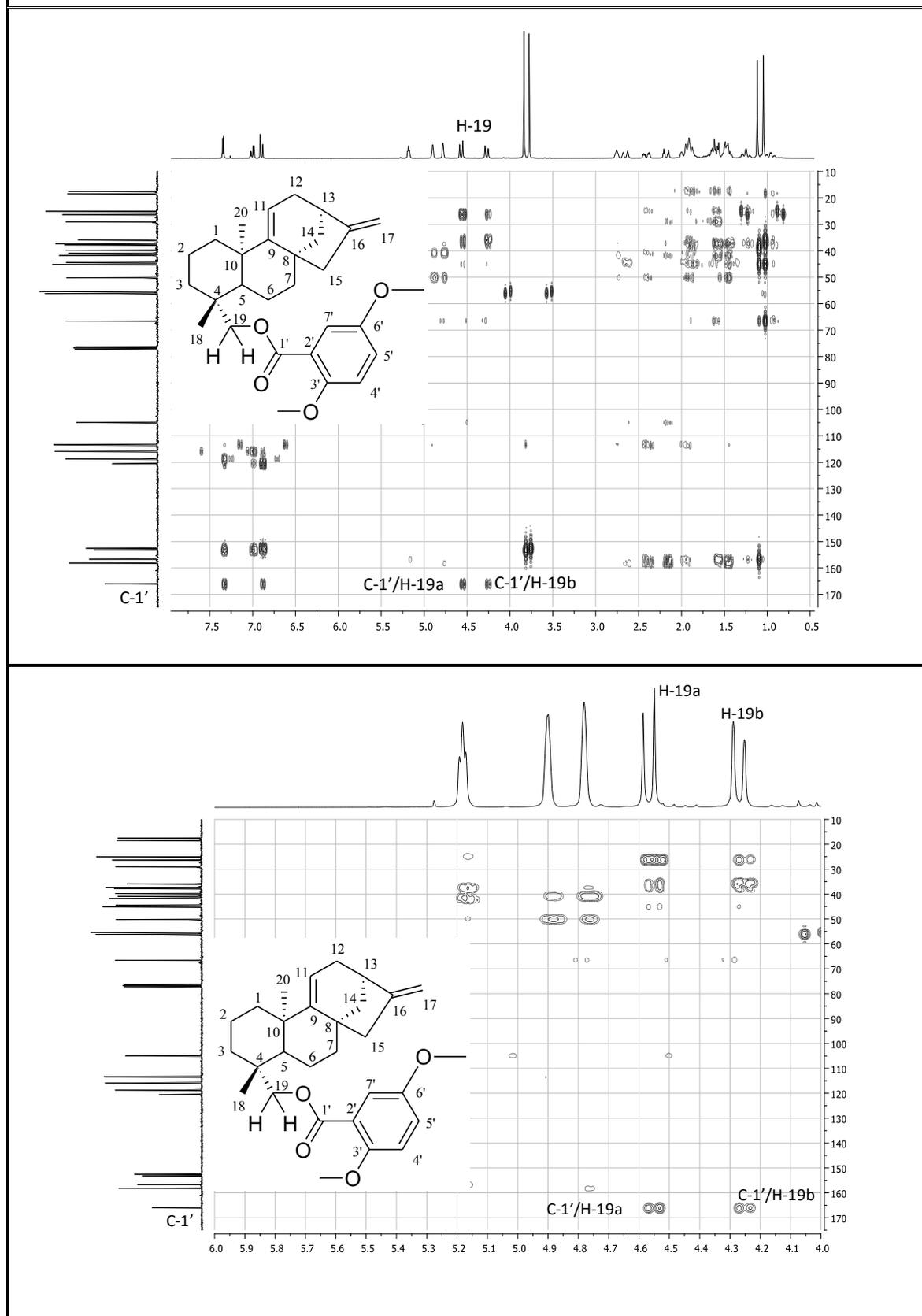
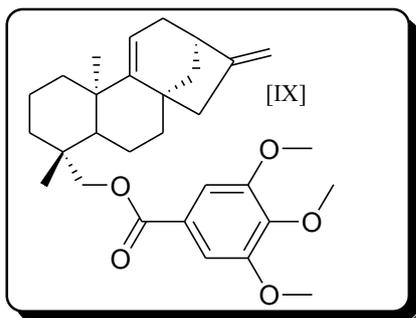


Figura 58. Espectro de HMBC (CDCl₃, 75 MHz) del
9(11),16-dieno-19-(2,5-dimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [VIII]



VII.3.7 9(11),16-dieno-19-(3,4,5-trimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [IX]



$C_{30}H_{40}O_5$

PM= 480 g/mol

Aspecto: oleoso incoloro

Redimiento= 161 mg (96 %)

El compuesto 9(11),16-dieno-19-(3,4,5-trimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [IX] de características físicas oleoso e incoloro, se obtuvo después de tratar el alcohol *ent*-kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II] con el ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico bajo las condiciones de reacción descritas en el procedimiento general VI.2.2. El resultado de esta reacción fue un residuo oleoso incoloro (478 mg) purificado por cromatografía de columna con silica gel (ciclohexano), eluida con ciclohexano/AcOEt (95:5), obteniendo 161 mg del compuesto [IX] con un rendimiento del 96 %. El análisis de su espectro de RMN- 1H (Fig. 60, Tabla 23), RMN- ^{13}C y DEPT-135 (Fig. 61, Tabla 23), resultó congruente con la fórmula molecular $C_{30}H_{40}O_5$, dicha fórmula corresponde a un compuesto de once insaturaciones, una de las cuales evidencia la presencia de un grupo carbonilo característico en los ésteres como lo muestra el espectro de IR (Fig. 59, Tabla 22), en la banda ν_{max} : 1714 cm^{-1} . Esta información se confirma al comparar sus espectros con el alcohol de partida [II], observando algunos cambios que corroboran la formación del éster aromático 1,3,4,5 tetrasustituido [IX], las cuales se describen a continuación:

1. En el espectro de IR (Fig.59, Tabla 22) se evidencia la presencia de un grupo éster al lado de un anillo aromático 1,3,4,5 tetrasustituido, dicha información se corrobora debido a una banda intensa correspondiente al grupo carbonilo (C=O) en 1714 cm^{-1} , la cual se confirma con la vibración de tensión de los enlaces -C-O a 1129 cm^{-1} , mientras que la presencia del anillo aromático se verifica por la banda débil en 3035 cm^{-1} correspondiente a la absorción de tensión C-H, que se encuentra a la izquierda de la banda típica saturada C-H (2869 cm^{-1}), además se observan las bandas de tensión -C=C- a 1589 cm^{-1} – 1500 cm^{-1} características del núcleo bencénico, debido a que el espectro de IR no aportó más información sobre el hecho de que el núcleo bencénico se encuentra 1,3,4,5-trisustituido nos

apoyamos en las señales presentes en el espectro de RMN-¹H para confirmarlo como se describe más adelante. Es importante resaltar la desaparición de la vibración de tensión OH del compuesto de partida [II], y el solapamiento de la señal del doble enlace olefinico C=C a 1660 por la presencia del grupo carbonilo.

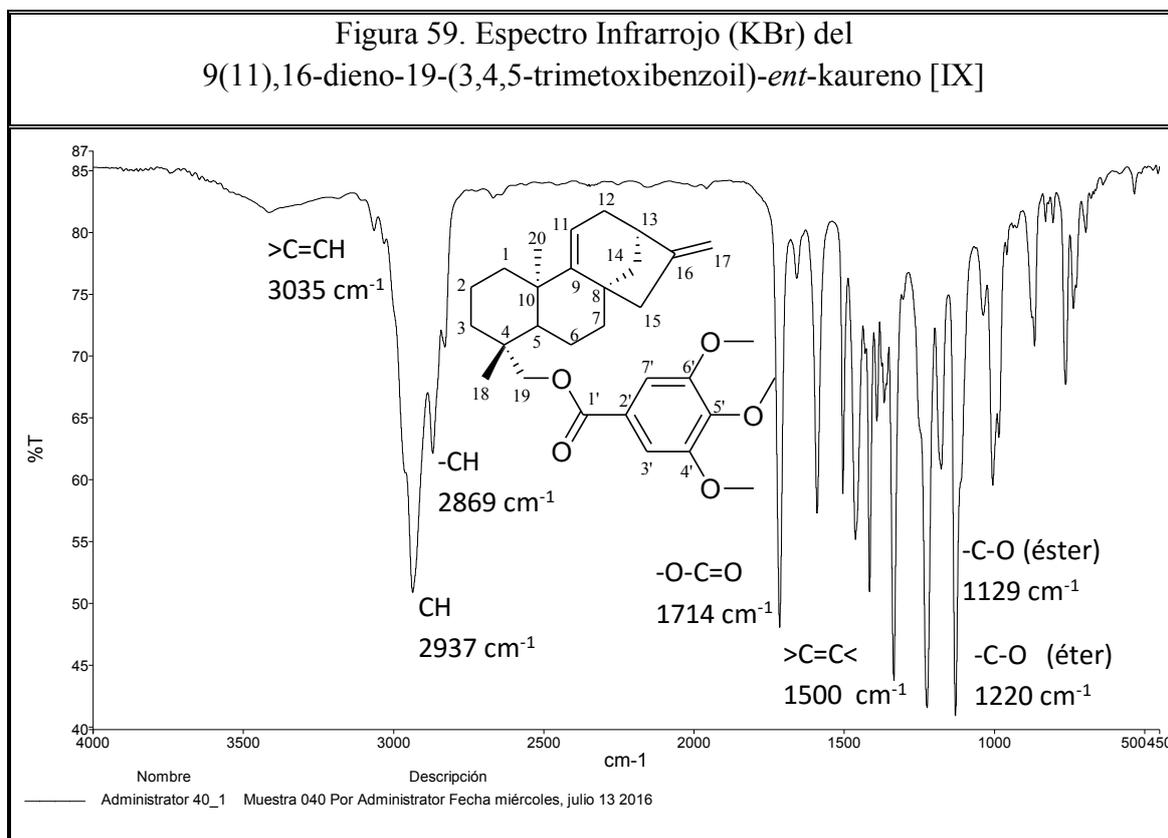
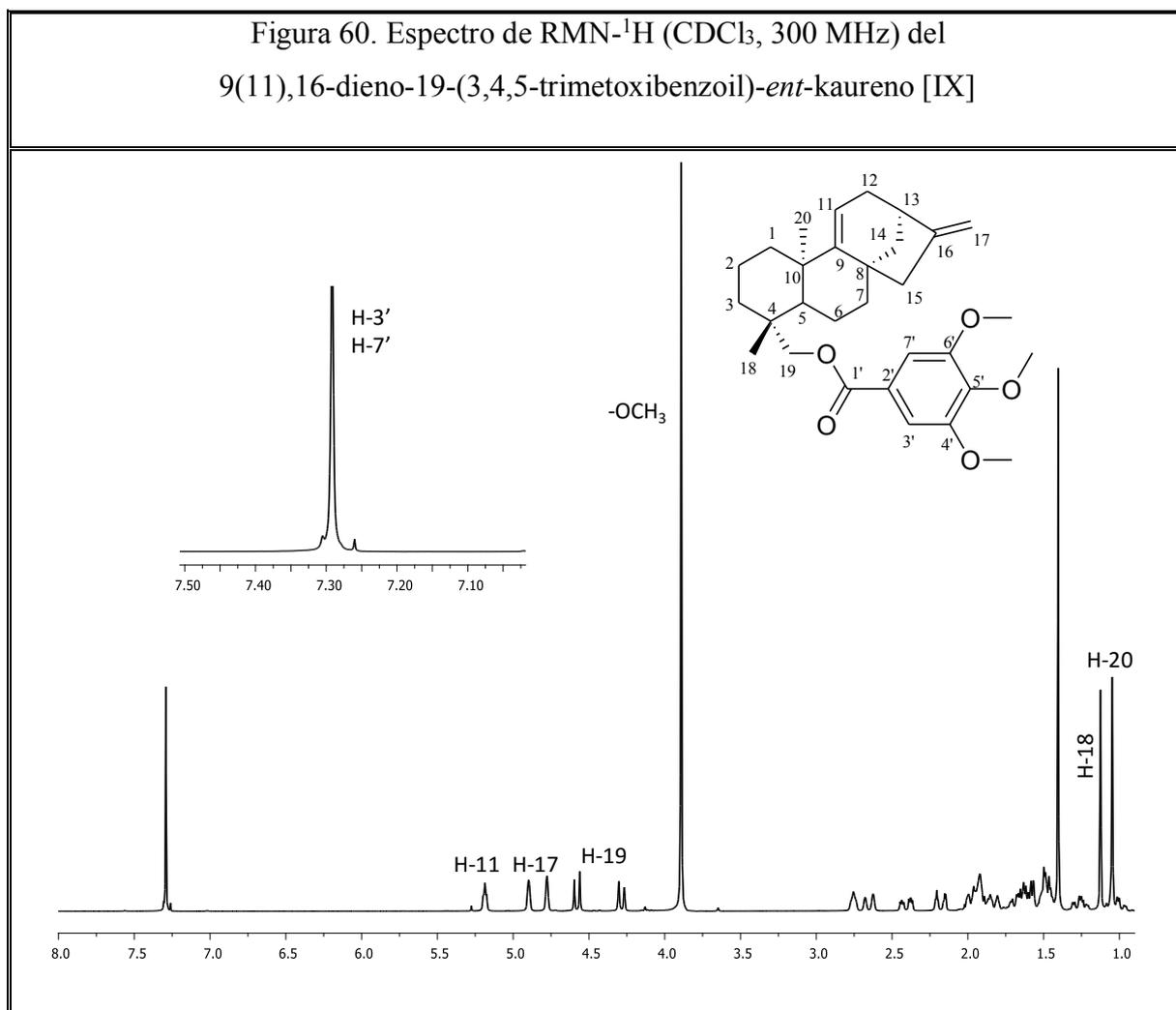


Tabla 22. Bandas de absorción en el espectro IR del
9(11),16-dieno-19-(3,4,5-trimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [IX]

ν máx (cm ⁻¹)	3035	2937	2869	1714	1589-1500	1129-1220
Asignación	>C=CH	-CH	-CH	-O-C=O	>C=C<	-C-O

2. En su espectro de RMN-¹H (Fig. 60, Tabla 23) resalta principalmente el desplazamiento a campos bajos de los dobletes correspondientes a los protones H-19 del compuesto [II] (δ : 3,85 ppm H-19a y δ : 3,59 ppm H-19b d J : 10,9 Hz) de la señal asignada a los hidrógenos del oximetileno H-19 en [IX] (δ_{H} : 4,58

ppm H-19a, *d*, *J*: 11 Hz y δ_H : 4,28 ppm H-19b, *d*, *J*: 11 Hz), debido al efecto desapantallante del carbonilo del éster, se verifica la presencia de un anillo aromático 1,3,4,5-tetrasustituido por el singlete que integra para 2H a δ_H : 7,29 ppm H-3' y H-7'. Adicionalmente se observa la presencia de tres grupos metoxi (-OCH₃) ubicados en las posiciones 4', 5' y 6' (δ_H : 3,89 ppm) en el anillo aromático dicha señal se refleja como un singlete que integra para 9H.



- En el espectro de RMN-¹³C (Fig. 61, Tabla 23) se observa la presencia de 30 carbonos los cuales pudieron ser discriminados según su orientación en el DEPT-135. La señal que aparece a δ_C : 166,1 ppm revela la presencia del carbono carbonílico del grupo éster identificado como C-1', también se puede apreciar el desplazamiento a campo más bajo de la señal del C-19 asignada en el compuesto [II] a δ_C : 64,64 ppm mientras que en el compuesto [IX] se encuentra

a δ_c : 67,05 ppm. Asimismo observamos las señales de los carbonos del anillo bencénico 1,3,4,5 tetrasustituido como son δ_c : 125,5 ppm (C-2'), 106,7 ppm (C-3'), 152,9 ppm (C-4'), 142,2 ppm (C-5'), 152,9 ppm (C-6') y 106,7 ppm (C-7'), adicionalmente se confirma la presencia de los grupos metoxi (-OCH₃) a δ_c : 56,19 ppm (C-4'-C-6') y 60,93 ppm (C-5'). Al asumir un esqueleto del *ent*-kaureno es evidente observar que se mantienen las señales del carbono cuaternario correspondiente a C-16 (>C=) a δ_c : 158,37 ppm y del metileno exocíclico (=CH₂) en C-17, a 105,31 ppm.

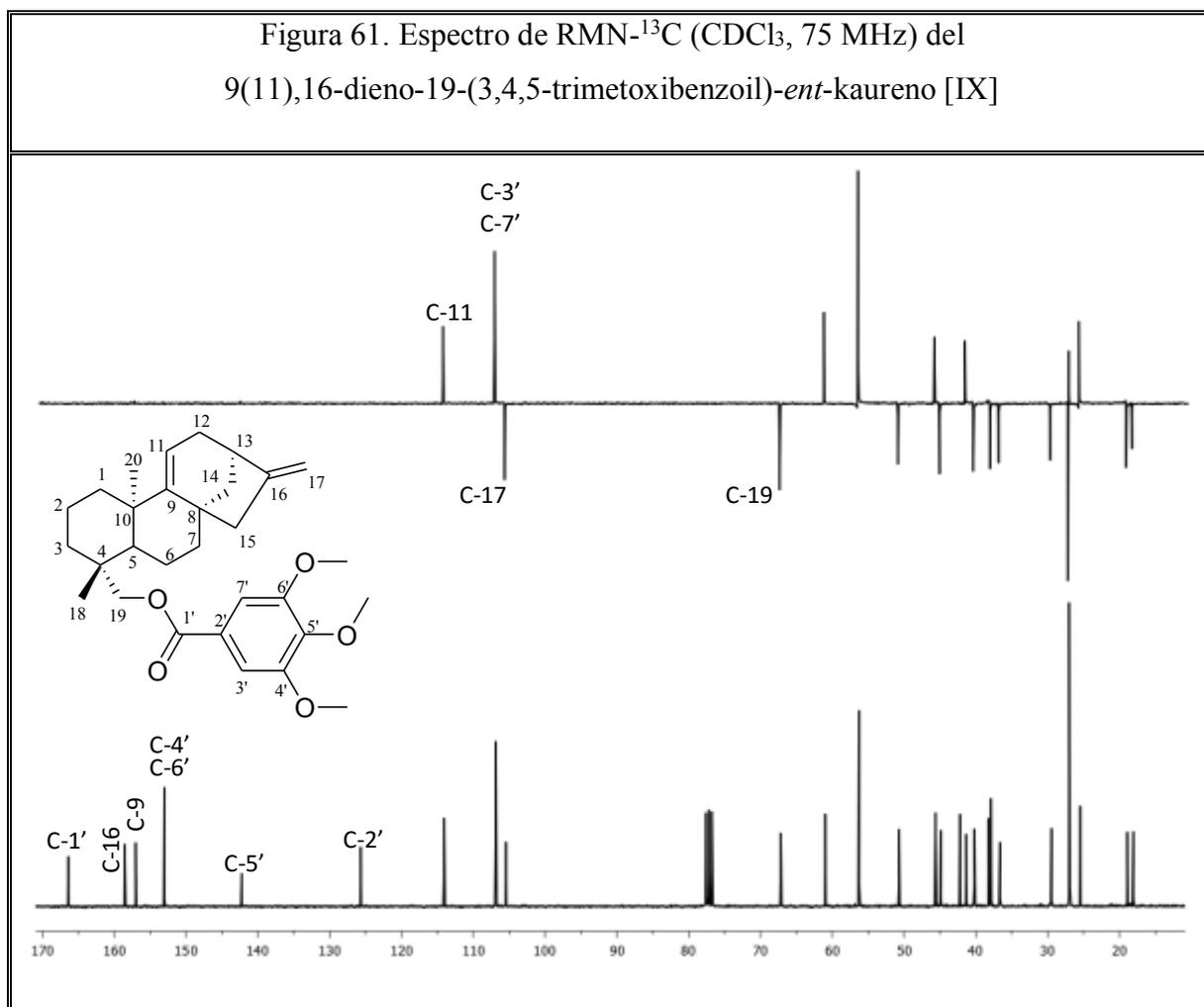


Tabla 23. Desplazamientos Químicos (δ) en los Espectros de RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 300 MHz y 75 MHz), del fragmento que corresponde al 3,4,5-trimetoxibenzoato del éster [IX]							
H	H-3'	H-7'	-OCH ₃ (C-4')	-OCH ₃ (C-5')	-OCH ₃ (C-6')		
δ_H (ppm)	7,29	7,29	3,89	3,89	3,89		
M	s	s	s	s	s		
J (Hz)	-	-	-	-	-		
C	C-1'	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'	C-6'	C-7'
δ_C (ppm)	166,1	125,5	106,7	152,9	142,2	152,9	106,7
Tipo	-O-C=O	=C<	=CH	=C-O	=C-O	=C-O	=CH

4. El análisis detallado del espectro de HMBC (Fig. 63) permitió corroborar la naturaleza del éster, y además determinar con exactitud la ubicación del mismo, de manera inequívoca en C-19, a raíz de la observación en el espectro HMBC de un cruce entre la señal asignada a los hidrógenos H-19 y el pico atribuido al carbonilo del éster (C-1').

Los datos anteriormente expuestos permiten concluir que la estructura del compuesto en estudio, corresponde al 9(11),16-dieno-19-(3,4,5-trimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno. Al consultar la bibliografía se pudo constatar que dicha estructura no ha sido reportada, por lo tanto se considera que dicho compuesto es nuevo.

Figura 62. Correlación del espectro HMBC (CDCl₃, 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(3,4,5-trimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [IX]

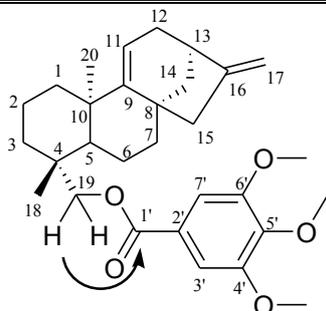
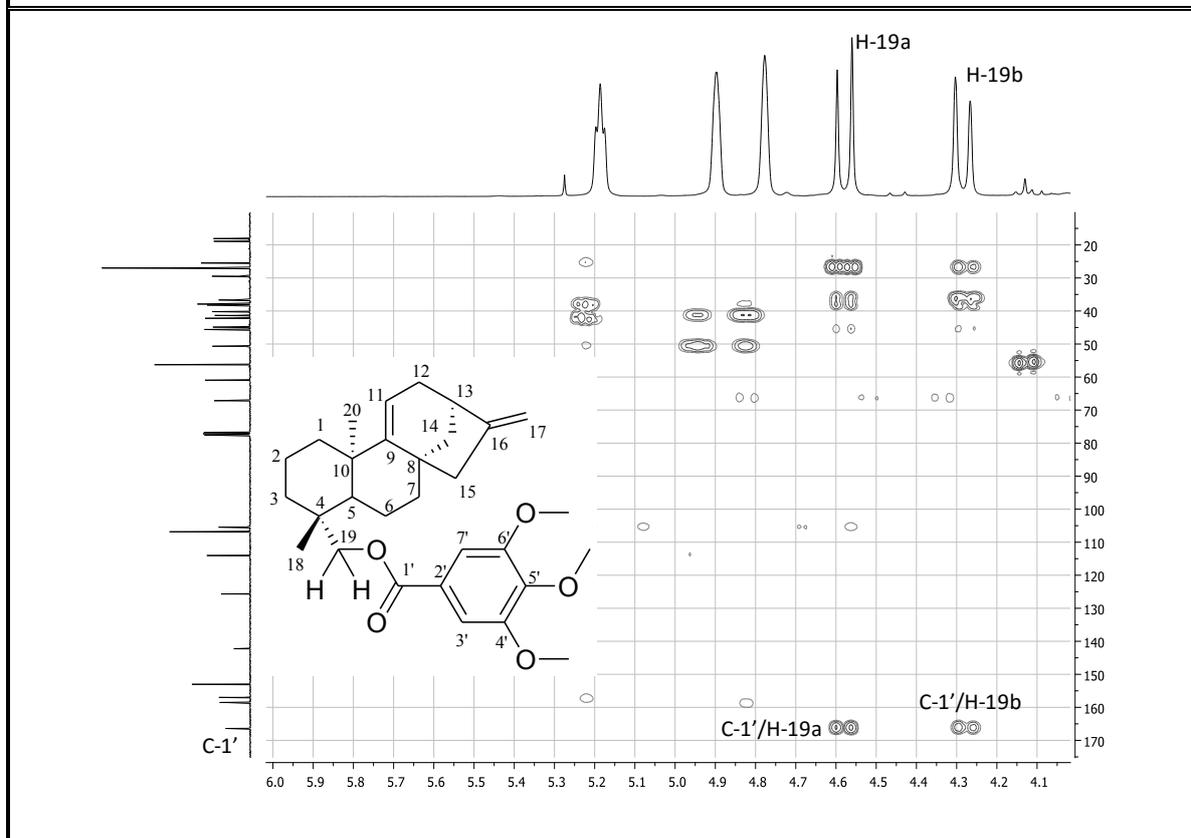
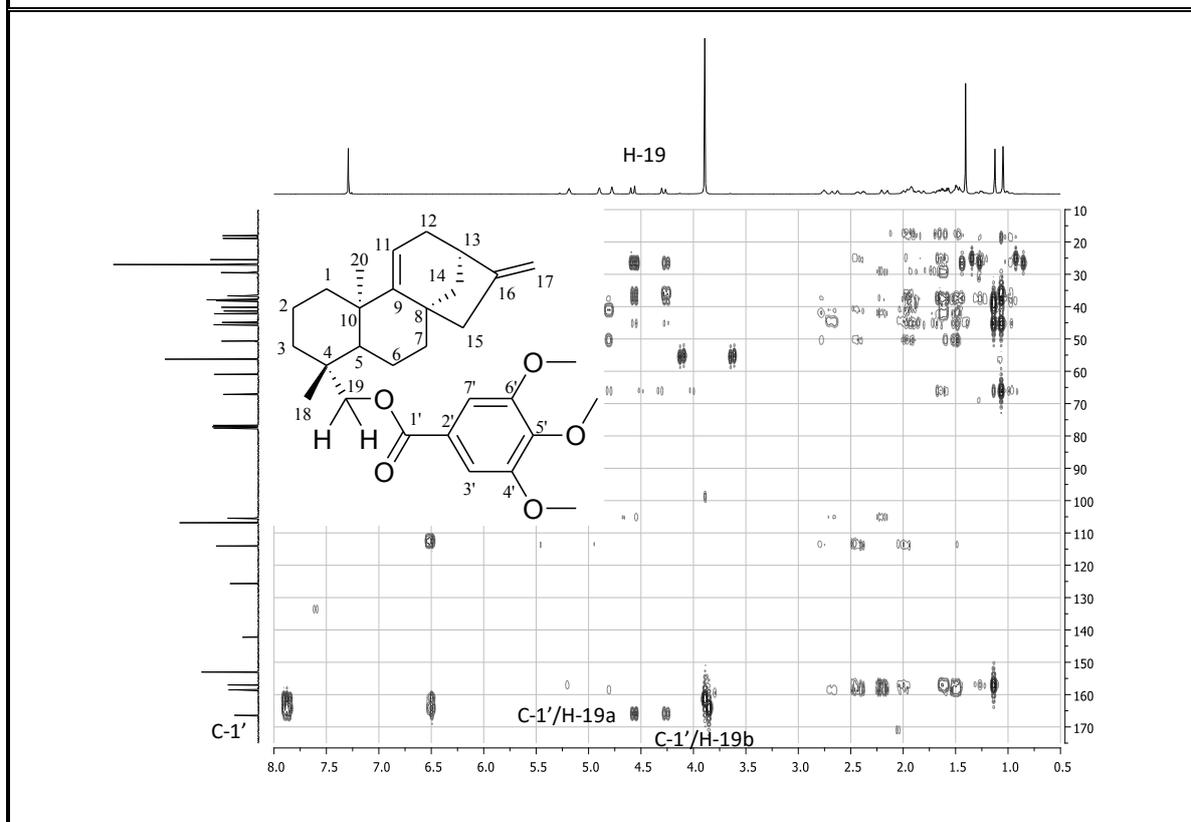
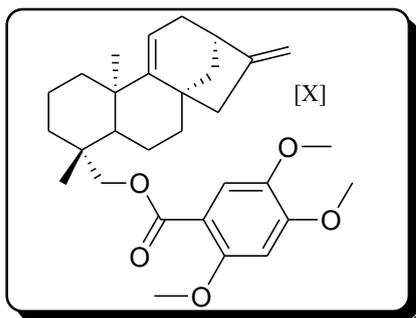


Figura 63. Espectro de HMBC (CDCl₃, 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(3,4,5-trimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [IX]



VII.3.8 9(11),16-dieno-19-(2,4,5-trimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [X]



$C_{30}H_{40}O_5$

PM= 480 g/mol, PF= 131-132 °C

Aspecto: polvo blanco

Redimiento= 98 mg (58 %)

El compuesto 9(11),16-dieno-19-(2,4,5-trimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [X] resulto ser un polvo de color blanco con punto de fusión de 131-132 °C, producto de la reacción del alcohol *ent*-kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II] con el ácido 2,4,5-trimetoxibenzoico, el cual fue obtenido a partir de 317 mg de residuo oleoso amarillo purificado por cromatografía de columna con silica gel (ciclohexano), eluida con ciclohexano/AcOEt (80:20). Considerando el origen del compuesto (bajo las condiciones de reacción descritas en el procedimiento general VI.2.2), a partir de los datos derivados de su espectro IR (Fig. 64; Tabla 24), RMN-¹H (Fig. 65; Tabla 25), RMN-¹³C (Fig. 66; Tabla 25) y DEPT-135 se calculo su fórmula molecular, $C_{30}H_{40}O_5$. Al comparar sus datos espectrales con los del compuesto de partida [II] se observan los siguientes cambios significativos que permitieron caracterizar el esqueleto del derivado [X]:

1. En el espectro de IR (Fig. 64, Tabla 24) destaca la desaparición de la vibración de tensión OH del compuesto de partida [II], por el contrario se observan absorciones atribuibles al grupo éster debido a una banda intensa correspondiente al grupo carbonilo (C=O; ν_{\max} : 1691 cm^{-1}) que se confirma con la vibración de tensión de los enlaces -C-O a 1141 cm^{-1} . La presencia del anillo aromático se evidencia por la banda débil en 3034 cm^{-1} correspondiente a la absorción de tensión C-H, además se observan las bandas de tensión -C=C- a 1611 cm^{-1} – 1516 cm^{-1} características del anillo bencénico. Las vibraciones junto con los sobretonos y bandas de combinación entre 2000 y 1667 cm^{-1} indican la presencia de un compuesto aromático 1,2,4,5 tetrasustituido que se comprueba con la vibración de flexión =C-H a 850 cm^{-1} . Detección en su espectro IR de absorciones atribuibles al grupo éster: banda del carbonilo (C=O; ν_{\max} : 1691 cm^{-1}) y

bandas de tensión (ν_{\max} : 1141 cm^{-1}) correspondientes a vibraciones de tensión de los enlaces C-O-C.

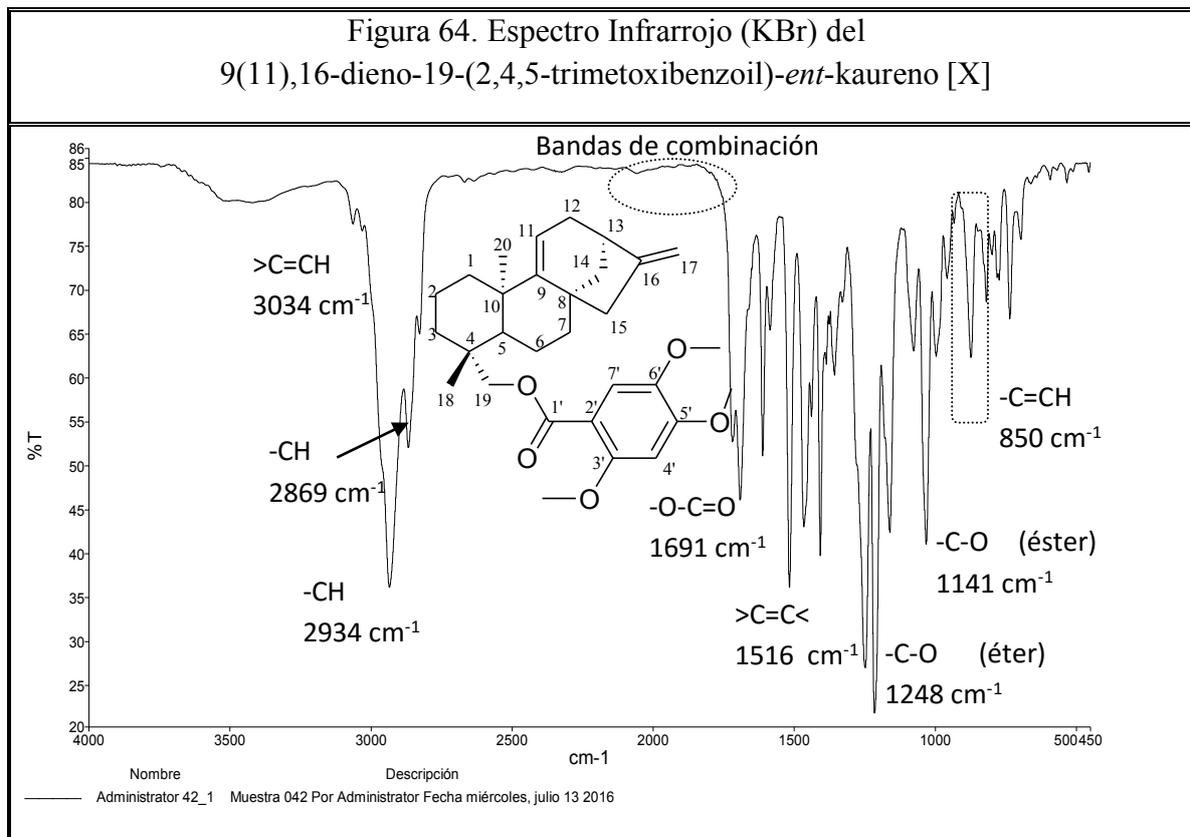
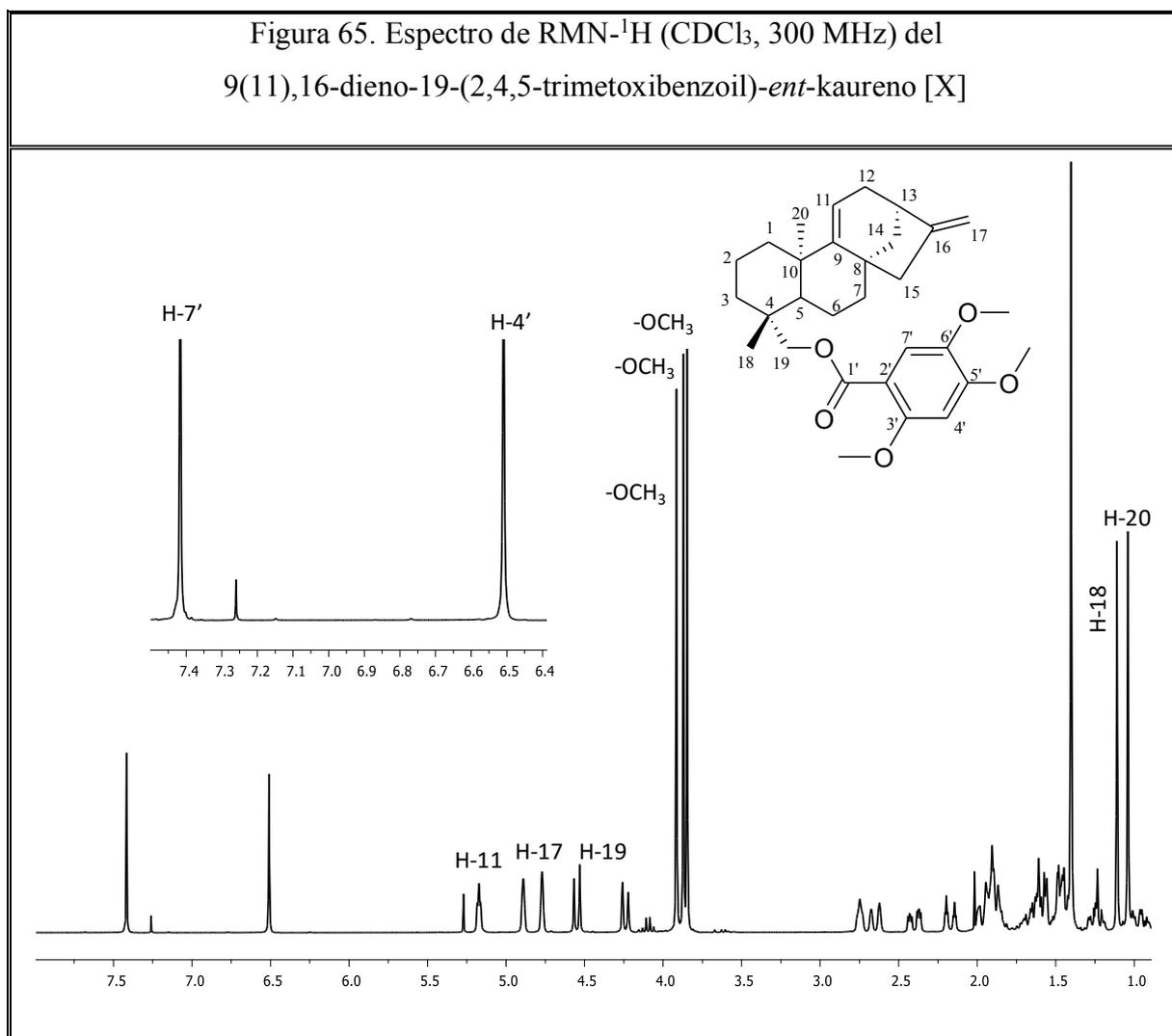


Tabla 24. Bandas de absorción en el espectro IR del
9(11),16-dieno-19-(2,4,5-trimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [X]

ν máx (cm^{-1})	3034	2934	2869	1691	1611-1516	1141-1248
Asignación	>C=CH	-CH	-CH	-O-C=O	>C=C<	-C-O

2. En su espectro de RMN- ^1H (Fig. 65, Tabla 25) resalta principalmente el desplazamiento a campos bajos de los dobletes correspondientes a los protones H-19 del compuesto [II] (δ : 3,85 ppm H-19a y δ : 3,59 ppm H-19b d J : 10,9 Hz) de la señal asignada a los hidrógenos del oximetileno H-19 en [IX] (δ_{H} : 4,55 ppm H-19a, d , J : 11 Hz y δ_{H} : 4,19 ppm H-19b, d , J : 11 Hz), debido al efecto desapantallante del carbonilo del éster, se verifica la presencia de un anillo aromático 1,2,4,5-tetrasustituido por los singletes a δ_{H} : 6,51 ppm H-4' y δ_{H} : 7,41

ppm H-7' ambos integran para 1H. Adicionalmente se observa la presencia de tres grupos metoxi (-OCH₃) ubicados en las posiciones 3' (δ_H : 3,87 ppm), 5' (δ_H : 3,91 ppm) y 6' (δ_H : 3,85 ppm) en el anillo aromático dichas señales se reflejan como singletes que integran para 3H en cada caso.



- En el espectro de RMN-¹³C (Fig. 66, Tabla 25) se observa la presencia de 30 carbonos los cuales pudieron ser discriminados según su orientación en el DEPT-135. La señal que aparece a δ_C : 166,3 ppm revela la presencia del carbono carbonílico del grupo éster identificado como C-1', también se puede apreciar el desplazamiento a campo más bajo de la señal del C-19 asignada en el compuesto [II] a δ_C : 64,64 ppm mientras que en el compuesto [X] se encuentra a δ_C : 66,61 ppm. Asimismo observamos las señales de los carbonos del anillo

bencénico 1,2,4,5 tetrasustituido como son δ_c : 111,0 ppm (C-2'), 155,6 ppm (C-3'), 97,6 ppm (C-4'), 153,5 ppm (C-5'), 142,5 ppm (C-6') y 113,7 ppm (C-7'), adicionalmente se confirma la presencia de los grupos metoxi (-OCH₃) a δ_c : 55,92 ppm (C-5'), 56,80 ppm (C-6') y 56,28 ppm (C-3'). Al asumir un esqueleto del *ent*-kaureno es evidente observar que se mantienen las señales del carbono cuaternario correspondiente a C-16 (>C=) a δ_c : 158,7 ppm y del metileno exocíclico (=CH₂) en C-17, a 105,25 ppm.

Figura 66. Espectro de RMN-¹³C (CDCl₃, 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(2,4,5-trimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [X]

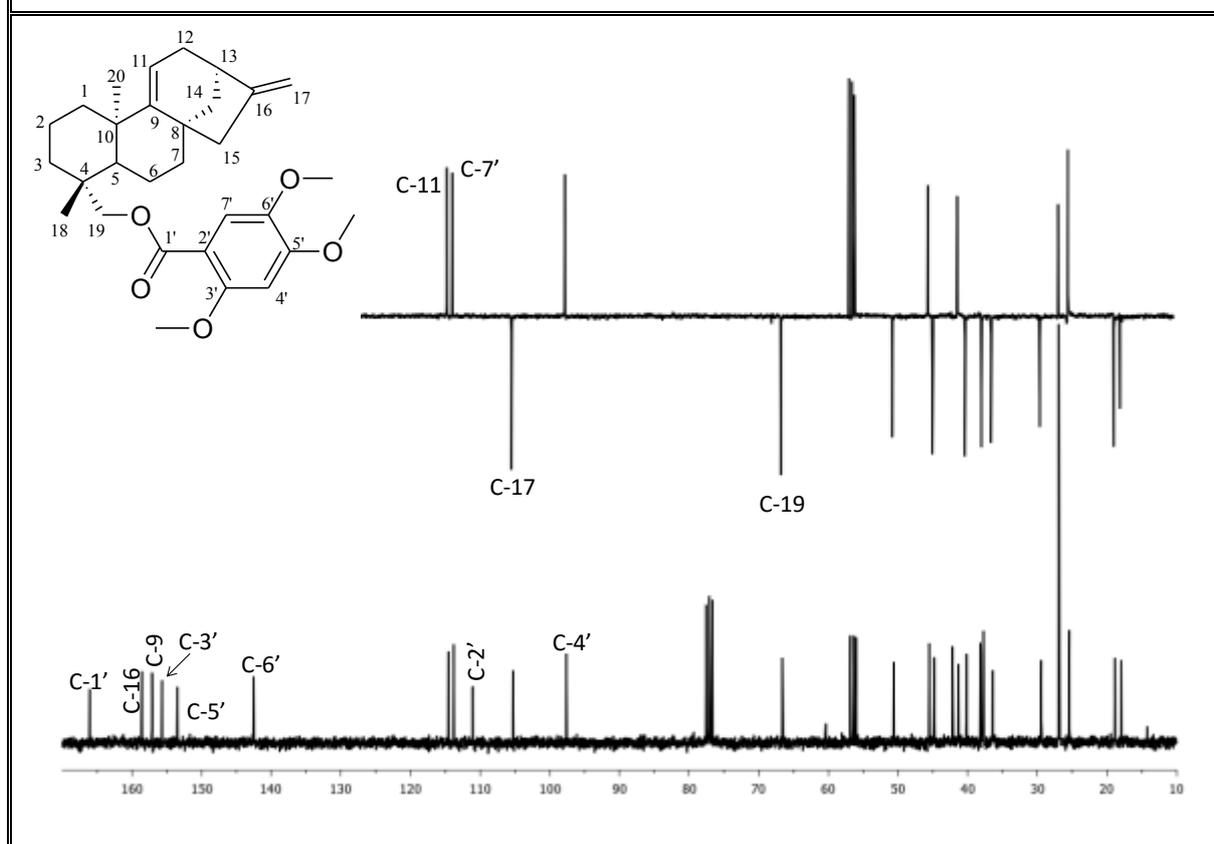


Tabla 25. Desplazamientos Químicos (δ) en los Espectros de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 300 y 75 MHz), del fragmento que corresponde al 2,4,5-trimetoxibenzoato del éster [X]							
H	H-4'	H-7'	-OCH ₃ (C-3')	-OCH ₃ (C-5')	-OCH ₃ (C-6')		
δ_{H} (ppm)	6,51	7,41	3,87	3,91	3,85		
M	<i>s</i>	<i>s</i>	<i>s</i>	<i>s</i>	<i>s</i>		
<i>J</i> (Hz)	-	-	-	-	-		
C	C-1'	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'	C-6'	C-7'
δ_{C} (ppm)	166,3	111,0	155,6	97,6	153,5	142,5	113,7
Tipo	-O-C=O	=C<	=C-O	=CH	=C-O	=C-O	=CH

4. La correlación en el HMBC (Fig. 68) del carbono cuaternario del grupo carbonilo identificado como C-1' (δ_{C} :166,3 ppm) con H-19a (δ_{H} : 4,55 ppm, *d*, *J*: 11 Hz) y H-19b (δ_{H} : 4,19 ppm, *d*, *J*: 11 Hz) demuestran que la molécula se encuentra unida por medio de un enlace éster, así mismo se observan las correlaciones entre el protón aromático H-4' (δ_{H} : 4,55 ppm) con los carbonos cuaternarios aromáticos C-3' (δ_{C} :155,6 ppm) y C-5' (δ_{C} :153,5 ppm), de igual manera se verifica que existe correlación entre H-7' con los carbonos C-2' (δ_{C} :111,0 ppm) y C-6' (δ_{C} :142,5 ppm). Los datos anteriormente expuestos permiten concluir que la estructura del compuesto en estudio, corresponde al 9(11),16-dien-19-(2,4,5-trimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno. Al consultar la bibliografía se pudo constatar que dicha estructura no ha sido reportada, por lo tanto se considera que dicho compuesto es nuevo.

Figura 67. Correlación del espectro HMBC (CDCl_3 , 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(2,4,5-trimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [X]

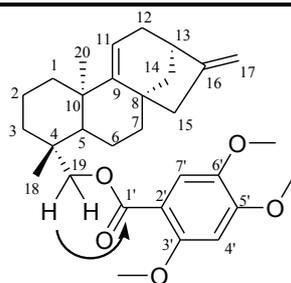
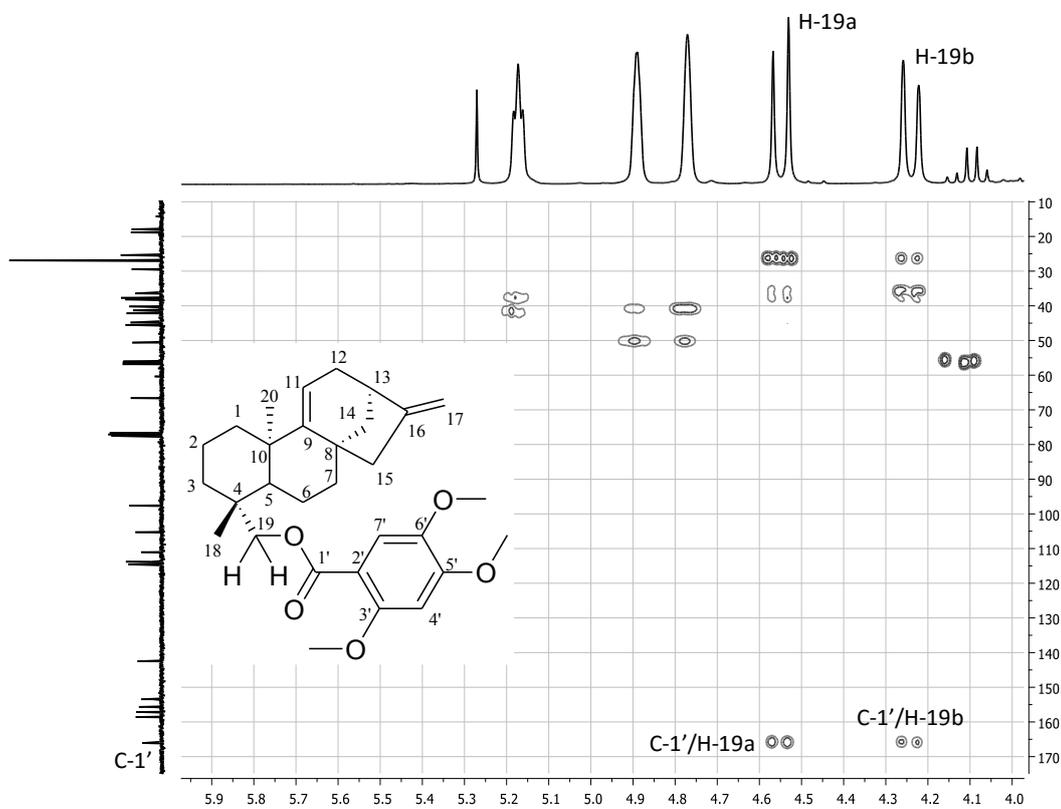
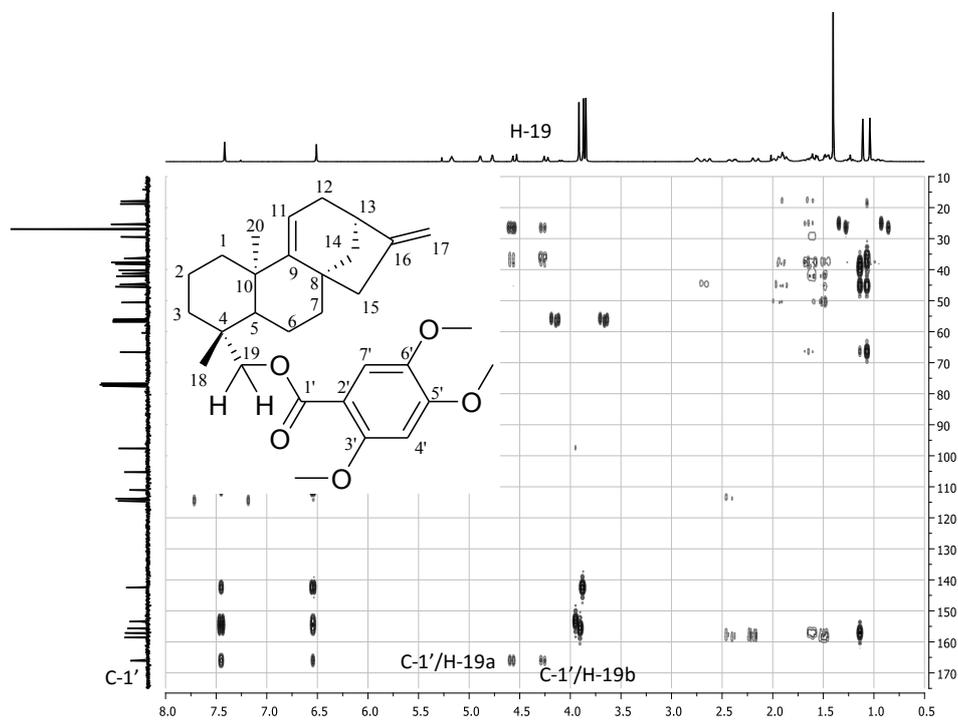
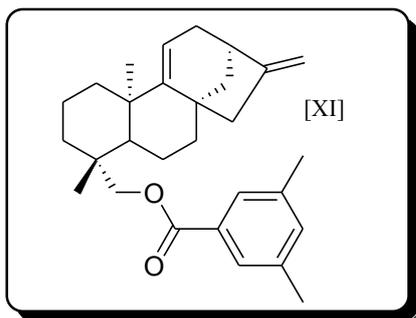


Figura 68. Espectro de HMBC (CDCl₃, 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(2,4,5-trimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [X]



V.3.9 9(11),16-dieno-19-(3,5-dimetilbenzoil)-*ent*-kaureno [XI]



$C_{29}H_{38}O_2$

PM= 418 g/mol, PF= 125-128 °C

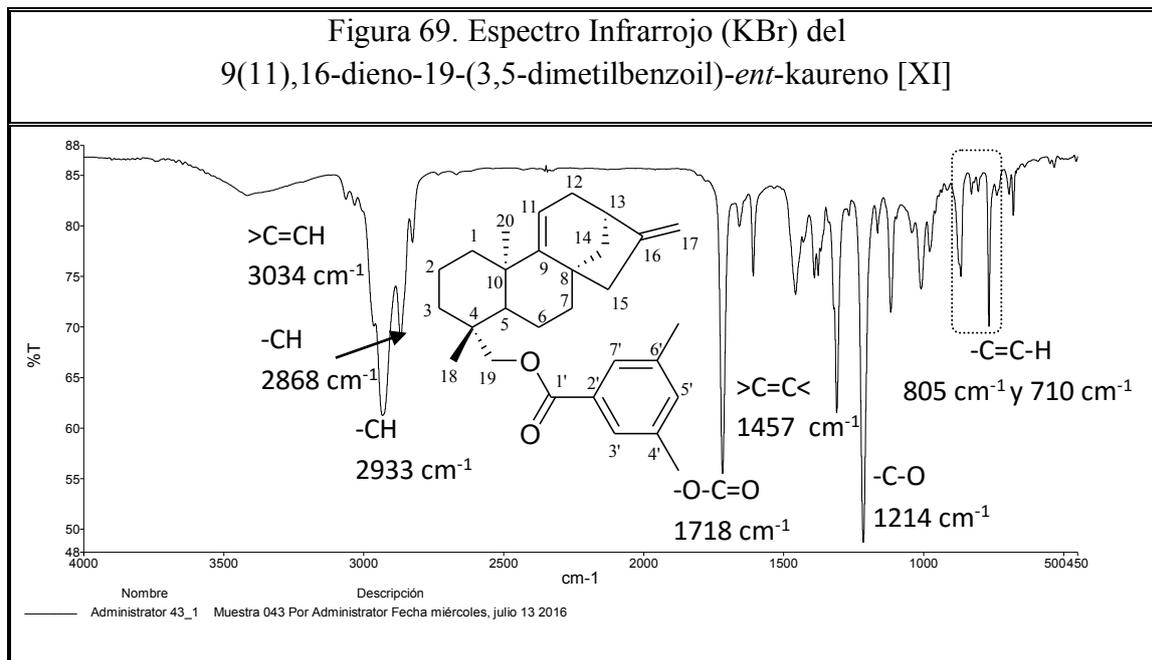
Aspecto: polvo blanco

Rendimiento= 141 mg (96 %)

Este derivado se obtuvo a partir del residuo oleoso incoloro (309 mg) obtenido de la reacción entre el alcohol *ent*-kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II] y el ácido 3,5-dimetilbenzoico bajo las condiciones de reacción descritas en el procedimiento general VI.2.2. La purificación se realizó por cromatografía de columna con silica gel (ciclohexano), eluida con ciclohexano/AcOEt (95:5), obteniendo 141 mg (96 %) de un polvo blanco que se reveló como una mancha homogénea sobre la TLC y presentó un punto de fusión entre 125-128 °C. Su fórmula molecular, $C_{29}H_{38}O_2$, fue determinada a través de la información derivada de sus espectros de IR (Fig. 69; Tabla 26), RMN- 1H (Fig. 70; Tabla 27), RMN- ^{13}C (Fig. 71; Tabla 27). Al analizar en forma detallada los espectros del producto en estudio, y además compararlos con el alcohol de partida [II], fue posible destacar una serie de hechos que condujeron al establecimiento de la estructura del 9(11),16-dieno-19-(3,5-dimetilbenzoil)-*ent*-kaureno [XI]. Así pues:

1. En el espectro de IR (Fig. 69, Tabla 26) se evidencia la presencia de un grupo éster al lado de un anillo aromático 1,3,5 trisustituido, dicha información se corrobora debido a una banda intensa correspondiente al grupo carbonilo (C=O) en 1718 cm^{-1} , la cual se confirma con la vibración de tensión de los enlaces -C-O a 1214 cm^{-1} , mientras que la presencia del anillo aromático se verifica por la banda débil en 3034 cm^{-1} correspondiente a la absorción de tensión C-H, que se encuentra a la izquierda de la banda típica saturada C-H (2868 cm^{-1}), además se observan las bandas de tensión -C=C- a 1600 cm^{-1} – 1457 cm^{-1} características del núcleo bencénico, las vibraciones de flexión fuera del plano =C-H a 805 cm^{-1} y 710 cm^{-1} indican la presencia de un compuesto aromático trisustituido en las posiciones 1,3 y 5. Es importante resaltar la desaparición de la vibración de

tensión OH del compuesto de partida [II], y el solapamiento de la señal del doble enlace olefínico C=C a 1660 por la presencia del grupo carbonilo.



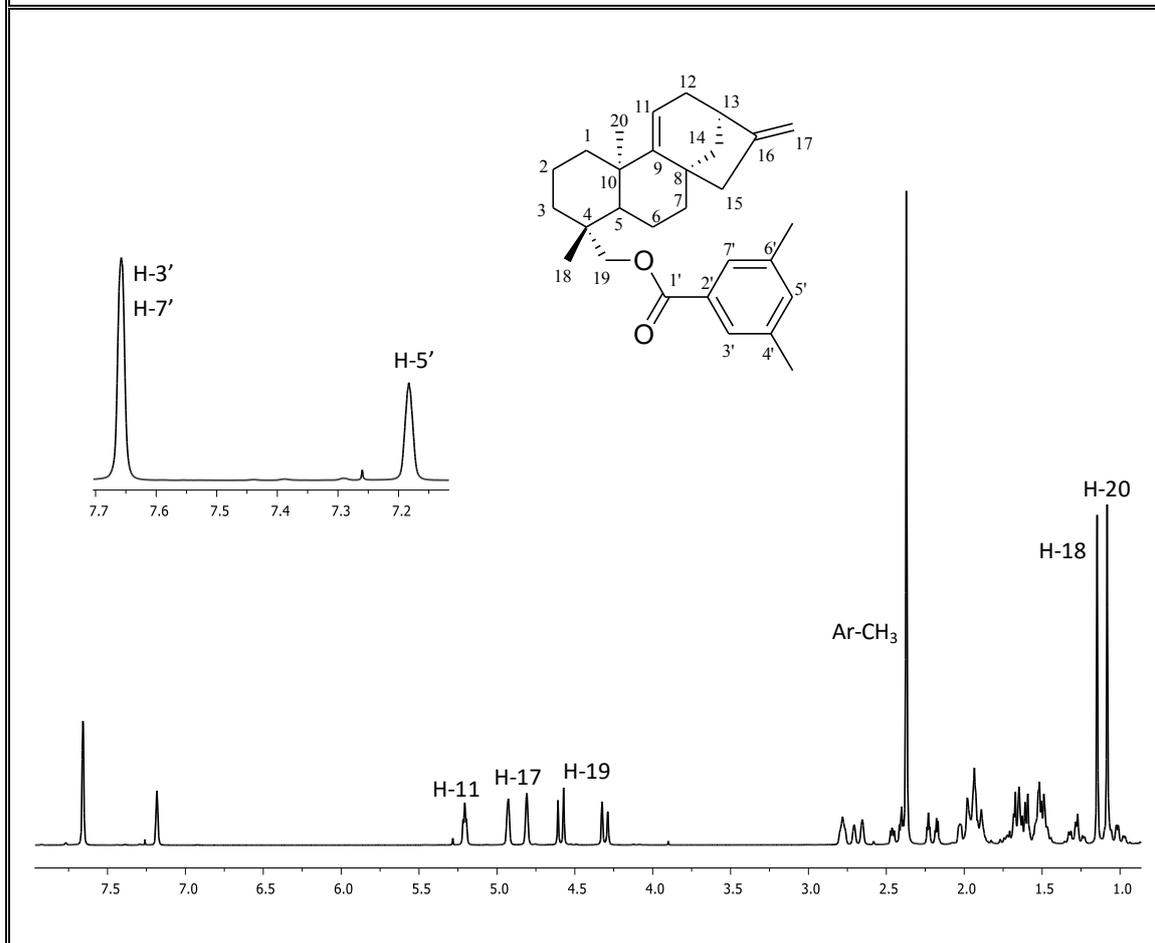
**Tabla 26. Bandas de absorción en el espectro IR del
9(11),16-dieno-19-(3,5-dimetilbenzoil)-*ent*-kaureno [XI]**

ν máx (cm ⁻¹)	3034	2933	2868	1718	1457	1214
Asignación	>C=CH	-CH	-CH	-O-C=O	>C=C<	-C-O

2. En su espectro de RMN-¹H (Fig. 70, Tabla 27) se distinguen principalmente la aparición de dos singletes a campo bajo, uno que integra para dos protones metínicos unidos al anillo aromático a δ_H : 7,66 ppm (H-3' y H-7', =CH, 2H), y otro a δ_H : 7,18 ppm que integra para un protón correspondiente a H-5'. Por otra parte se confirma la señal de los dobletes mutuamente acoplados pero un poco desapantallados debido a la influencia de la unión éster, estos presentan un desplazamiento a δ_H : 4,67 ppm H-19a y δ_H : 4,38 ppm H-19b (2H, *d*, *J*: 11 Hz), siendo estos resultados comparados con los espectros obtenidos para el alcohol de partida [II] que presentaron un desplazamiento químico a δ_H : 3,85 ppm H-19a y δ_H : 3,59 ppm H-19b (*d*, *J*: 10,9 Hz) hidrógenos metilénicos atribuidos un alcohol primario. Finalmente se aprecia la aparición de una nueva señal

correspondiente a los metilos ubicados en las posiciones 4' y 6' del anillo aromático (δ_H : 2,37 ppm, *s*, 6H).

Figura 70. Espectro de RMN- 1H ($CDCl_3$, 300 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(3,5-dimetilbenzoil)-*ent*-kaureno [XI]



3. En el espectro de RMN- ^{13}C (Fig. 71, Tabla 27) se observa la presencia de veintinueve carbonos discriminados según su orientación en el experimento DEPT-135, principalmente se puede apreciar la aparición de las señales correspondiente a los carbonos cuaternarios, uno proporcionado al carbonilo que forma el grupo éster a δ_c : 167,1 ppm (C-1') y la otra señal con un desplazamiento muy cercano al anterior a δ_c : 157,2 ppm correspondiente al C-9 que comparte el doble enlace olefínico con el carbono metínico C-11 (δ_c : 113,7 ppm) del núcleo *ent*-kaureno; también se observan las señales de los carbonos que conforman el anillo aromático correspondientes a δ_c : 130,6 ppm (=C<, C-

2'); δ_c : 127,3 ppm (=CH, C-3'); δ_c : 138,0 ppm (=C<, C-4'); δ_c : 134,5 ppm (=CH, C-5'); δ_c : 138,0 ppm (=C<, C-6'); y δ_c : 127,3 ppm (=CH, C-7'). Así mismo es importante ratificar a campo alto la señal del carbono metilénico C-19 (δ_c : 66,70 ppm) que se encuentra unido al oxígeno de la función éster. Los carbonos de los grupos metilo (-CH₃) presentes en las posiciones 4' y 6' en el anillo aromático según se desprende del HMQC, dan origen a la señal a δ_c : 21,29 ppm.

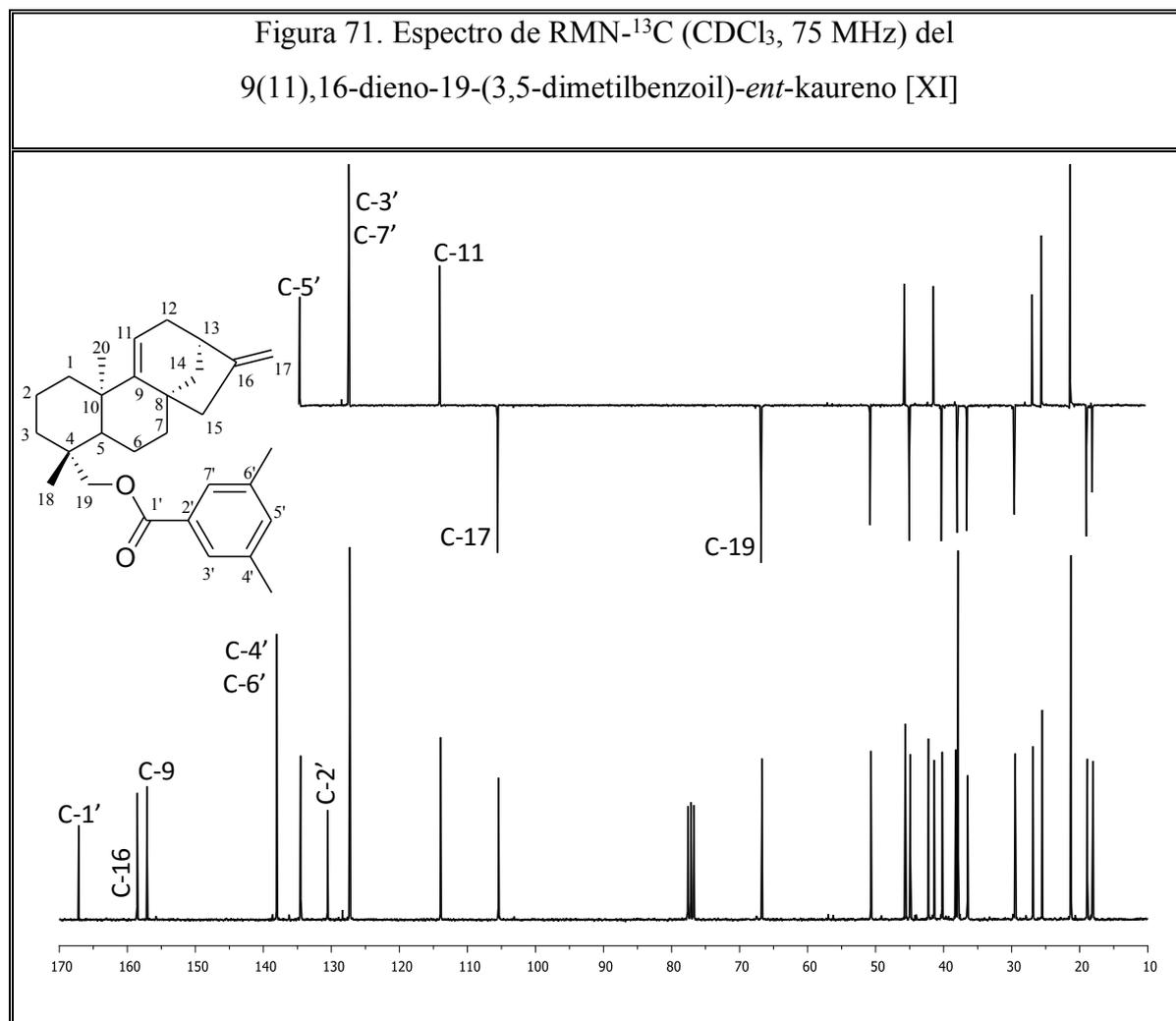


Tabla 27. Desplazamientos Químicos (δ) en los Espectros de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 300 MHz y 75 MHz), del fragmento que corresponde al 3,5-dimetilbenzoato del éster [XI]							
H	H-3'	H-5'	H-7'	-CH ₃ (C-4')	-CH ₃ (C-6')		
δ_{H} (ppm)	7,66	7,18	7,66	2,37	2,37		
M	<i>s</i>	<i>s</i>	<i>s</i>	<i>s</i>	<i>s</i>		
<i>J</i> (Hz)	-	-	-	-	-		
C	C-1'	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'	C-6'	C-7'
δ_{C} (ppm)	167,1	130,6	127,3	138,0	134,5	138,0	127,3
Tipo	-O-C=O	=C<	=CH	=C<	=CH	=C<	=CH

4. El espectro de HMBC (Fig. 73) confirma la naturaleza del éster, mediante la secuencia de correlaciones $\text{H-19} \leftrightarrow \text{C-1}'$, es evidente que la ubicación del éster quedo establecida de manera inequívoca en C-19, a raíz de la observación en el espectro HMBC de un cruce entre la señal asignada a los hidrógenos H-19 y el pico atribuido al carbonilo del éster (C-1'), así mismo H-3' y H-7' (δ_{H} : 7,66 ppm) en común presentan correlaciones con los carbonos C-2' (δ_{C} : 130,6 ppm) y C-5' (δ_{C} : 134,5 ppm), mientras que H-5' se correlaciona con C-4' y C-6' (δ_{C} : 138,0 ppm).

Figura 72. Correlación del espectro HMBC (CDCl_3 , 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(3,5-dimetilbenzoil)-*ent*-kaureno [XI]

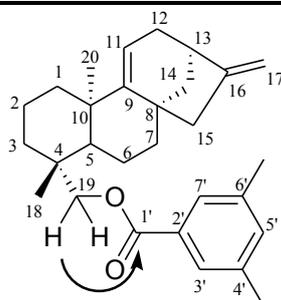
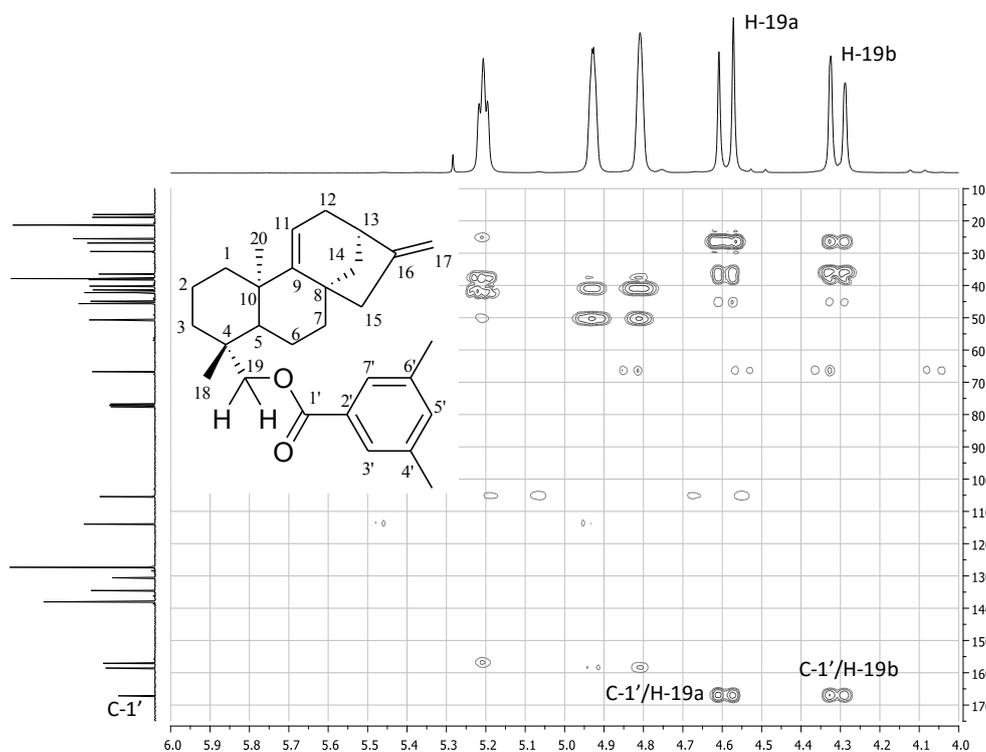
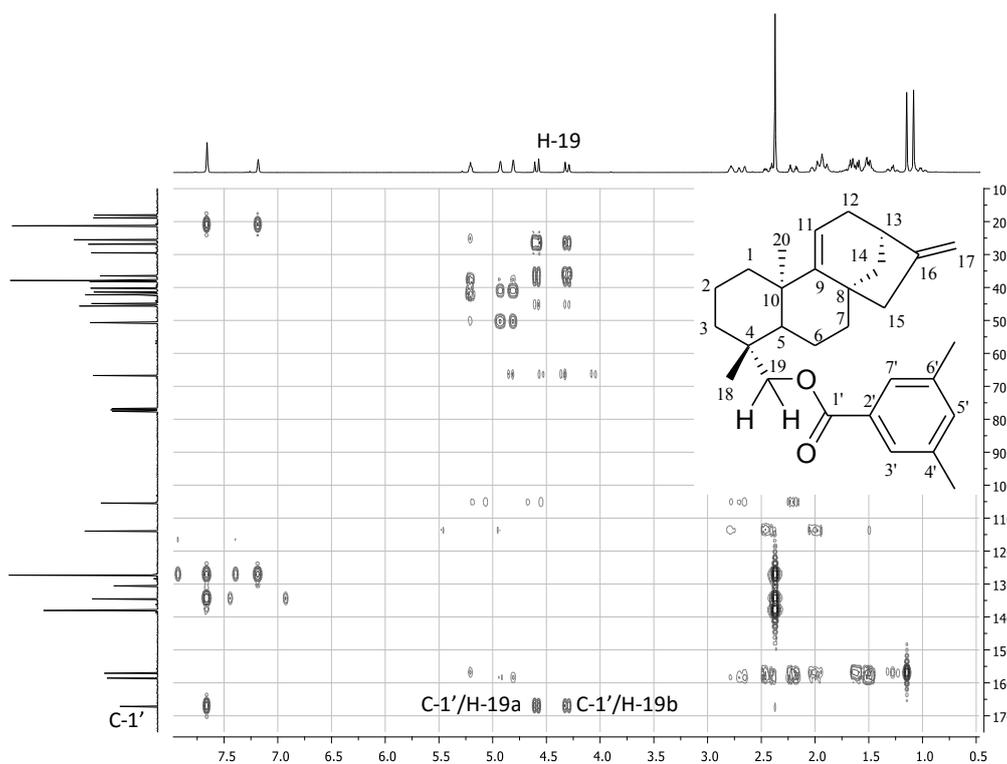
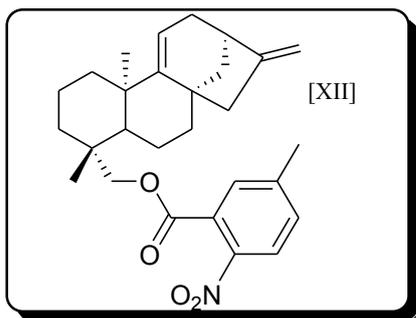


Figura 73. Espectro de HMBC (CDCl₃, 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(3,5-dimetilbenzoil)-*ent*-kaureno [XI]



VII.3.10 9(11),16-dieno-19-(5-metil-2-nitrobenzoil)-*ent*-kaureno [XII]



$C_{28}H_{32}NO_4$

PM= 446 g/mol, PF= 145-147 °C

Aspecto: polvo blanco

Rendimiento= 148 mg (95 %)

El resultado de la reacción entre el alcohol *ent*-kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II] con el ácido 5-metil-2-nitrobenzoico bajo las condiciones de reacción descritas en el procedimiento general VI.2.2, fue un residuo oleoso amarillo (340 mg) purificado por cromatografía de columna con silica gel (ciclohexano), eluida con ciclohexano/AcOEt (90:10), obteniendo 148 mg del compuesto [XII] con un rendimiento del 95 %. El análisis de los espectros de IR (Fig. 74, Tabla 28), RMN-¹H (Fig. 75, Tabla 29), RMN-¹³C y DEPT (Fig. 76, Tabla 29), resultó congruente con la fórmula molecular $C_{28}H_{32}NO_4$, dicha fórmula corresponde a un compuesto de once insaturaciones, una de las cuales evidencia la presencia de un grupo carbonilo característico en los ésteres como lo muestra el espectro de IR, en la banda ν_{max} : 1731 cm^{-1} . Esta información se confirma al comparar sus espectros con el alcohol de partida [II], observando algunos cambios que corroboran la formación del éster aromático 1,2,5 trisustituido [XII], las cuales se describen a continuación:

1. En el espectro IR (Fig. 74; Tabla 28) resalta una banda intensa típica del grupo carbonilo de la función éster a 1731 cm^{-1} la cual se corrobora con la correspondiente vibración de tensión del enlace C-O a 1132 cm^{-1} , además la desaparición de la banda ancha del enlace OH del compuesto de partida [II] ratifica lo expuesto anteriormente. La existencia de un doble enlace de naturaleza exometilénica quedó confirmada por la vibración de estiramiento $>C=CH_2$ que aparece a 2934 cm^{-1} , la cual se diferencia notablemente de las bandas de absorción correspondientes a la vibración de tensión del enlace $=C-H$ a 3034 cm^{-1} de los anillos aromáticos. Las bandas de absorción que aparecen a 1530 cm^{-1} y 1347 cm^{-1} son características del enlace N-O en los compuestos nitro aromáticos las cuales solapan las vibraciones C=C ubicadas entre 1600 cm^{-1} y 1500 cm^{-1}

impidiendo confirmar la presencia del anillo aromático; debido a que el espectro de IR no aportó más información sobre el hecho de que el núcleo bencénico se encuentra 1,2,5-trisustituido nos apoyamos en las señales presentes en el espectro de RMN-¹H para confirmarlo como se describe más adelante.

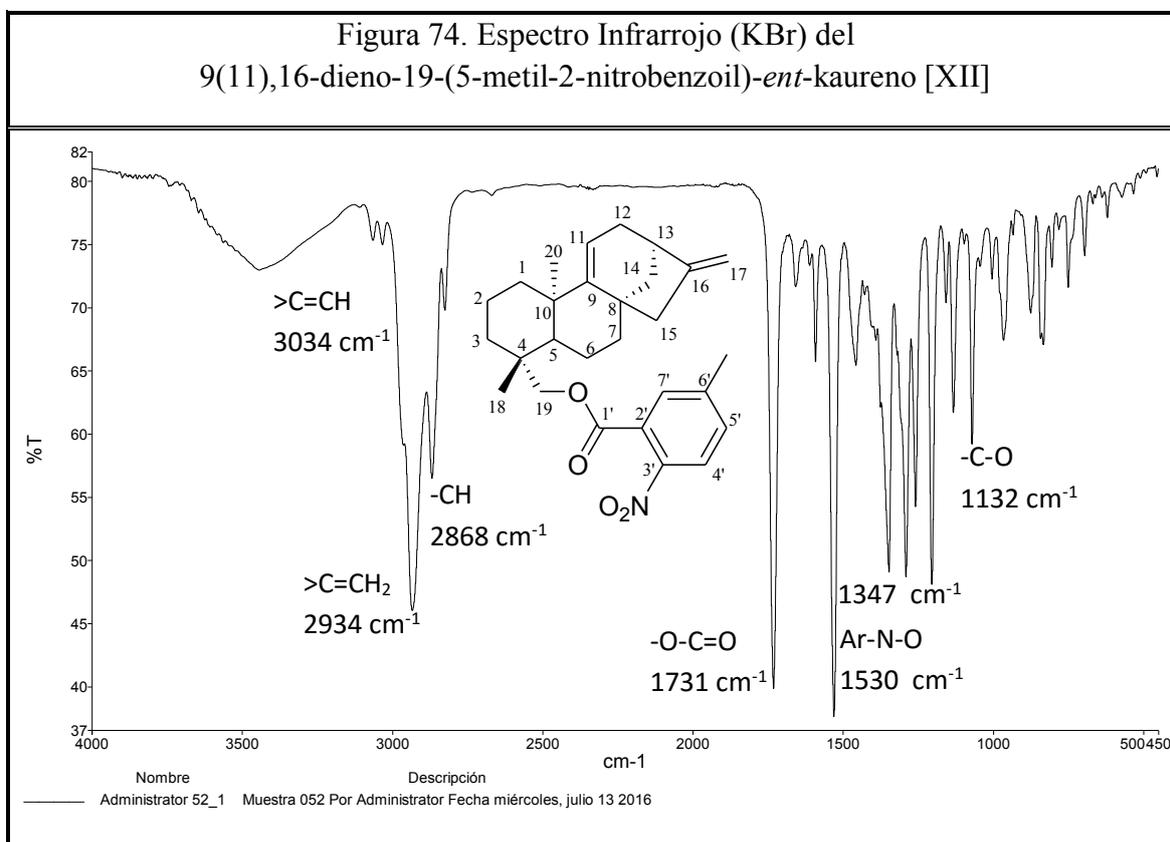
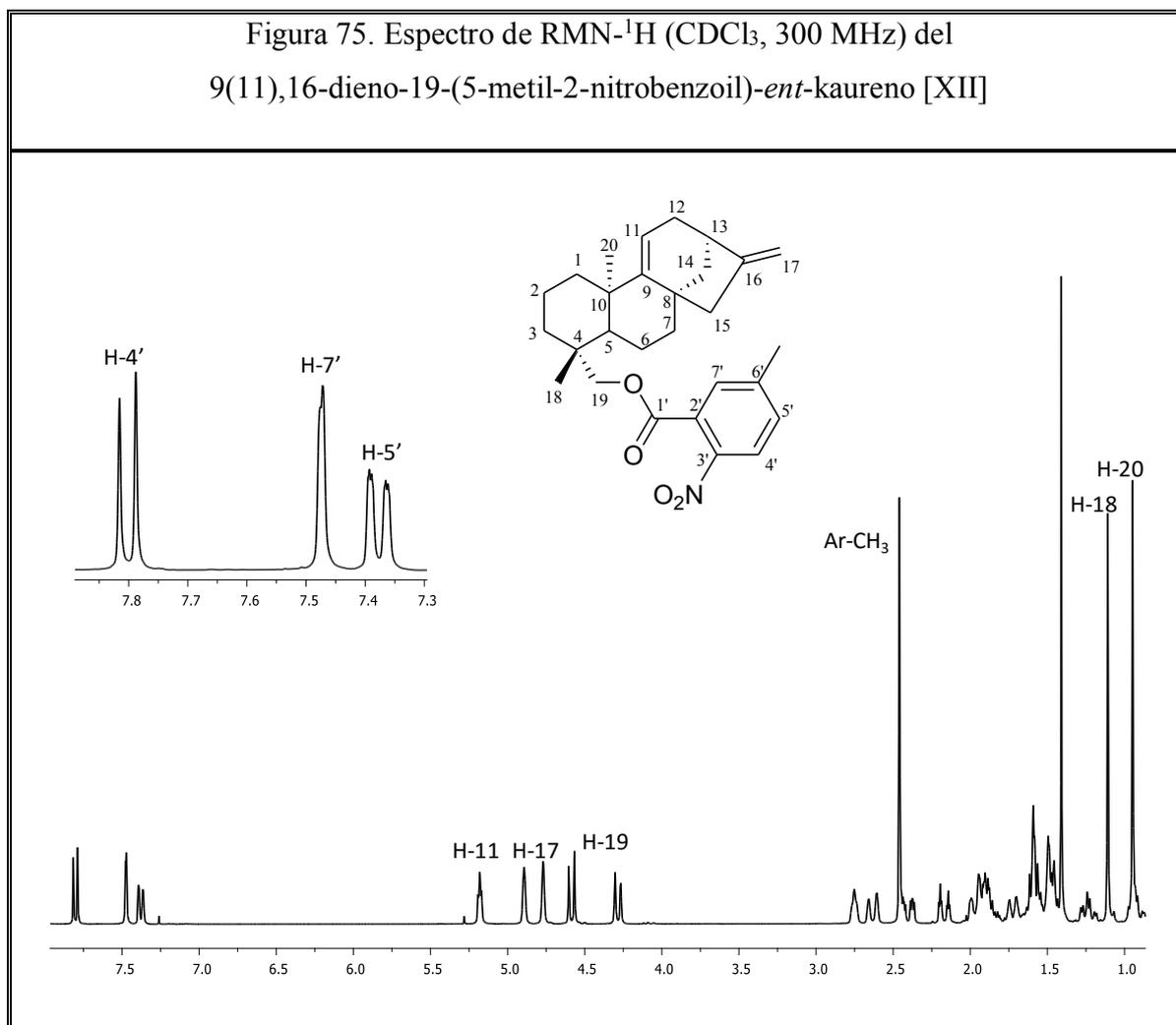


Tabla 28. Bandas de absorción en el espectro IR del
9(11),16-dieno-19-(5-metil-2-nitrobenzoil)-*ent*-kaureno [XII]

ν máx (cm ⁻¹)	3034	2934	2868	1731	1530-1347	1132
Asignación	>C=CH	>C=CH ₂	-CH	-O-C=O	Ar-N-O	-C-O

- En su espectro de RMN-¹H (Fig. 75, Tabla 29) destaca a campo bajo la aparición de las señales de los protones aromáticos las cuales integran para tres hidrógenos. La primera señal que se observa es un doblete correspondiente a H-4' (δ_{H} : 7,80 ppm, =CH, J : 8,3 Hz, 1H), seguidamente encontramos un singlete identificado para H-7' (δ_{H} : 7,47 ppm, =CH, 1H), posteriormente a δ_{H} : 7,38 ppm

localizamos un doblete de doblete que refiere al H-5' (=CH, J : 8,3-1,1 Hz, 1H). Al comparar este espectro con el espectro del compuesto de partida [II] se observa que las señales del grupo -CH₂- del alcohol primario que aparecen a δ_H : 3,85 ppm H-19a y δ_H : 3,59 ppm H-19b (d , J : 10,9 Hz) se han desplazado a campo más bajo en el compuesto [XII] (δ_H : 4,57 ppm H-19a y δ_H : 4,27 ppm H-19b d , J : 11 Hz), sin duda seguimos visualizando las señales que pertenecen a H-11 (δ_H : 5,18 ppm, =CH, s , 1H), H-17 [(H-17a, δ_H : 4,89 ppm, =CH, s , 1H); (H-17b, δ_H : 4,77 ppm, =CH, s , 1H)], así mismo a campo alto se mantienen los singletes correspondientes a H-18 (δ_H : 1,11 ppm, -CH₃, 3H) y H-20 (δ_H : 0,95 ppm, -CH₃, 3H), cabe destacar una nueva señal que integra para tres protones a δ_H : 2,47 ppm la cual coincide con los hidrógenos del metilo (-CH₃) ubicado en la posición 6' del anillo aromático.



3. En el espectro de RMN-¹³C (Fig. 76, Tabla 29) se confirma la presencia de veintiocho carbonos, los cuales pudieron ser discriminados según su orientación en el experimento DEPT-135, se observan los carbonos cuaternarios pertenecientes al anillo aromático 1,2,5-trisustituido a δ_c : 127,7 ppm (=CH<, C-2'); δ_c : 145,3 ppm (=C-NO₂, C-3'); δ_c : 123,4 ppm (=CH, C-4'); δ_c : 131,1 ppm (=CH, C-5'); δ_c : 143,7 ppm (=C<, C-6'); δ_c : 129,5 ppm (=CH, C-7'), además resalta la señal del carbono del carbonilo del éster a δ_c : 165,5 ppm (C1'). Por otra parte continuamos observando la señal que corresponde al carbono metínico C-11 del anillo C del esqueleto del *ent*-kaureno con desplazamiento igual a δ_c : 113,3 ppm (=CH, C-11) así como la del carbono C-17 correspondiente al doble enlace exocíclico propio del esqueleto kaurénico a δ_c : 104,6 ppm (=CH, C-17). La presencia del grupo metil (-CH₃) ubicado en la posición 6' del anillo aromático se confirma a δ_c : 20,75 ppm.

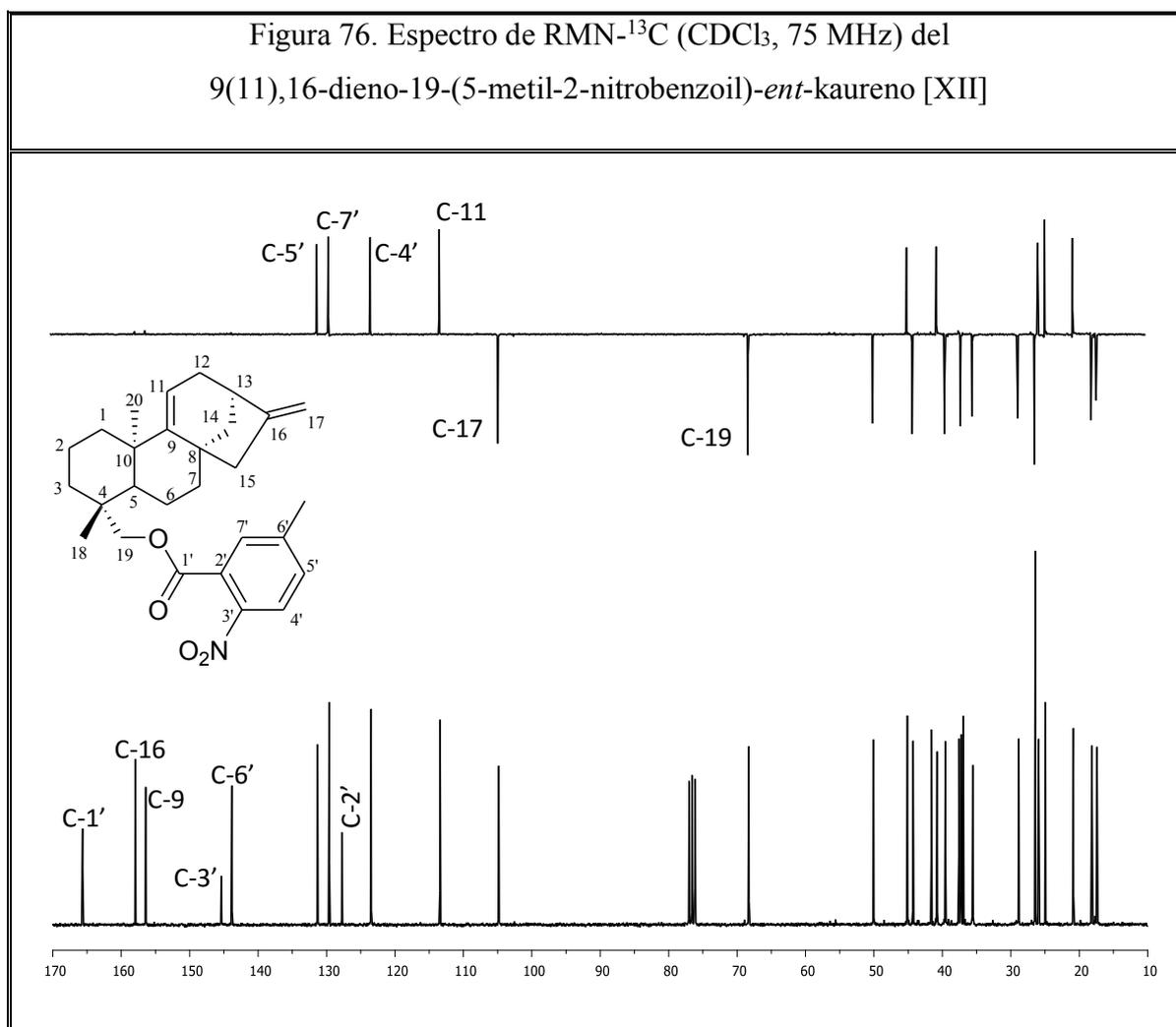


Tabla 29. Desplazamientos Químicos (δ) en los Espectros de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 300 y 75 MHz), del fragmento que corresponde al 5-metil-2-nitrobenzoato del éster [XII]							
H	H-4'	H-5'	H-7'	-CH ₃ (C-6')			
δ_{H} (ppm)	7,80	7,38	7,47	2,45			
M	<i>d</i>	<i>dd</i>	<i>s(ancho)</i>	<i>s</i>			
<i>J</i> (Hz)	8,3	8,3 y 1,1	-	-			
C	C-1'	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'	C-6'	C-7'
δ_{C} (ppm)	165,5	127,7	145,3	123,4	131,1	143,7	129,5
Tipo	-O-C=O	=C<	=C-NO ₂	=CH	=CH	=C<	=CH

4. El análisis del espectro HMBC (Fig. 78) presenta las correlaciones donde destaca la presencia de los protones H-19a (δ_{H} : 4,57 ppm) y H-19b (δ_{H} : 4,27 ppm) con el carbono cuaternario del grupo carbonilo señalado como C-1' (δ_{C} : 165,5 ppm) de este modo se confirma la unión del diterpeno *ent*-kaureno con el ácido 5-metil-2-nitrobenzoico, por otra parte estos protones metínicos H-19 se correlacionan con el carbono vecino C-18 (δ_{C} : 26,37 ppm) y a tres enlaces con el carbono metilénico C-3 (δ_{C} : 165,5 ppm). De acuerdo con lo anteriormente expuesto quedó claro que el producto obtenido de la reacción se trata del nuevo derivado denominado como 9(11),16-dien-19-(5-metil-2-nitrobenzoil)-*ent*-kaureno [XII], es importante resaltar que es el primer reporte que se tiene en relación a este compuesto.

Figura 77. Correlación del espectro HMBC (CDCl_3 , 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(5-metil-2-nitrobenzoil)-*ent*-kaureno [XII]

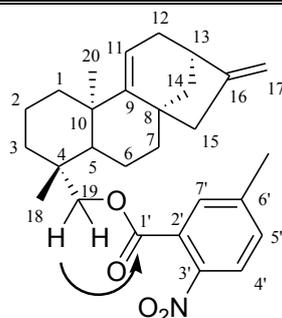
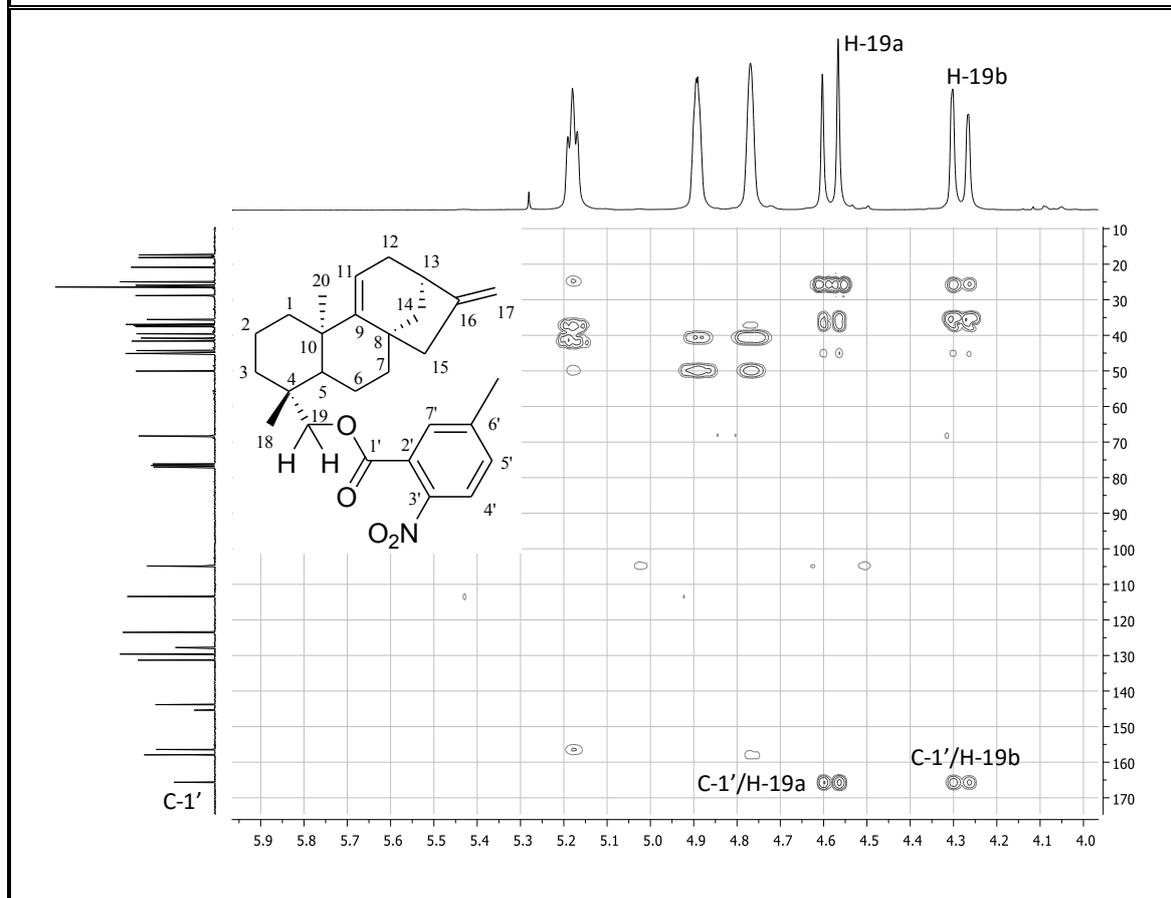
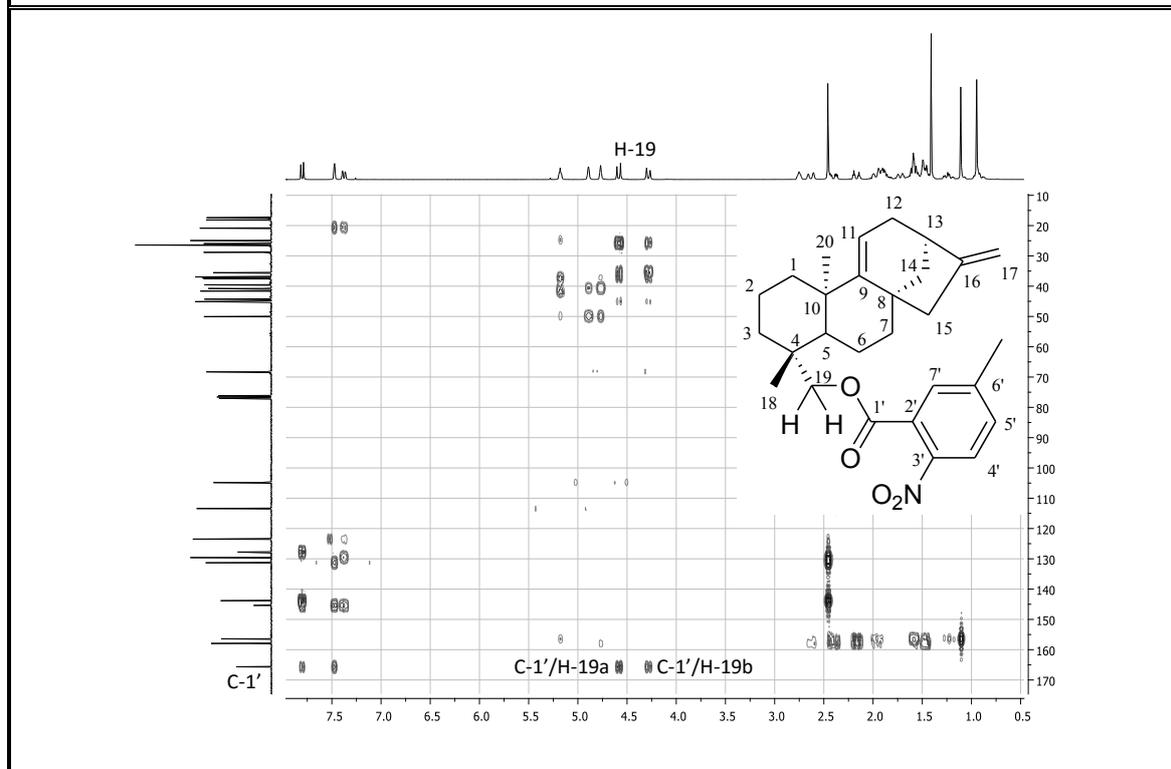
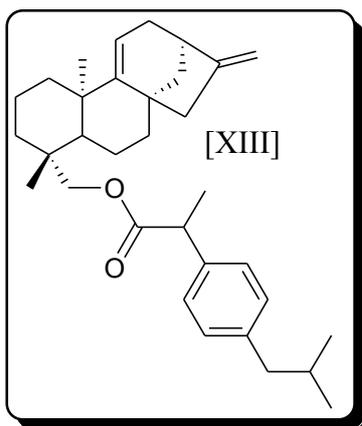


Figura 78. Espectro de HMBC (CDCl₃, 75 MHz) del
9(11),16-dieno-19-(5-metil-2-nitrobenzoil)-*ent*-kaureno [XII]



V.3.11 9(11),16-dieno-18-[2-(4-isobutilfenil)propil]-*ent*-kaureno [XIII]



$C_{33}H_{46}O_2$

PM= 474 g/mol

Aspecto: oleoso incoloro

Rendimiento= 74 mg (89 %)

El resultado de la reacción entre el alcohol *ent*-kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II] con el ácido (R,S)-2-(4-isobutilfenil)propanoico (ibuprofeno®) bajo las condiciones de reacción descritas en el procedimiento general VI.2.2, fue un residuo oleoso incoloro (149 mg) purificado por cromatografía de columna con silica gel (ciclohexano), eluida con ciclohexano/AcOEt (90:10), obteniendo 74 mg del compuesto [XIII] con un rendimiento del 89 %. El análisis de los espectros de IR (Fig. 79, Tabla 30), RMN-¹H (Fig. 80, Tabla 31), RMN-¹³C y DEPT (Fig. 81, Tabla 31), resultó congruente con la fórmula molecular $C_{33}H_{46}O_2$, dicha fórmula corresponde a un compuesto de once insaturaciones, una de las cuales evidencia la presencia de un grupo carbonilo característico en los ésteres como lo muestra el espectro de IR, en la banda ν_{\max} : 1731 cm^{-1} . Esta información se confirma al comparar sus espectros con el alcohol de partida [II], observando algunos cambios que corroboran la formación del éster [XIII] con un anillo aromático 1,4 disustituido, las cuales se describen a continuación:

1. En el espectro IR (Fig. 79, Tabla 30) resalta una banda intensa típica del grupo carbonilo de la función éster a 1731 cm^{-1} la cual se corrobora con la correspondiente vibración de tensión del enlace C-O a 1132 cm^{-1} , además la desaparición de la banda ancha del enlace OH del compuesto de partida [II] ratifica lo expuesto anteriormente. La presencia del anillo aromático se confirma por las bandas de tensión -C=C- a 1600 cm^{-1} – 1412 cm^{-1} características del anillo bencénico. Las vibraciones junto con los sobretonos y bandas de combinación entre 2000 y 1667 cm^{-1} indican la presencia de un compuesto

aromático disustituido en posición *para* que se constata con la vibración de flexión fuera del plano =C-H a 800 cm⁻¹.

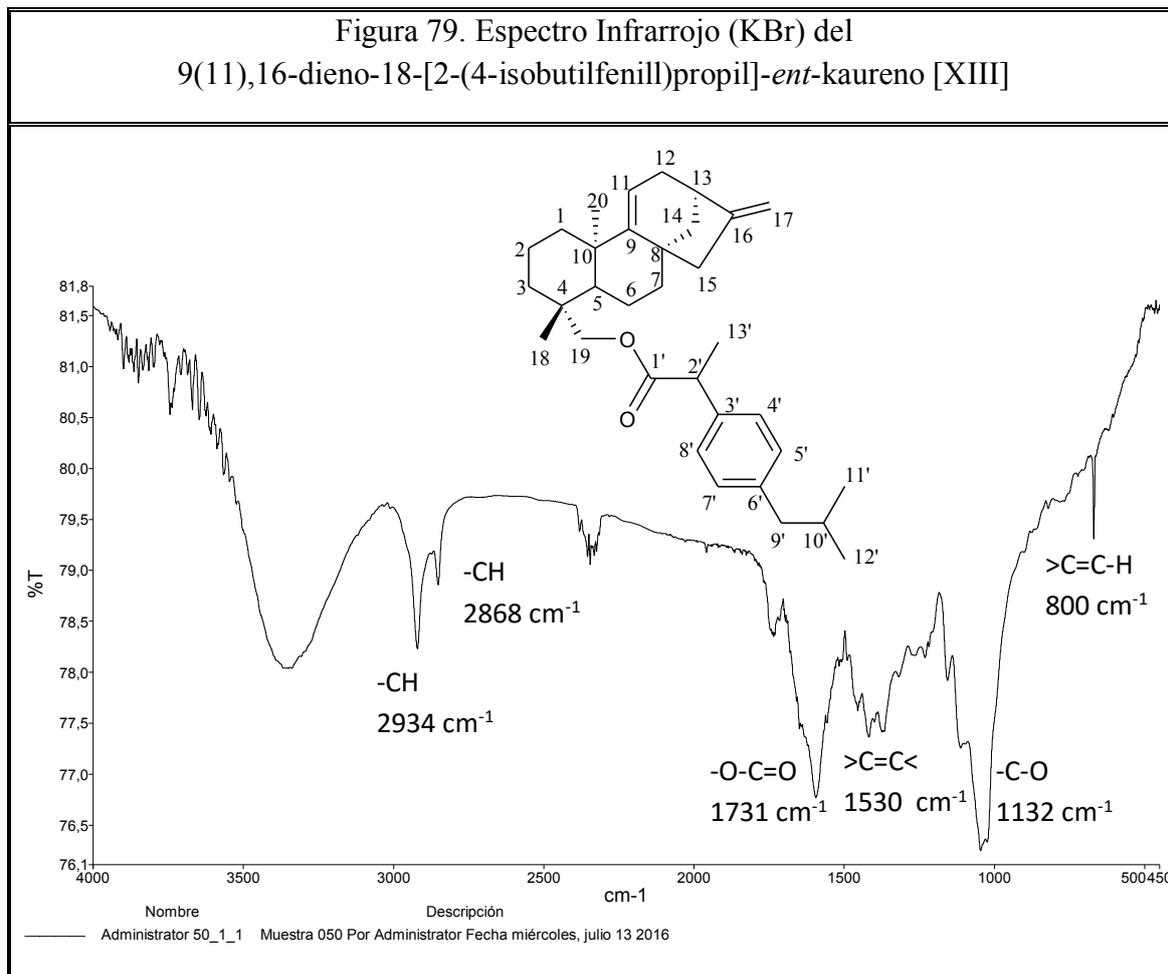
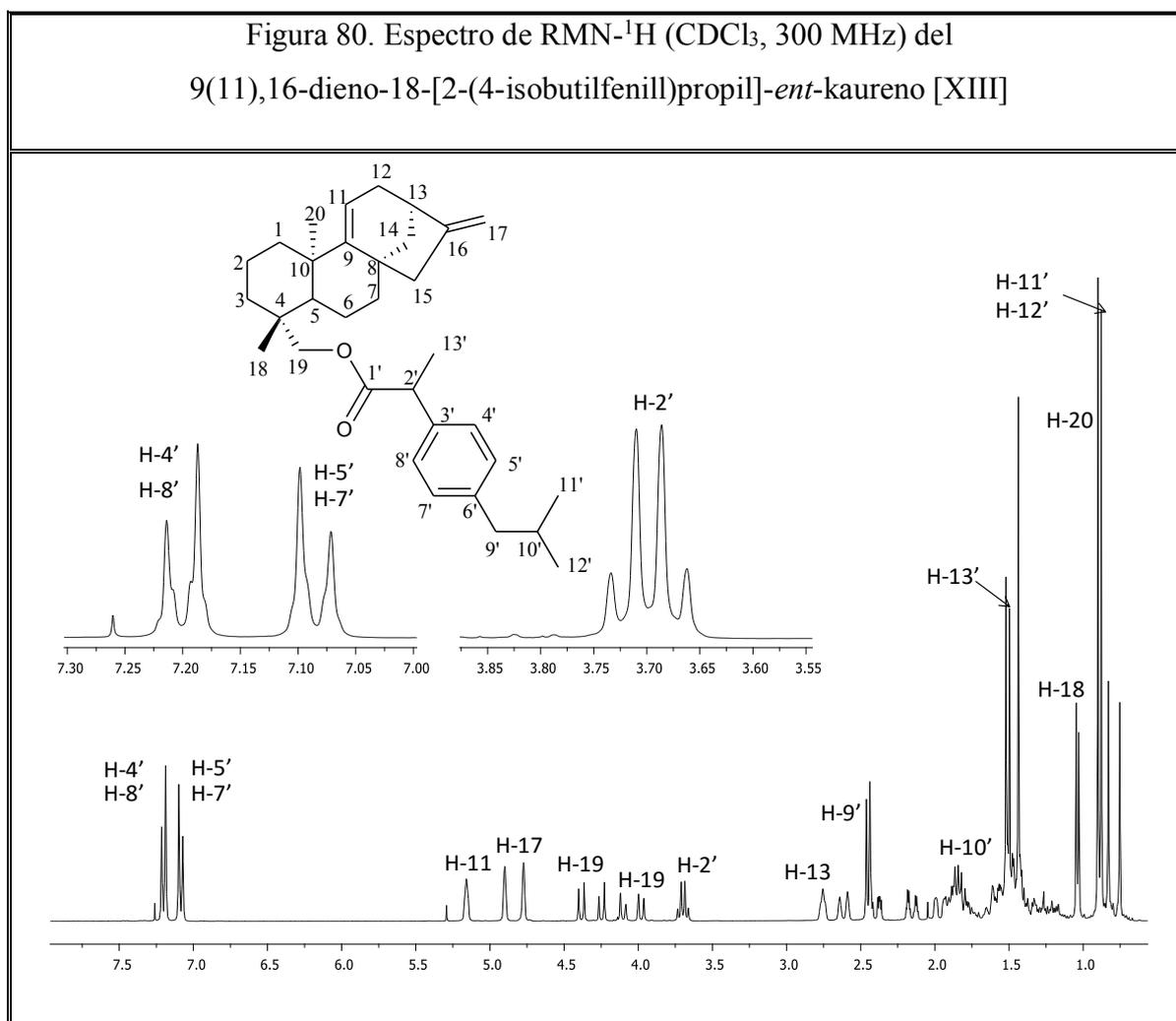


Tabla 30. Bandas de absorción en el espectro IR del
9(11),16-dieno-18-[2-(4-isobutilfenil)propil]-*ent*-kaureno [XIII]

ν máx (cm ⁻¹)	2934	2868	1731	1530	1132	800
Asignación	-CH	-CH	-O-C=O	>C=C<	-C-O	>C=C-H

2. En su espectro de RMN⁻¹H (Fig. 80, Tabla 31) es importante resaltar el la aparición de dos dobletes correspondientes a los protones H-19 de los isómeros R y S del compuesto [XIII] (δ_H : 4,38 ppm H-19a, *d*, 1 H, *J*: 11 Hz; δ_H : 4,11 ppm H-19a, *d*, 1 H, *J*: 11 Hz y δ_H : 4,25 ppm H-19b, *d*, 1 H, *J*: 11 Hz; δ_H : 3,98 ppm

H-19b, *d*; 1 H, *J*: 11 Hz) los cuales se encuentran desplazados a campo más bajo debido al efecto desapantallante del carbonilo del éster en comparación con la señal asignada a los hidrógenos del oximetileno H-19 en el alcohol de partida [II] (δ_{H} : 3,85 ppm H-19a y δ_{H} : 3,59 ppm H-19b, *d J*: 10,9 Hz), además se observan dos nuevas señales correspondientes a los protones del anillo aromático a δ_{H} : 7,20 ppm (H-4', H-8') [dobletes, 2H, (*J*: 8,1 Hz)] y δ_{H} : 7,08 ppm (H-5', H-7') [dobletes, 2H, (*J*: 8,1 Hz)], indicando que se trata de un anillo bencénico 1,4-disustituido. A campo alto observamos las señales correspondientes a H-2' (δ_{H} : 3,70 ppm, *q*, 1 H, *J*: 7,2 Hz); H-9' (δ_{H} : 2,42 ppm, *d*, 2 H, *J*: 7,2 Hz), H-10' (δ_{H} : 1,84 ppm, *m*, 1 H), finalmente los metilos correspondientes a H-11'-H-12' (δ_{H} : 0,88 ppm, *s*, 6 H), H-13' (δ_{H} : 1,50 ppm, *s*, 3 H) y los H-18 (δ_{H} : 1,05 ppm, *s*, 3 H), H-20 (δ_{H} : 0,9 ppm, *s*, 3 H), pertenecientes al grupo *ent*-kaureno.



3. La existencia en el espectro de RMN-¹³C (Fig. 81, Tabla 31) de un pico a δ_c : 175 ppm se atribuye a un carbono carbonílico propio de ésteres, que asociado a la diferencia de desplazamiento químico en la posición del pico asignado al C-19 en el alcohol de partida [II] (δ_c : 64,64) versus el producto de reacción 9(11),16-dieno-18-[2-(4-isobutilfenil)propil]-*ent*-kaureno [XIII] (δ_c : 66,7 ppm) valida la formación del grupo funcional éster. La detección de dos nuevas señales a δ_c : 127,3 ppm (CH, C-4', C-8') y δ_c : 129,4 ppm (CH, C-5', C-7') nos permite confirmar que el anillo aromático que forma parte del compuesto [XIII] se encuentra disustituido en posiciones 1,4 adicionalmente encontramos a δ_c : 137,8 ppm (CH, C-3') y δ_c : 140,5 ppm (CH, C-6') las señales que completan los carbonos que conforman el anillo bencénico; esta información se complementa con las señales de los carbonos alifáticos C-2' (δ_c : 45,6 ppm, CH), C-9' (δ_c : 45,1 ppm, CH₂), C-10' (δ_c : 30,5 ppm, CH), C-11'-C-12' (δ_c : 22,6 ppm, CH₃) y C-13' (δ_c : 18,1 ppm, CH₃) evidenciando la formación del producto [XIII].

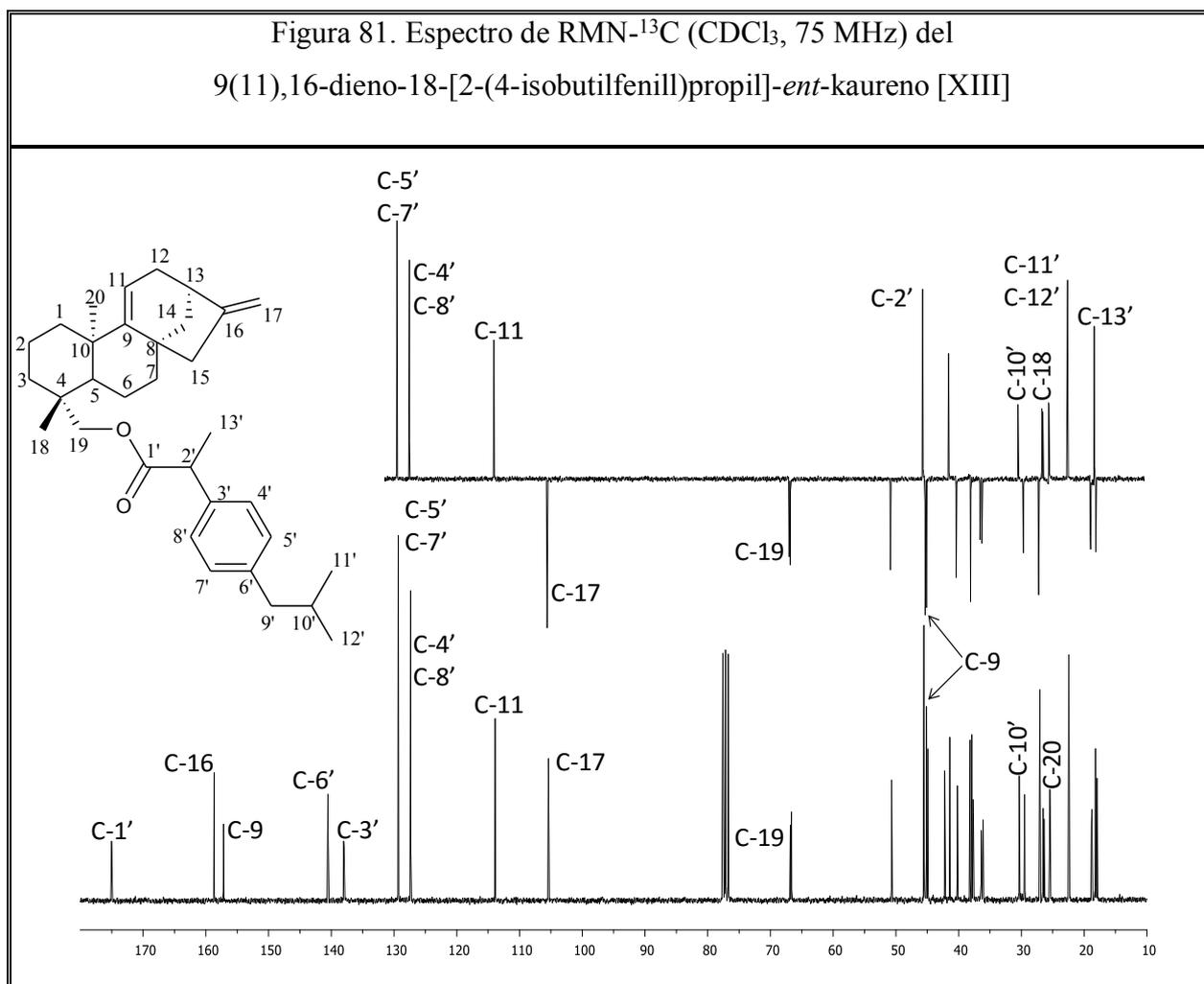
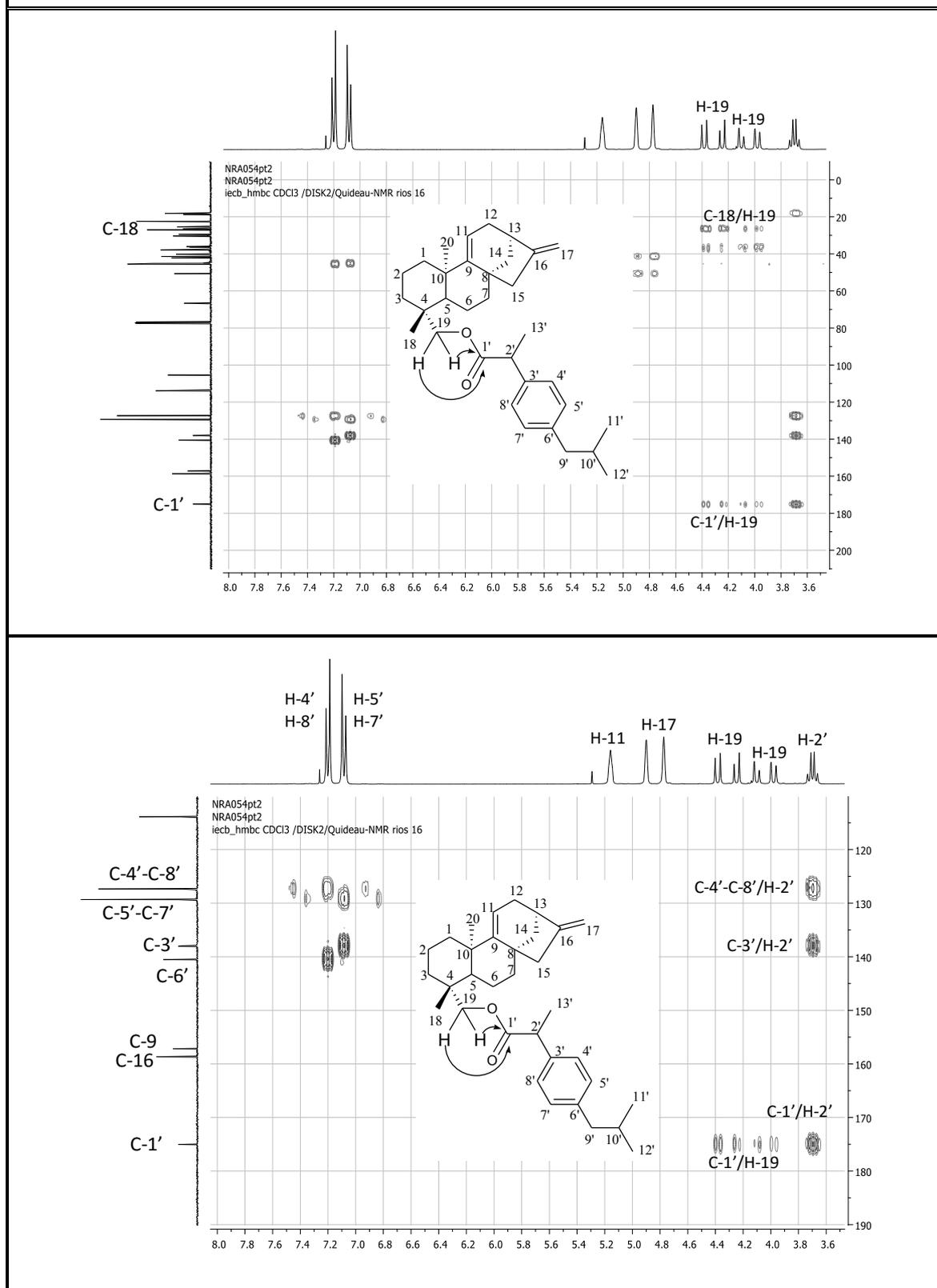


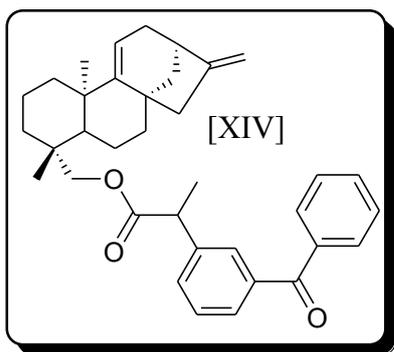
Tabla 31. Desplazamientos Químicos (δ) en los Espectros de RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 300 y 75 MHz), del fragmento que corresponde al 2-(4-isobutilfenil)propanoato del éster [XIII]							
H	H-2'	H-4' (H-8')	H-5' (H-7')	H-9'	H-10'	H-11' (H-12')	H-13'
δ_H (ppm)	3,70	7,20	7,08	2,45	1,84	0,88	1,50
M	<i>q</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>m</i>	<i>s</i>	<i>s</i>
<i>J</i> (Hz)	7,2	8,1	8,1	7,2	-	-	-
C	C-1'	C-2'	C-3'	C-4' (C-8')	C-5' (C-7')	C-6'	C-9'
δ_C (ppm)	175,0	45,6	137,8	127,3	129,4	140,5	45,1
Tipo	-O-C=O	>CH-	=C<	=CH	=CH	=C<	-CH ₂ -
C	C-10'	C-11' (C-12')		C-13'			
δ_C (ppm)	30,55	22,6		18,1			
Tipo	>CH	>C<		>C<			

4. El análisis del espectro HMBC (Fig. 82) presenta las correlaciones donde destaca la presencia de los protones H-19 (δ_H : 4,38 ppm H-19a, *d*, 1 H, *J*: 11 Hz; δ_H : 4,11 ppm H-19a, *d*, 1 H, *J*: 11 Hz y δ_H : 4,25 ppm H-19b, *d*, 1 H, *J*: 11 Hz; δ_H : 3,98 ppm H-19b, *d*; 1 H, *J*: 11 Hz) con el carbono cuaternario del grupo carbonilo señalado como C-1' (δ_C : 175,0 ppm) de este modo se confirma la unión del diterpeno *ent*-kaureno con el ácido (R,S)-2-(4-isobutilfenil)propanoico, por otra parte los protones metínicos H-19 también se correlacionan con el carbono vecino C-18 (δ_C : 26,73 ppm), así mismo se observa la correlación a dos enlaces de este carbono cuaternario (C-1') con el protón H-2' (δ_H : 3,70 ppm, *q*, 1 H, *J*: 7,2 Hz), que a su vez se correlaciona con los carbonos C-3' (δ_C : 137,8 ppm) y C-13' (δ_C : 18,1 ppm). De acuerdo con lo anteriormente expuesto quedó claro que el producto obtenido de la reacción se trata del nuevo derivado denominado como 9(11),16-dieno-18-[2-(4-isobutilfenil)propil]-*ent*-kaureno [XIII], es importante resaltar que es el primer reporte que se tiene en relación a este compuesto.

Figura 82. Espectro de HMBC (CDCl₃, 75 MHz) del
9(11),16-dieno-18-[2-(4-isobutilfenil)propil]-*ent*-kaureno [XIII]



VII.3.12 9(11),16-dieno-19-[2-(3-benzofenil)propil]-*ent*-kaureno [XIV]



$C_{36}H_{42}O_3$

PM= 522 g/mol

Aspecto: oleoso incoloro

Rendimiento= 160 mg (88 %)

El ácido 2-(3-benzofenil)propanoico, el EDCI y DMAP fueron suspendidos en CH_2Cl_2 bajo atmósfera de argón. Posteriormente, se adicionó el derivado *ent*-kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II] previamente disuelto en el mismo solvente y bajo las condiciones descritas en el apartado VI.2.2, la suspensión resultante se agitó por 12 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se logró obtener un residuo oleoso amarillo con un peso de 470 mg que fue purificado por cromatografía de columna con silica gel (ciclohexano), eluida con ciclohexano/AcOEt (90:10) para así obtener el compuesto XIV puro, que se presentó como un sólido oleoso incoloro con un peso de 160 mg y un porcentaje de rendimiento de 88 %. Los datos espectrales de este producto indican que se trata de otro diterpeno estructuralmente relacionado con el *ent*-kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II]. Su fórmula molecular, $C_{36}H_{42}O_3$, fue deducida a través de su espectro de RMN- 1H (Fig. 84; Tabla 33), RMN- ^{13}C (Fig. 85; Tabla 33) indicando que se trata de un compuesto con diez grados de insaturación más que el compuesto de partida [II]. En consecuencia, si se asume que la reacción de esterificación fue efectiva, es obvio que el compuesto XIV posee un doble enlace correspondiente al carbonilo del éster en vez del grupo alcohol, dicho compuesto fue caracterizado de la siguiente manera:

1. En el espectro IR (Fig. 83; Tabla 32) resalta dos bandas intensas típica del grupo carbonilo de la función éster a 1731 cm^{-1} y cetona aromática a 1660 cm^{-1} las cuales se corroboran con la correspondiente vibración de tensión del enlace C-O a 1177 cm^{-1} , además la desaparición de la banda ancha del enlace OH del compuesto de partida [II] ratifica lo expuesto anteriormente. La presencia del anillo aromático se confirma por las bandas de tensión $-C=C-$ a 1600 cm^{-1} –

1412 cm^{-1} características del anillo bencénico. Las vibraciones junto con los sobretonos y bandas de combinación entre 2000 y 1667 cm^{-1} indican la presencia de un compuesto aromático disustituido en posición *orto* que se constata con la vibración de flexión fuera del plano =C-H a 705 cm^{-1} y 722 cm^{-1} .

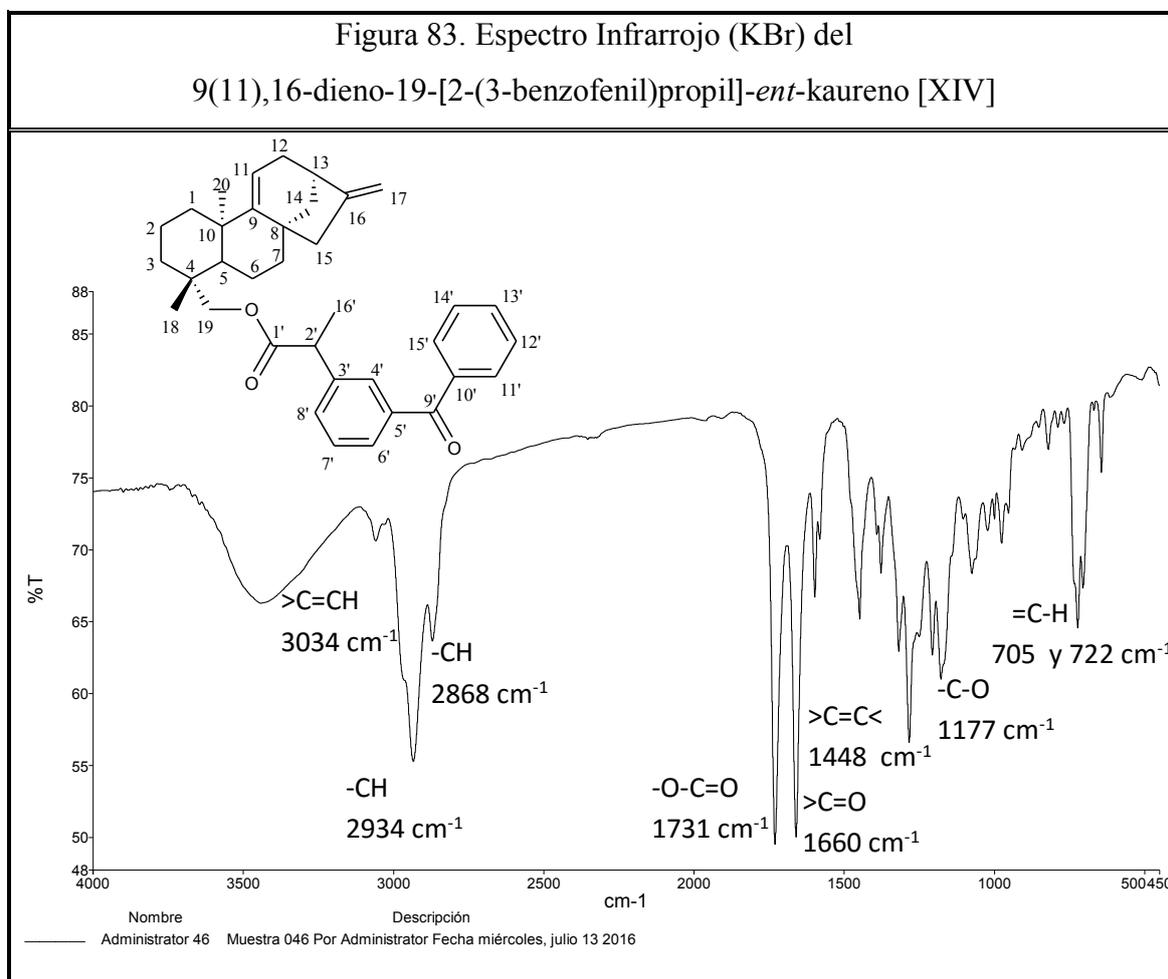
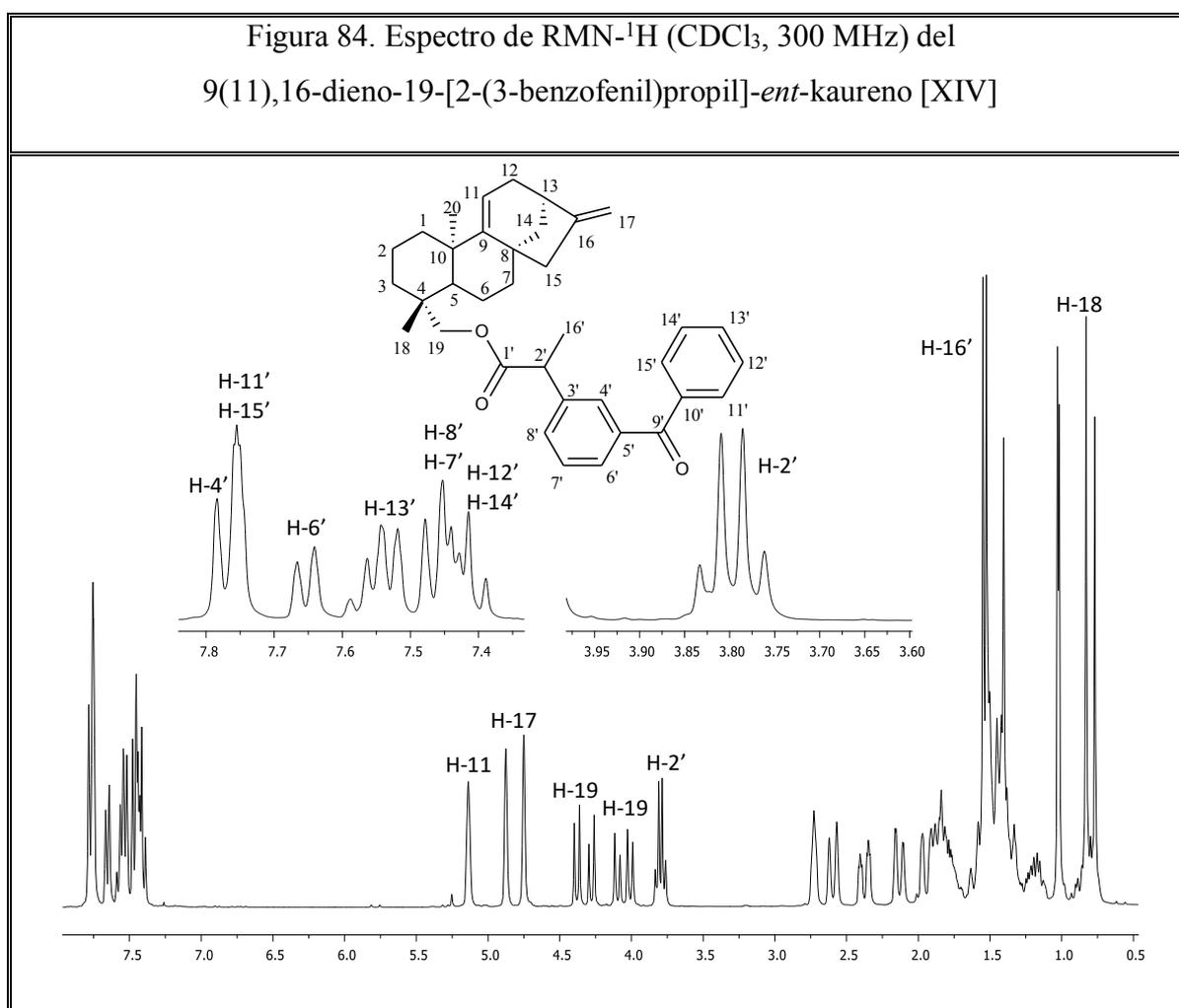


Tabla 32. Bandas de absorción en el espectro IR del
9(11),16-dieno-19-[2-(3-benzofenil)propil]-*ent*-kaureno [XIV]

ν máx (cm^{-1})	3034	2934	2868	1731	1660	1448	1177	705-722
Asignación	>C=CH	-CH	-CH	-O-C=O	>C=O	>C=C<	-C-O	=C-H

2. En su espectro de RMN- ^1H (Fig. 84, Tabla 33) es importante resaltar la aparición de dos dobletes correspondientes a los protones H-19 de los isómeros R y S del compuesto [XIII] (δ_{H} : 4,38 ppm H-19a, *d*, 1 H, *J*: 11 Hz; δ_{H} : 4,10 ppm

H-19a, *d*, 1 H, *J*: 11 Hz y δ_{H} : 4,28 ppm H-19b, *d*, 1 H, *J*: 11 Hz; δ_{H} : 4,01 ppm H-19b, *d*; 1 H, *J*: 11 Hz) los cuales se encuentran desplazados a campo más bajo debido al efecto desapantallante del carbonilo del éster en comparación con la señal asignada a los hidrógenos del oximetileno H-19 en el alcohol de partida [II] (δ_{H} : 3,85 ppm H-19a y δ_{H} : 3,59 ppm H-19b, *d*, *J*: 10,9 Hz), además se observan seis señales correspondientes a los protones de los anillos aromáticos a δ_{H} : 7,78 ppm (H-4', 1 H, *s*), δ_{H} : 7,65 ppm (H-6', 1 H, *d*, *J*: 7,6 Hz), δ_{H} : 7,45 ppm (H-7', 1 H, *m*), δ_{H} : 7,47 ppm (H-8', 1 H, *d*, *J*: 4,0 Hz), δ_{H} : 7,75 ppm (H-11', H-15', 2 H, *m*) y δ_{H} : 7,41 ppm (H-12', H-14', 2 H, *t*, *J*: 5,9 Hz), finalmente a campo alto observamos las señales correspondientes a H-2' (δ_{H} : 3,87 ppm, *m*, 1 H) y H-16' (δ_{H} : 1,55 ppm, *s*, 3 H).



- La existencia en el espectro de RMN-¹³C (Fig. 85, Tabla 33) de un pico a δ_{C} : 174 ppm se atribuye a un carbono carbonílico propio de ésteres, que asociado a la

diferencia de desplazamiento químico en la posición del pico asignado al C-19 en el alcohol de partida [II] (δ_c : 64,64) versus el producto de reacción (R,S) 9(11),16-dieno-19-[2-(3-benzofenil)propil]-*ent*-kaureno [XIV] (δ_c : 66,76 ppm) valida la formación del grupo funcional éster, también destaca la señal a δ_c : 196 ppm correspondiente al carbono carbonílico de la cetona aromática. La detección de nuevas señales de carbonos cuaternarios a δ_c : 137,6 ppm (=C<, C-3'), δ_c : 140,7 ppm (=C<, C-5') y δ_c : 137,1 ppm (=C<, C-10'), en conjunto con las señales características de carbonos metínicos (=C-H) [δ_c : 137,1 ppm (C-4'), δ_c : 128,5 ppm (C-6'), δ_c : 128,8 ppm (C-7'), δ_c : 132,1 ppm (C-8'), δ_c : 130,0 ppm (C-11'-C-15'), δ_c : 128,3 ppm (C-12'-C-14')] nos permite confirmar que se encuentran dos anillos aromáticos que forma parte del compuesto [XIV] de los cuales uno se encuentra disustituido en posición 1,2 y el otro monosustituido. Adicionalmente encontramos dos nuevas señales atribuibles a los carbonos alifáticos C-2' (δ_c : 45,25 ppm, >CH-) y C-16' (δ_c : 18,14 ppm, -CH₃), evidenciando la formación del producto [XIV].

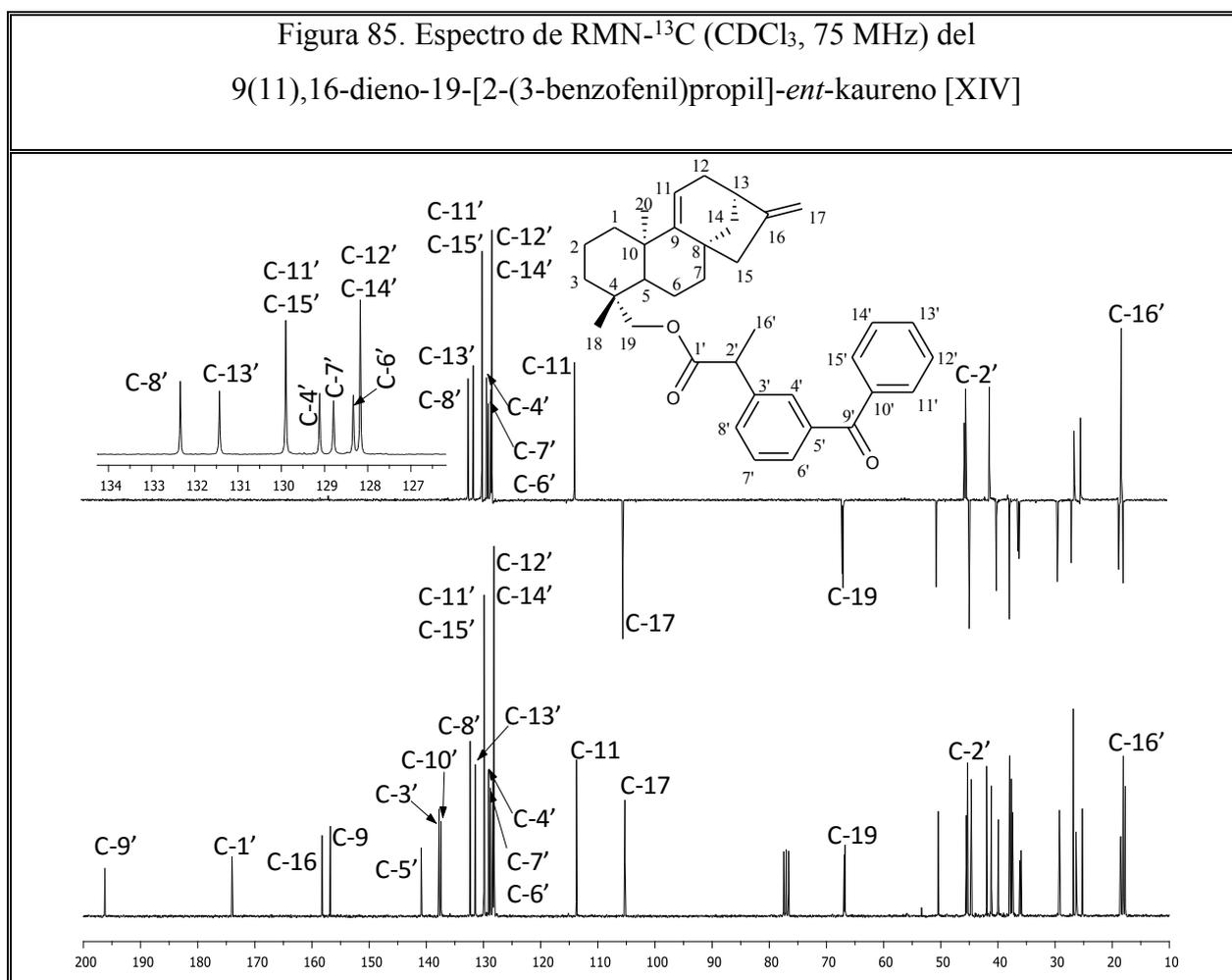


Tabla 33. Desplazamientos Químicos (δ) en los Espectros de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 300 y 75 MHz), del fragmento que corresponde al 2-(3-benzoilfenil)propanoato del éster [XIV]									
H	H-2'	H-4'	H-6'	H-7'	H-8'	H-11' (H-15')	H-12' (H-14')	H-13'	H-16'
δ_{H} (ppm)	3,87	7,78	7,65	7,45	7,47	7,75	7,41	7,54	1,55
M	<i>m</i>	<i>s</i>	<i>d</i>	<i>m</i>	<i>d</i>	<i>m</i>	<i>t</i>	<i>m</i>	<i>s</i>
<i>J</i> (Hz)	-	-	7,6	-	4,0	-	5,9	-	-
C	C-1'	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'	C-6'	C-7'		
δ_{C} (ppm)	174,01	45,25	137,6	128,9	140,7	128,3	128,8		
tipo	-O-C=O	>CH-	=C<	=CH	=C<	=CH	=CH		
C	C-8'	C-9'	C-10'	C-11' (C-15')	C-12' (C-14')	C-13'	C-16'		
δ_{C} (ppm)	132,1	196,4	137,1	130,0	128,3	131,1	18,14		
Tipo	=CH	>C=O	=C<	=CH	=CH	=CH	>C<		

4. El análisis del espectro HMBC (Fig. 87) presenta las correlaciones donde destaca la presencia de los protones H-19 (δ_{H} : 4,38 ppm H-19a, *d*, 1 H, *J*: 11 Hz; δ_{H} : 4,10 ppm H-19a, *d*, 1 H, *J*: 11 Hz y δ_{H} : 4,28 ppm H-19b, *d*, 1 H, *J*: 11 Hz; δ_{H} : 4,01 ppm H-19b, *d*; 1 H, *J*: 11 Hz) con el carbono cuaternario del grupo carbonilo señalado como C-1' (δ_{C} : 174,0 ppm) de este modo se confirma la unión del diterpeno *ent*-kaureno con el ácido (R,S) 2-(3-benzoilfenil)propanoico, así mismo se observa la correlación a dos enlaces de este carbono cuaternario (C-1') con el protón H-2' (δ_{H} : 3,87 ppm, *m*, 1 H) que a su vez se correlaciona con el carbono C-16' (δ_{C} : 18,14 ppm) y C-3' (δ_{C} : 137,6 ppm). También se observan las correlaciones entre el carbono C-9' (δ_{C} : 196 ppm) con los protones H-4' (δ_{H} : 7,78 ppm, *s*, 1 H), H-6' (δ_{H} : 7,65 ppm, *d*, 1 H, *J*: 7,6 Hz) y H-11'-H-15' (δ_{H} : 7,75

ppm, *m*, 1 H). De acuerdo con lo anteriormente expuesto quedó claro que el producto obtenido de la reacción se trata del nuevo derivado denominado como, 9(11),16-dieno-19-[2-(3-benzofenil)propil]-*ent*-kaureno [XIV], es importante resaltar que es el primer reporte que se tiene en relación a este compuesto.

Figura 86. Correlación del espectro HMBC (CDCl_3 , 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-[2-(3-benzofenil)propil]-*ent*-kaureno [XIV]

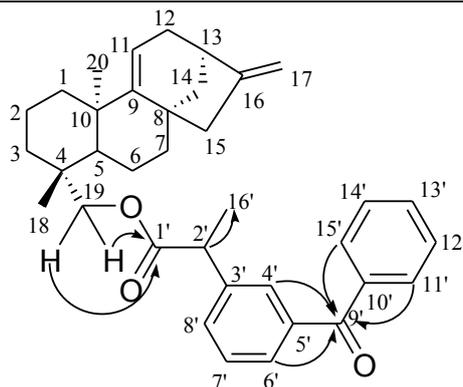
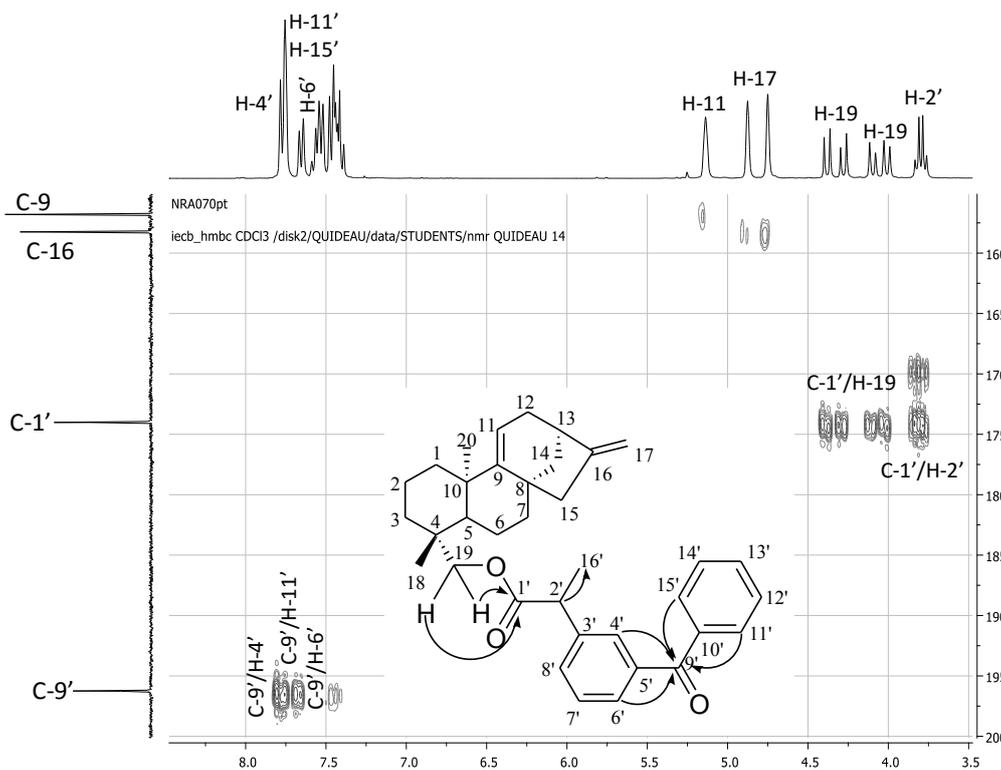
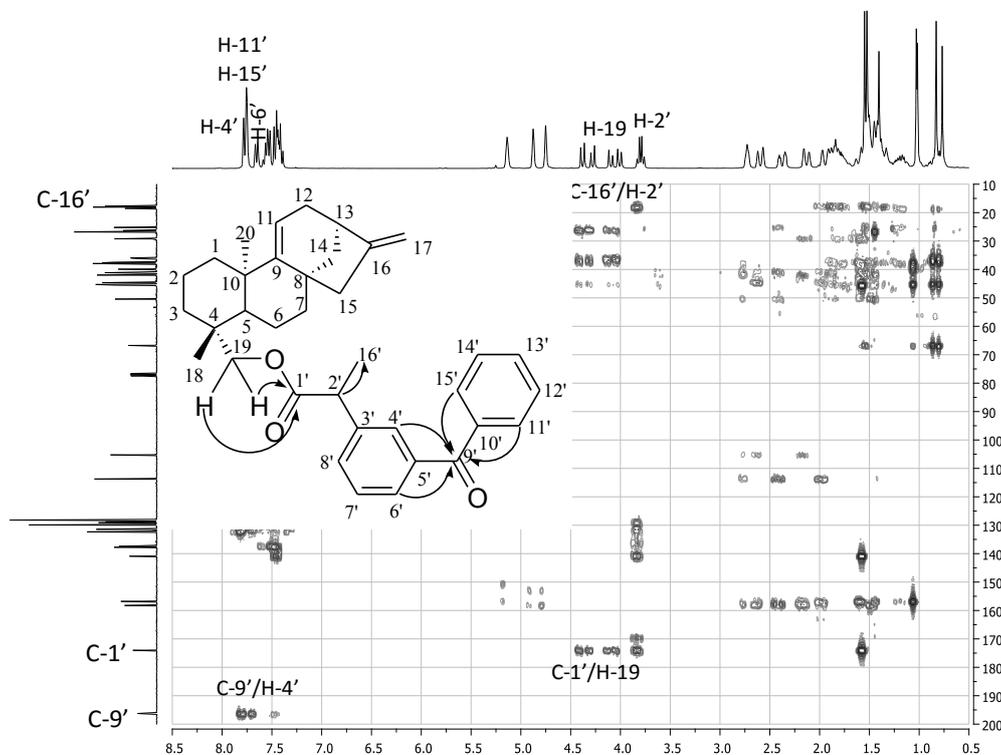
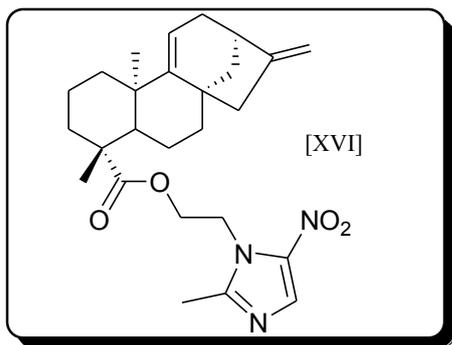


Figura 87. Espectro de HMBC (CDCl₃, 75 MHz) del
9(11),16-dieno-19-[2-(3-benzofenil)propil]-*ent*-kaureno [XIV]



VII.3.13 9(11),16-dieno-19-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil-*ent*-kaureno [XVI]



$C_{34}H_{35}O_4N_3$

PM= 549 g/mol, PF= 135-139 °C

Aspecto: sólido cristalino amarillo

Redimiento= 145 mg (78 %)

El ácido grandiflorénico [I] se sometió a la reacción de esterificación con el 2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil metanosulfonato [XV] (Ver condiciones de reacción descritas en el procedimiento general VI.2.3), de este proceso se logró obtener un sólido cristalino amarillo con un peso de 199 mg, que seguidamente se procedió a purificar por cromatografía de columna con silica gel (ciclohexano), eluida con ciclohexano/AcOEt (40:60), para obtener el compuesto denominado 9(11),16-dieno-19-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil-*ent*-kaureno [XVI], como un sólido cristalino amarillo y porcentaje de rendimiento igual a 78 %, además registró un punto de fusión entre 135-139 °C.

Se confirmó que el compuesto [XVI] presentaba la siguiente fórmula molecular $C_{34}H_{35}O_4N_3$ y al examinar los análisis espectroscópicos obtenidos de IR (Fig. 88, Tabla 34), RMN- 1H (Fig. 89, Tabla 35), RMN- ^{13}C y DEPT-135 (Fig. 90, Tabla 35), RMN-HMQC (Fig. 91) y RMN-HMBC (Fig. 92) permitió confirmar que la sustancia se trataba del compuesto denominado 9(11),16-dieno-19-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil-*ent*-kaureno. El esqueleto del derivado XVI, fue caracterizado de la siguiente manera:

1. En el espectro IR (Fig. 88, Tabla 34) se observa la banda de absorción atribuible al enlace C=CH (ν_{max} : 3020 cm^{-1}); además resalta una banda intensa a ν_{max} : 1724 cm^{-1} indicando la presencia del grupo carbonilo (C=O) de la función éster, la cual se confirma con la vibración de tensión del enlace C-O a ν_{max} : 1190 cm^{-1} , también se evidencia una débil señal que certifica la vibración de tensión del enlace C=C a ν_{max} : 1670 cm^{-1} , finalmente se refleja en el espectro las bandas correspondientes al grupo $-NO_2$ ν_{max} : 1531 cm^{-1} y 1362 cm^{-1} , además de la vibración de tensión debida al enlace C-N alifático a ν_{max} : 1427.

Figura 88. Espectro Infrarrojo (KBr) del 9(11),16-dieno-19-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil-*ent*-kaureno [XVI]

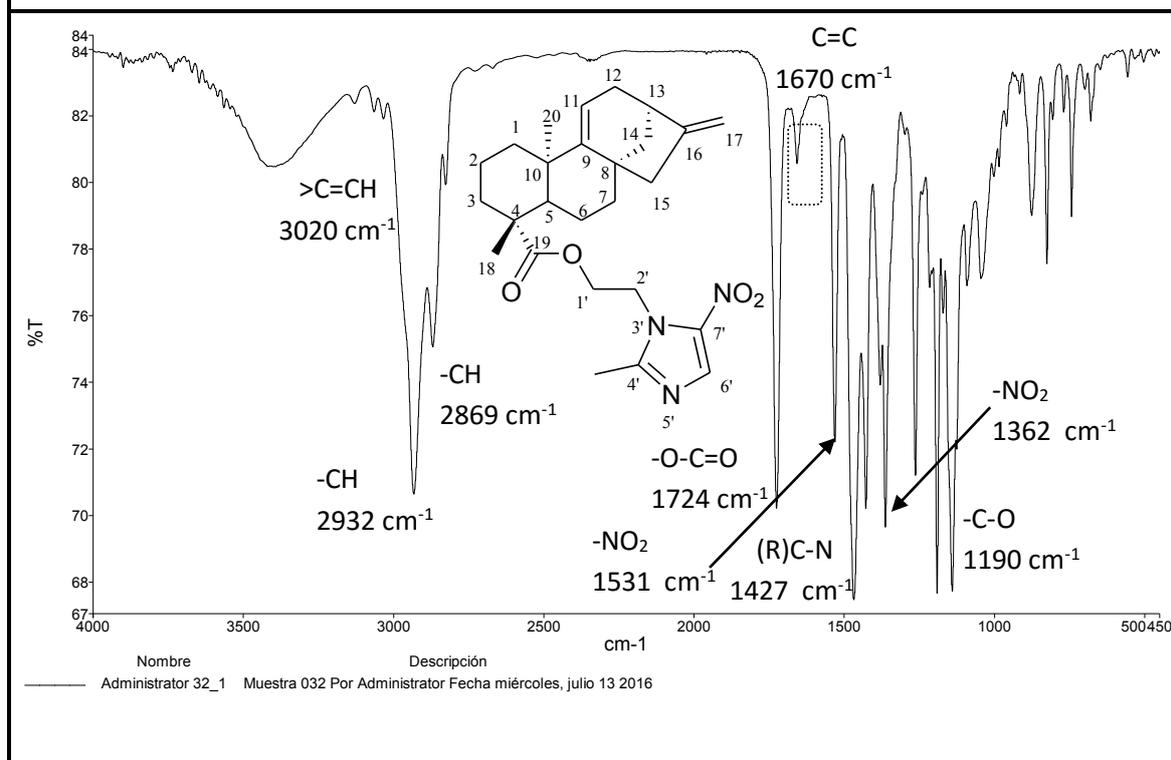
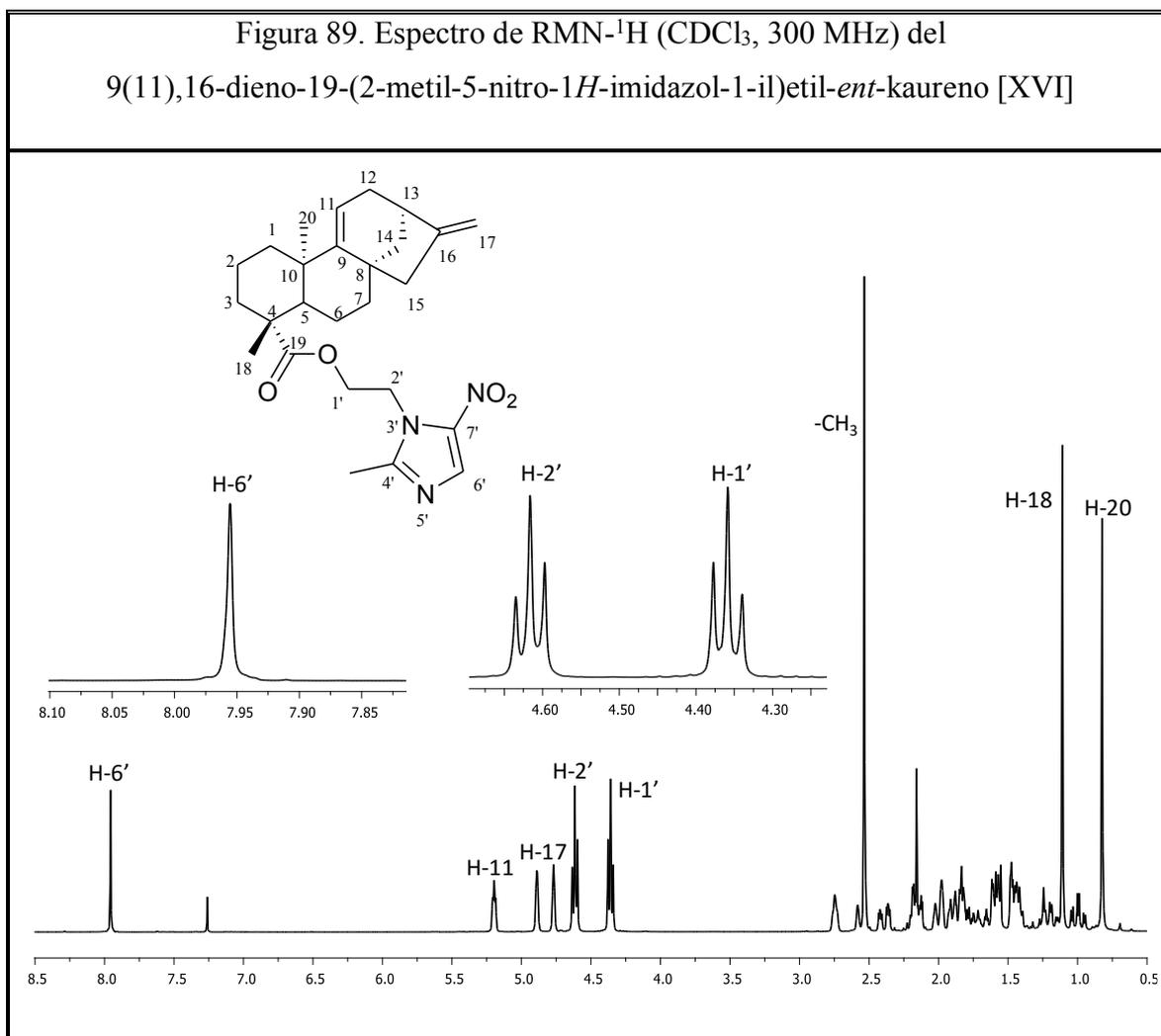


Tabla 34. Bandas de absorción en el espectro IR del 9(11),16-dieno-19-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil-*ent*-kaureno [XVI]

ν máx (cm ⁻¹)	3020	2932	2869	1724	1670	1531-1362	1190
Asignación	>C=CH	-CH	-CH	-O-C=O	C=C	-NO ₂	-C-O

2. En su espectro de RMN-¹H (Fig. 89, Tabla 35) se distingue principalmente la señal a campo bajo que integra para un protón metínico que se encuentra unido en la posición 6' del anillo imidazólico a δ_H : 7,99 ppm (H-6', =CH, 1H, *s*), seguidamente se observa un singlete ancho a δ_H : 5,20 ppm (H-11, =CH, 1H, *s[a]*) asignado para un doble enlace trisustituido, el cual se encuentra acoplado a un metileno H-12 (δ_H : 2,42 ppm, CH₂, 2H, *dd*, *J*: 4,5-2,7 Hz). Así mismo se aprecia un par de singletes anchos a δ_H : 4,89 ppm (H-17a, =CH₂, 1H, *s[a]*) y δ_H : 4,77 ppm (H-17b, =CH₂, 1H, *s[a]*) propios de los protones de un doble enlace metilénico. Finalmente el espectro muestra dos tripletes a δ_H : 4,39 ppm (H-1', CH₂, 2H, *t*, *J*: 5,6 Hz) y δ_H : 4,65 ppm (H-2', CH₂, 2H, *t*, *J*: 5,7 Hz)

correspondientes a los metilenos que forman parte del 2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etilmetanosulfonato [XV] que reaccionó con el ácido grandiflorónico [I], y no podemos dejar de mencionar el singlete a campo alto correspondiente al metilo ubicado en la posición 4' del anillo imidazol (δ_H : 2,57 ppm, -CH₃, 3H, *s*).



- En el espectro RMN-¹³C (Fig. 90, Tabla 35) se confirma la presencia de treinta y cuatro carbonos, los cuales fueron discriminados según su orientación en el DEPT-135, se puede destacar la presencia de un carbonilo del grupo éster a δ_c : 177,19 ppm (C-19, -CO₂-R), de un doble enlace metilénico δ_c : 158,45 ppm (C-16, >C=) y δ_c : 105,85 ppm (C-17, =CH₂), un doble enlace trisustituido δ_c : 155,56 ppm (C-9, >C=) y δ_c : 115,29 ppm (C-11, =CH), así como dos grupos metilos (-CH₃) a δ_c : 28,28 ppm (C-18) y δ_c : 23,73 ppm (C-20) todas estas

señales son características del núcleo *ent*-kaureno. Además de estas señales se localizan otras nuevas correspondientes al anillo imidazol a δ c: 150,8 (=C<, C-4'); δ c: 133,4 (=CH, C-6'); δ c: 138,4 (=C<, C-7'), así como los dos metilenos (-CH₂) asignados como C-1' (δ c: 62,1 ppm) y C-2' (δ c: 44,9 ppm), además del metilo a δ c: 14,9 ppm [-CH₃, (C-4')] los cuales integran esta nueva parte de la molécula en la estructura del compuesto [XVI].

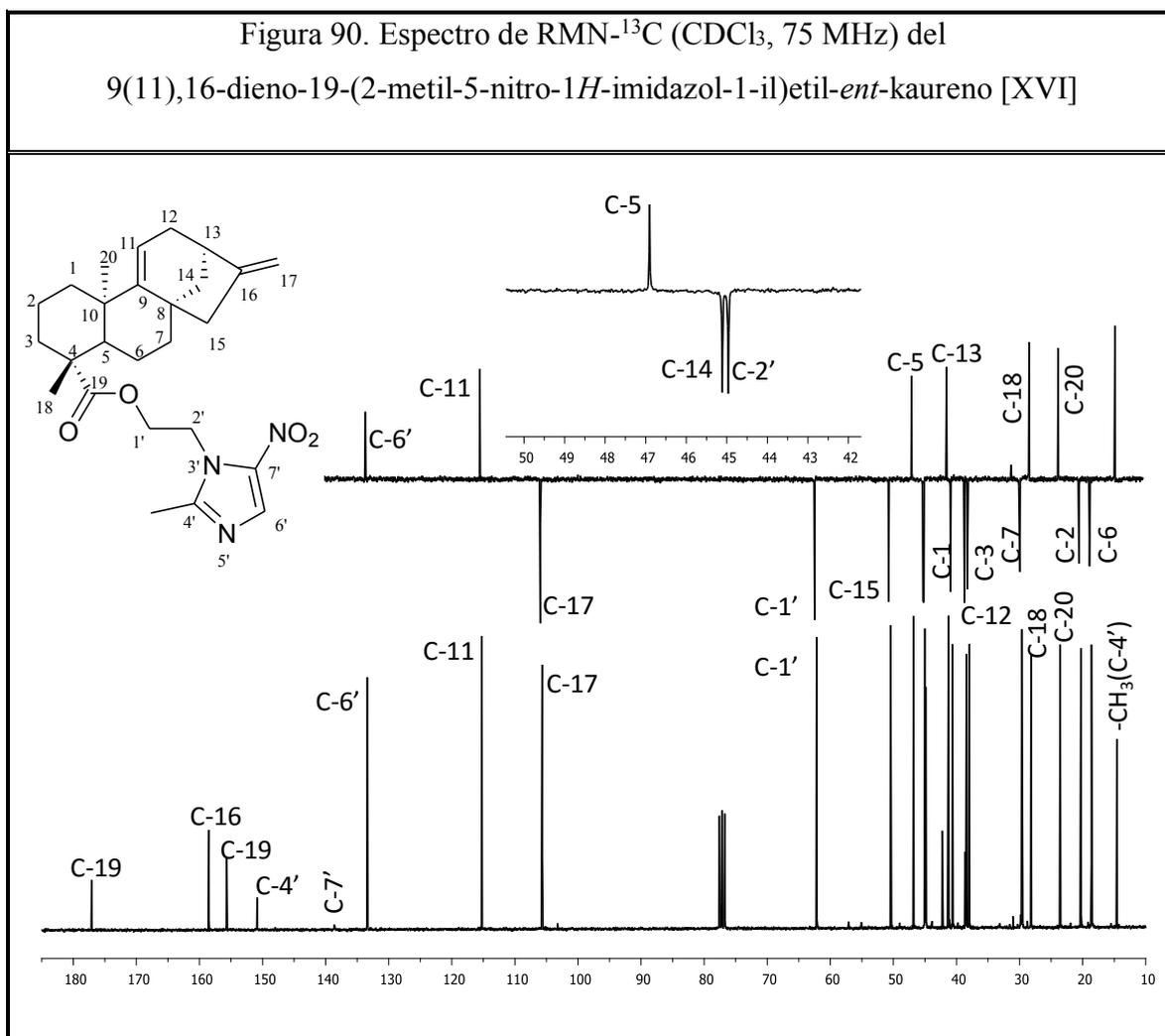
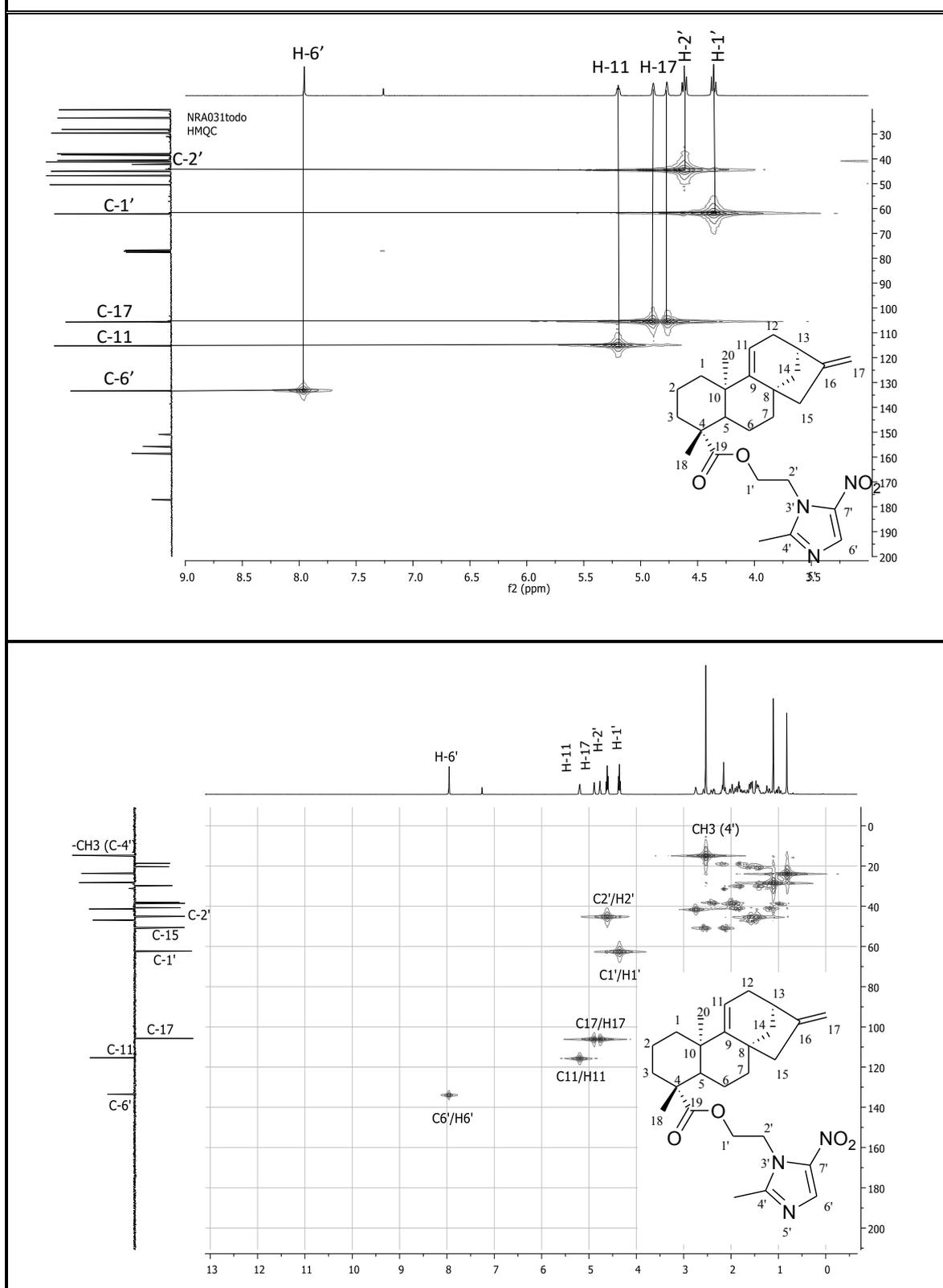


Tabla 35. Desplazamientos Químicos (δ) en los Espectros de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 300 MHz y 75 MHz), del fragmento que corresponde al (2-metil-5-nitro-1 <i>H</i> -imidazol-1-il)etil del éster [XVI]					
H	H-1'	H-2'	H-6'	-CH ₃ (C-4')	
δ_{H} (ppm)	4,39	4,65	7,99	2,57	
M	<i>t</i>	<i>t</i>	<i>s</i>	<i>s</i>	
<i>J</i> (Hz)	5,6	5,7	-	-	
C	C-1'	C-2'	C-4'	C-6'	C-7'
δ_{C} (ppm)	62,1	42,3	150,8	133,4	138,4
Tipo	-CH ₂ -	-CH ₂ -	=C<	=CH	=C<

4. En el espectro HMQC (Fig. 91) se pueden confirmar las correlaciones entre los protones H-11 (δ_{H} : 5,20 ppm, =CH, 1H, *s[a]*) y H-17 [(δ_{H} : 4,89 ppm, H-17a, =CH₂, 1H, *s[a]*) y δ_{H} : 4,77 ppm (H-17b, =CH₂, 1H, *s[a]*)] con sus respectivos carbonos metínicos [C-11 (δ_{C} : 115,29 ppm); C-17 (δ_{C} : 105,85 ppm)] que conforman la parte de la molécula que correspondiente al núcleo *ent*-kaureno; sin embargo hacemos énfasis en la aparición de dos tripletes correspondientes a los protones asignados como H-1' (δ_{H} : 4,39 ppm, -CH₂-, 2H, *t*, *J*: 5,6 Hz) y H-2' (δ_{H} : 4,65 ppm, -CH₂-, 2H, *t*, *J*: 5,7 Hz) que se correlacionan con los carbonos metilenos C-1' (δ_{C} : 62,1 ppm) y C-2' (δ_{C} : 42,3 ppm), así mismo se evidencia la correlación entre H-6' (δ_{H} : 7,99 ppm, =CH, 1H, *s*) con su carbono metínico en el anillo imidazólico (C-6', δ_{C} : 133,4 ppm).

Figura 91. Espectro de HMQC (CDCl₃) del 9(11),16-dieno-19-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil-*ent*-kaureno [XVI]



5. Finalmente en su espectro HMBC (Fig. 93) se observan las correlaciones entre los protones H-1' (δ_H : 4,39 ppm, $-\text{CH}_2-$, 2H, *t*, *J*: 5,6 Hz) con el carbono cuaternario del grupo carbonilo señalado como C-19 (δ_C : 177,19 ppm), permitiéndonos confirmar que la molécula se encuentra unida por medio de un enlace éster, así mismo se verifican las correlaciones entre el protón aromático H-6' (δ_H : 7,99 ppm, =CH, 1H, *s*) con los carbonos cuaternarios aromáticos C-4' (δ_C : 150,8 ppm) y C-7' (δ_C : 138,4 ppm) a tres y dos enlaces respectivamente.

De acuerdo al número de protones y carbonos que conforman la molécula, así como los grupos funcionales que están presentes en la misma, quedó claro que el producto obtenido de la reacción entre el ácido grandiflorénico [I] con el 2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil metanosulfonato [XV] se trata del nuevo derivado 9(11),16-dieno-19-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil-*ent*-kaureno [XVI], siendo importante indicar que es la primera vez que se obtienen por hemisíntesis este compuesto, por consiguiente es el primer reporte que se tiene al respecto de esta nueva molécula.

Figura 92. Correlación del espectro HMBC (CDCl_3 , 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil-*ent*-kaureno [XVI]

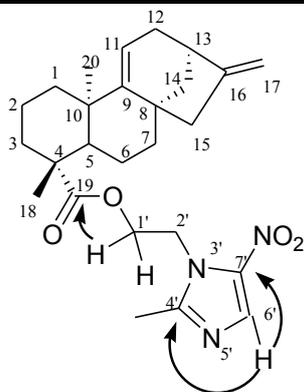
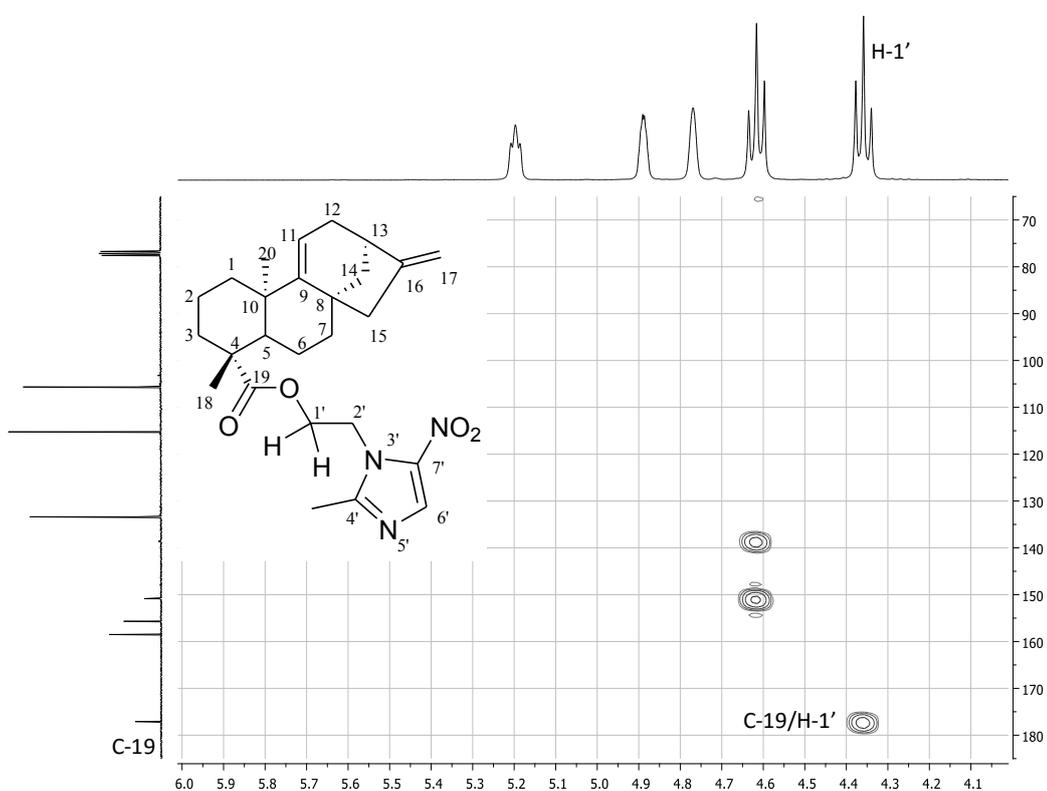
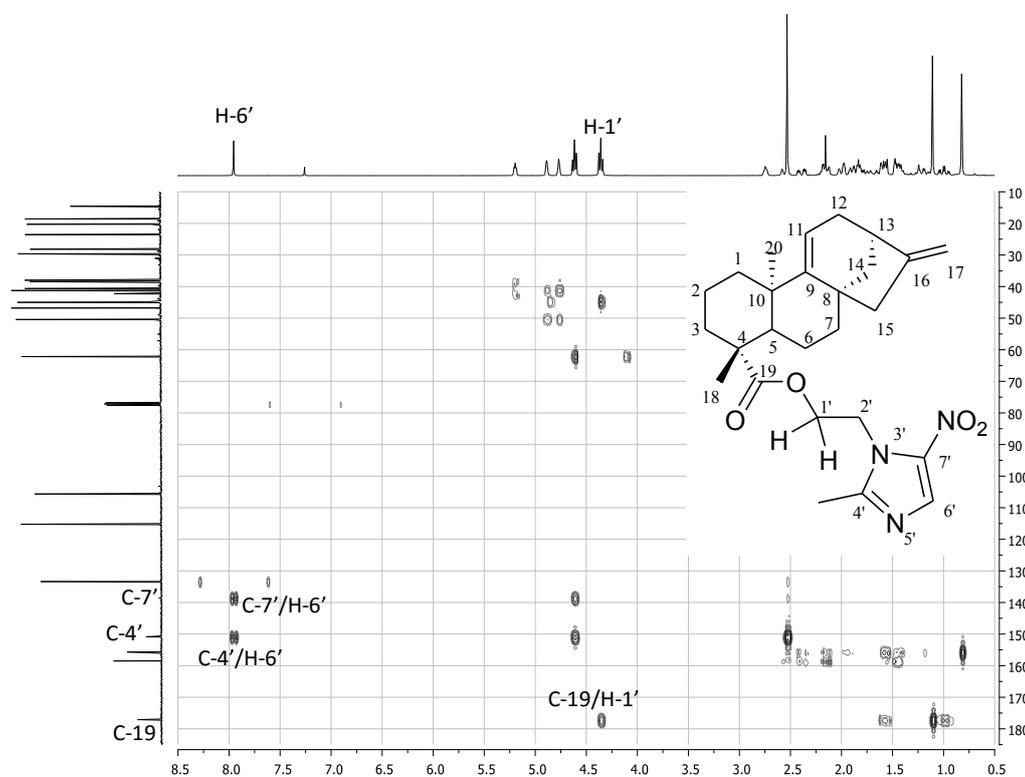


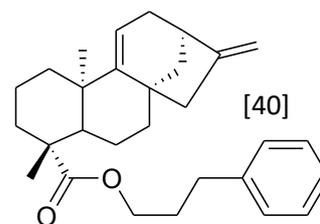
Figura 93. Espectro de HMBC (CDCl₃, 75 MHz) del 9(11),16-dieno-19-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil-*ent*-kaureno [XVI]



VII.4 ESTUDIOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS ÉSTERES DERIVADOS DEL *ent*-kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II].

VII.4.1 Actividad antibacteriana

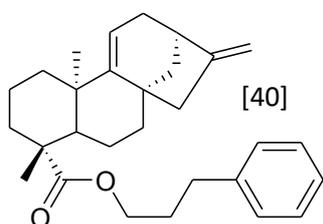
Se determinó la actividad antibacteriana del ácido grandiflorénico [I], *ent*-kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II] y los trece (13) ésteres derivados [III-XIV; XVI] frente a cepas bacterianas Gram positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), y Gram negativas *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922). Los compuestos puros fueron probados a diferentes concentraciones (600 µg/mL, 300 µg/mL, 150 µg/mL y 75 µg/mL) por el método de microdilución descrito en la sección VI.7.1. Todos los compuestos presentaron CMI y CMB superior a 600 µg/mL frente a cada una de las bacterias ensayadas, considerando que los ésteres obtenidos (III-XIV; XVI) son compuestos nuevos, los alcances de esta investigación constituyen el primer reporte de actividad antibacteriana. Sin embargo, investigaciones previas demuestran que [I] por el método de difusión en agar presenta actividad moderada sobre bacterias Gram positivas, específicamente *S. aureus* con una CMI igual a 1600 µg/mL (Peña., 2008; Peña *et al.*, 2009). Considerando que la concentración recomendada para ensayar compuestos puros no debe exceder el rango de 0,1 mg/mL (100 µg/mL), siendo muy interesante aquellos compuestos que presentan actividad antibacteriana inferior a 10 µg/mL (Ríos y Recio., 2005; Ramírez y Marín., 2009), nuestros resultados en relación al compuesto [I] son comparables con los reportados por Peña *et al.*, (2008; 2009) debido a que la actividad antibacteriana fue mayor a 100 µg/mL. Por otra parte, los compuestos [I] y [II] mostraron igual actividad antibacteriana (CMI y CMB >600 µg/mL) indicando que en la posición C-19 del núcleo *ent*-kaureno la presencia del grupo carboxilo (-COOH) ó hidroxilo (-OH) no afectan la actividad antibacteriana, lo cual coincide con la investigación realizada por Carrillo (2011), sin embargo este autor también reporta que el éster *ent*-3'-fenil-kaur-9(11),16-dieno-19-carboxilato de propilo [40] inhibió el crecimiento de *S. aureus* (10-50 µg/mL), *E. faecalis* (50-100 µg/mL) y sobre *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli* presentó actividad superior a 100 µg/mL, esto permite deducir que



la presencia de una cadena alifática no sustituida entre el carbonilo del éster y un anillo aromático mejora notablemente la actividad antibacteriana.

VII.4.2 Actividad antifúngica

La actividad antifúngica del ácido grandiflorénico [I], *ent*-kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II] y los trece (13) ésteres derivados [III-XIV, XVI] fue evaluada frente a *Candida albicans* CDC 385 y *Candida krusei* ATCC 6258. Los compuestos puros fueron probados a 600 µg/mL, 300 µg/mL, 150 µg/mL y 75 µg/mL por el método de difusión en disco descrito en la sección VI.8.1. La actividad antifúngica de [I] y sus



derivados hemisintéticos [II, III-XIV, XVI] presentan CMI superior a 600 µg/mL frente a cada una de las levaduras ensayadas. Previamente Carrillo (2011) evaluó la actividad antifúngica de los compuestos [I], [II] y el éster *ent*-3'-fenil-kaur-9(11),16-dieno-19-carboxilato de propilo [40] reportan

do que este último fue el único compuesto que mostró actividad antifúngica a una concentración >100 µg/mL sobre *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. nivariensis* y *C. parapsilosis*. Considerando que los ésteres obtenidos (III-XIV; XVI) son compuestos nuevos, es importante resaltar que los alcances de esta investigación constituyen el primer reporte de actividad antifúngica, además comparando nuestros resultados con los de Carrillo (2011) podemos inferir:

1. La presencia en posición C-19 del grupo carboxilo (-COOH) ó grupo hidroxilo (-OH) no influye en la actividad antifúngica, debido a que los compuestos [I] y [II] presentaron igual actividad (mayor a 600 µg/mL).
2. Los compuestos del III al XIV presentan el grupo carbonilo (-CO-) del éster en posición C-19, a diferencia del compuesto XVI donde este grupo carbonilo se encuentra en la posición del C-1', es decir, no forma parte del núcleo *ent*-kaureno, de acuerdo con lo descrito anteriormente la posición de este grupo carbonilo en el éster formado no influye en la actividad antifúngica.
3. El hecho de que el compuesto XVI a diferencia del éster *ent*-3'-fenil-kaur-9(11),16-dieno-19-carboxilato [40] ensayado por Carrillo (2011) presente una cadena alifática de dos carbonos entre el grupo éster y el anillo aromático, indica

que es necesaria la presencia de tres carbonos entre estos grupos para que exista actividad antifúngica, además la sustitución del anillo bencénico por el anillo imidazólico influye de manera desfavorable en la actividad.

VII.4.3 Actividad antiinflamatoria

La actividad antiinflamatoria fue evaluada *in vivo* por el método de edema auricular inducido por xilol descrito en la sección VI.9.1. Tanto el ácido grandiflorénico [I], como los trece (13) ésteres derivados [III-XIV, XVI] se ensayaron a dosis de 64 mg/Kg, 32 mg/Kg y 16 mg/Kg; debido a la poca cantidad que disponíamos del *ent*-kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II] este compuesto no fue evaluado.

La administración de 20 μ L de xilol en la oreja derecha de los ratones provocó un nivel de edema de 4,31 mg para el grupo control tratado con solución fisiológica (Tabla 38). Los fármacos antiinflamatorios usados como controles positivos indujeron una disminución del edema causada por xilol, de esta manera con ketoprofeno se observó una inflamación de 0,80 mg, diclofenac sódico 0,74 mg y dexametasona 1,42 mg (Tabla 38). Estos resultados fueron significativamente menores a los observados en el grupo control negativo (control solución fisiológica) ($p < 0,05$).

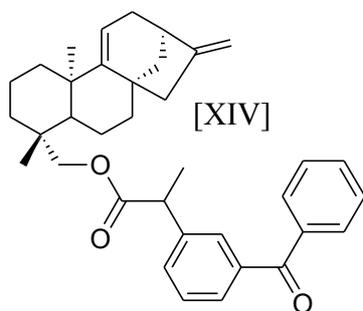
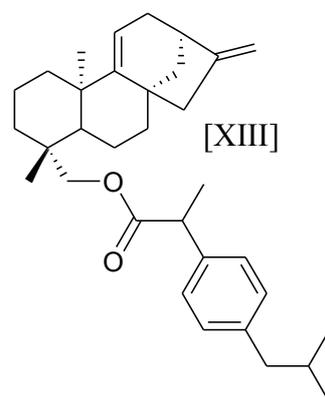
Los antecedentes relacionados con este método exponen que la inflamación aguda generada por el xilol es inhibida por antiinflamatorios esteroideos que bloquean la fosfolipasa A2 y en menor grado por los antiinflamatorios no esteroideos (Vetriselvan *et al.*, 2013), sin embargo nuestros resultados mostrados en la Tabla 36 demuestran que el ketoprofeno inhibe el edema en 81,44 %, seguido del diclofenac sódico que produce un efecto antiinflamatorio igual a 82,83 %, mientras que la dexametasona reduce la inflamación en 67,05 %; asimismo García., (2012) evaluó el efecto antiinflamatorio de diclofenac sódico y dexametasona por el método de edema inducido por xilol, reportando 72,94 % de efecto antiinflamatorio para el diclofenac sódico a dosis de 5 mg/Kg, mientras que la dexametasona provocó 59,41 % de actividad antiinflamatoria a dosis de 1 mg/Kg. Esto evidencia que el método de edema auricular inducido por xilol puede ser empleado para estudiar compuestos de naturaleza esteroidea y no esteroidea.

Tabla 36. Evaluación *in vivo* de la actividad antiinflamatoria por el método edema auricular inducido por xilol. Grupos control

Grupos control negativo	Dosis (mg/kg)	ΔE (mg)	Inhibición Edema (%)
Control sol. fisiológica	-	4,31	-
Control Tween 80	-	6,17	-
Grupos control positivo			
Dexametasona	1	1,42 \pm 0,55	67,05
Ketoprofeno	10	0,80 \pm 0,32	81,44
Diclofenac sódico	25	0,74 \pm 0,32	82,83

ΔE : Edema resultado de la diferencia de medias de los pesos (mg) entre oreja derecha e izquierda. n=6, comparado con el control de sol. Fisiológica. Datos expresados como media \pm D.S. ANOVA post prueba Sheffé $p < 0,05$. n=6, comparado con el control de solución fisiológica.

González *et al.*, (2011) consideran como actividad antiinflamatoria moderada la inhibición del edema de 35 % a 65 % y como buen efecto antinflamatorio un valor mayor de 65 %, de acuerdo con esto a dosis de 16 mg/Kg el compuesto [XIII] fue el único que presentó buen efecto antiinflamatorio (77,31 %, Tabla 37), actividad que se mantuvo a dosis de 32 mg/Kg (86,39 %, Tabla 38) y 64 mg/Kg (88,33 %, Tabla 39) indicando que de todos los



compuestos evaluados es el único que presenta mayor actividad antiinflamatoria. Asimismo el compuesto [XIV] demostró actividad prometedora como antiinflamatorio a dosis de 32 mg/Kg (76,01 %, Tabla 38) y 64 mg/Kg (77,31 %, Tabla 39), sin embargo a 16 mg/Kg (62,40 %, Tabla 37) se comienza a observar moderada actividad antiinflamatoria. Es importante resaltar que la actividad

antiinflamatoria de los compuestos [XIII] y [XIV] no presento un efecto dosis dependiente a las dosis ensayadas (en ninguno de los compuestos existe diferencia significativa entre las dosis evaluadas $p < 0,05$).

Nuestros resultados demuestran que a dosis de 32 mg/Kg (Tabla 38) y 64 mg/Kg (Tabla 39) tanto el ácido grandiflorénico [I] (32 mg/Kg: 65,74 %; 64 mg/Kg: 69,85 %) como el derivado hemisintético [VIII] (32 mg/Kg: 76,01 %; 64 mg/Kg: 78,93 %) evidenciaron buen efecto antiinflamatorio a dosis independiente (en ninguno de los compuestos existe diferencia significativa entre las dosis ensayadas $p < 0,05$); los demás compuestos ensayados presentaron un efecto moderado a todas las dosis estudiadas excepto los compuestos [VI], [IX], [XI] y [XVI] los cuales mostraron actividad antiinflamatoria menor a 35 % a dosis de 16 mg/Kg según puede observarse en la Tabla 37.

Es importante resaltar que el análisis estadístico demuestra que los compuestos hemisintéticos [III-XIV; XVI] a dosis de 16 mg/kg (Tabla 37), 32 mg/kg (Tabla 38), 64 mg/kg (Tabla 39) inducen una disminución del edema significativamente diferente con respecto al grupo control negativo (control Tween 80) ($p < 0,05$).

Para verificar la importancia del doble enlace endocíclico (C-9/C-11) en la actividad antiinflamatoria de los derivados hemisintéticos del ácido grandiflorénico [I], también fue evaluado el efecto antiinflamatorio del ácido kaurénico [41] que a diferencia de [I] no presenta el doble enlace endocíclico en la posición C-9. En la figura 94 se evidencia que el ácido grandiflorénico [I] presentó mayor efecto antiinflamatorio (16 mg/kg: 60,13 %, 32 mg/kg: 65,74; 64 mg/Kg: 69,85 %) que el ácido kaurénico (16 mg/kg: 42,30 %, 32 mg/kg: 55,26 %; 64 mg/Kg: 58,81 %) en todas las dosis estudiadas, sin embargo estadísticamente no existen diferencias significativas ($p < 0,05$). Estos resultados coinciden con lo reportado por Hueso *et al.*, (2011), quienes evaluaron *in vitro* la actividad antiinflamatoria de varios derivados *ent*-kaurenos, resaltando la importancia de los dos dobles enlaces (C-9/C-11; C-16/C-17) para la actividad antiinflamatoria.

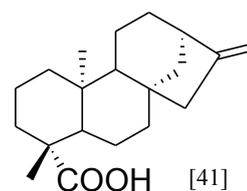
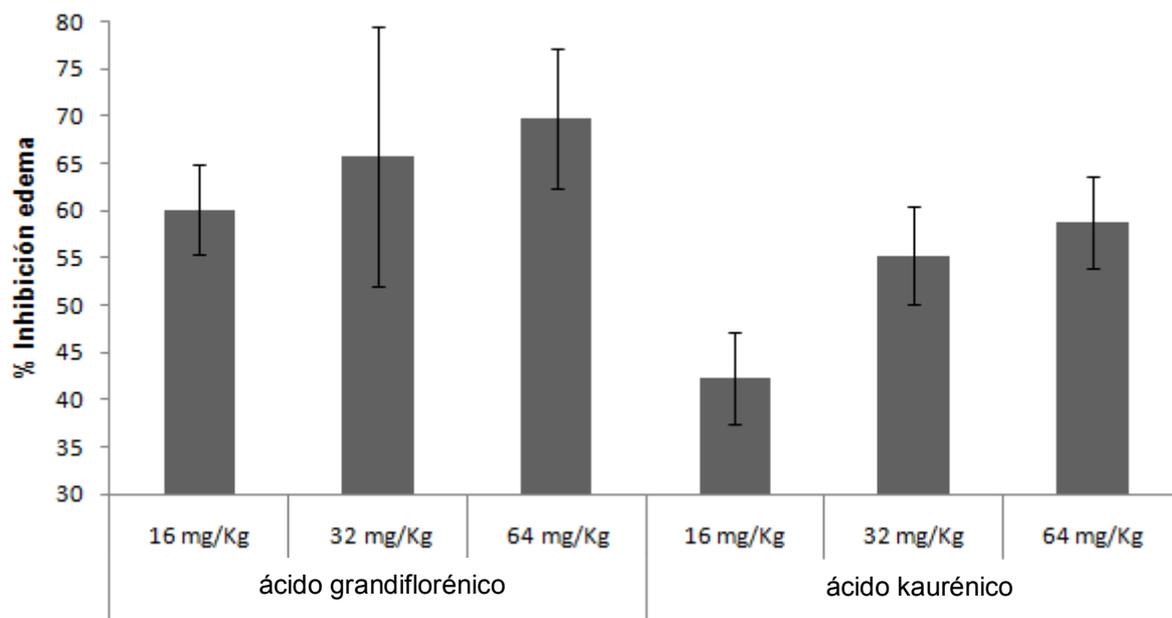
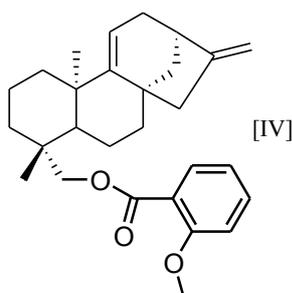
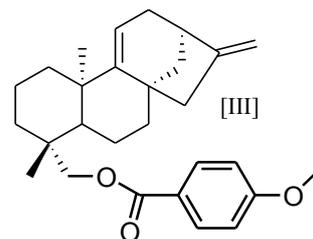


Figura 94. Efecto del ácido grandiflorénico y ácido kaurénico sobre el edema auricular inducido por xilol.



En este modelo, cuando los ratones recibieron una dosis de 64 mg/Kg vía intramuscular de los compuestos [III] y [IV] (compuestos con un grupo metoxi en anillo aromático), se observó una disminución significativa ($p < 0,05$) del edema local cuando se

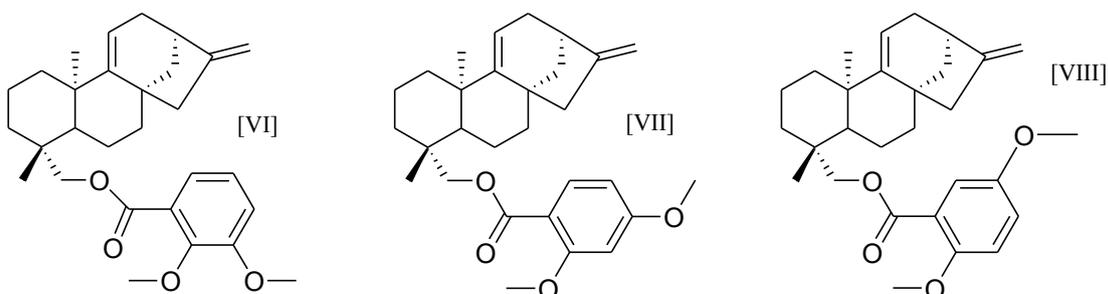


comparó con los animales sin tratamiento antiinflamatorio (grupo control negativo Teewn 80) (Tabla 39). También a esta dosis se evidenció diferencia significativa ($p < 0,05$) entre ambos compuestos indicando que la presencia del grupo metoxi ($-OCH_3$) en posición *para* del anillo bencénico influye favorablemente sobre la actividad antiinflamatoria, además al

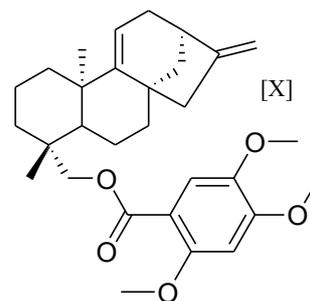
realizar el análisis estadístico entre las dosis ensayadas del compuesto [III] este presentó un efecto dosis dependiente, mientras que el compuesto [IV] mostró efecto dosis no dependiente.

Al comparar la actividad antiinflamatoria entre los compuestos [VI], [VII] y [VIII] (compuestos con dos grupos metoxi en anillo aromático) los dos primero presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las dosis ensayadas, indicando que

su efecto antiinflamatorio es dosis dependiente, asimismo los resultados estadísticos reflejan que el orden de actividad antiinflamatoria entre estos compuestos es [VIII]> [VI]>[VII] evidenciando que las posiciones 2,5 de los metoxi en el anillo aromático incrementa el efecto antiinflamatorio (diferencia significativa $p<0,05$ entre [VIII] y [VII]; [VIII] y [VI] a todas las dosis ensayadas, mientras que [VII] y [VI] solo a 16 mg/Kg).



Cuando analizamos los compuestos que presentan tres grupos metoxi en el anillo bencénico compuestos [IX] y [X], es evidente en cada uno de ellos un efecto antiinflamatorio de manera dosis dependiente ($p<0,05$), además estadísticamente se comprobó que el compuesto [X] con grupos metoxi en las posiciones 2,4,5 del anillo bencénico presentó efecto antiinflamatorio a todas las dosis ensayadas, mientras que el compuesto [IX] (grupos metoxi en las posiciones 3,4,5 del anillo bencénico) disminuye notablemente su efecto a 16 mg/Kg.



Con base a los resultados obtenidos se pudo establecer la relación estructura actividad (REA) importante para el efecto antiinflamatorio del ácido grandiflorénico [I] y sus derivados hemisintéticos [II, III-XIV, XVI]:

- 1- La esterificación del grupo carboxilo (-COOH) en el ácido grandiflorénico [I] mantiene la actividad antiinflamatoria. Aunque a dosis de 64 y 32 mg/Kg el porcentaje de inhibición de la inflamación para el compuesto [XVI] tenga tendencia a disminuir en comparación con [I], la diferencia entre estos porcentajes no es estadísticamente significativa.
- 2- La esterificación del *ent*-kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II] incrementa el efecto antiinflamatorio. Todos los ésteres derivados del compuesto [II] inducen una

disminución del edema significativamente diferente con respecto al grupo control negativo ($p < 0,05$).

- 3- Grupos activadores en el anillo aromático aumentan la actividad antiinflamatoria: la ubicación del grupo metoxi en posición *para* en el anillo aromático influye favorablemente en la actividad. La presencia de grupos metoxi (-OCH₃) en las posiciones 2,5 así como las posiciones 2,4,5 favorecen la actividad.
- 4- Los compuestos en los que el anillo bencénico presenta dos grupos activadores (-OCH₃, -CH₃) en las posiciones 2,5 y 3,5 incrementa la actividad antiinflamatoria.

Es importante resaltar que no se encontraron reportes sobre modelos de inflamación *in vivo* en las fuentes consultadas para el ácido grandiflorénico [I] ó cualquiera de los derivados hemisintéticos [III-XIV, XVI] preparados en esta investigación, por el contrario, se han publicado estudios *in vivo* e *in vitro* sobre el efecto antiinflamatorio del ácido kaurénico [41].

Tabla 37. Evaluación *in vivo* de la actividad antiinflamatoria del ácido grandiflorénico y derivados hemisintéticos por el método edema auricular inducido por xilol a dosis de 16 mg/kg.

Grupo	ΔE (mg)	Inhibición Edema (%)	Grupo	ΔE (mg)	Inhibición Edema (%)
[I]	2,46 \pm 2,46	60,13	[IX]	4,02 \pm 1,53	34,85
[III]	3,40 \pm 1,31	44,89	[X]	2,48 \pm 1,0	59,81
[IV]	2,80 \pm 1,31	54,62	[XI]	3,72 \pm 0,50	39,71
[V]	1,60 \pm 1,25	46,84	[XII]	3,06 \pm 1,21	50,41
[VI]	4,78 \pm 1,82	22,53	[XIII]	1,40 \pm 0,79	77,31
[VII]	3,66 \pm 1,41	40,68	[XIV]	2,32 \pm 0,92	62,40
[VIII]	2,66 \pm 1,10	56,89	[XVI]	4,54 \pm 1,75	26,42

ácido *ent*-kaur-9(11),16-dieno-19-oico [I]; 9(11),16-dieno-19-(4-metoxibenzoil)-*ent*-kaureno [III]; 9(11),16-dieno-19-(2-metoxibenzoil)-*ent*-kaureno [IV]; 9(11),16-dieno-19-(4-trifluorometilbenzoil)-*ent*-kaureno [V]; 9(11),16-dieno-19-(2,3-dimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [VI]; 9(11),16-dieno-19-(2,4-dimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [VII]; 9(11),16-dieno-19-(2,5-dimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [VIII]; 9(11),16-dieno-19-(3,4,5-trimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [IX]; 9(11),16-dieno-19-(2,4,5-trimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [X]; 9(11),16-dieno-19-(2,3-dimetilbenzoil)-*ent*-kaureno [XI]; 9(11),16-dieno-19-(5-metil-2-nitrobenzoil)-*ent*-kaureno [XII]; 9(11),16-dieno-18-[2-(4-isobutilfenil) propil]-*ent*-kaureno [XIII]; 9(11),16-dieno-19-[2-(3-benzofenil)propil]-*ent*-kaureno [XIV]; 9(11),16-dieno-19-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil-*ent*-kaureno [XVI]. ΔE : Edema resultado de la diferencia de medias de los pesos (mg) entre oreja derecha e izquierda. Datos expresados como media \pm D.S. ANOVA, post prueba Sheffé $p < 0,05$. $n=6$, comparado con el control de Tween 80.

Tabla 38. Evaluación *in vivo* de la actividad antiinflamatoria del ácido grandiflorénico y derivados hemisintéticos por el método edema auricular inducido por xilol a dosis de 32 mg/kg.

Grupo	ΔE (mg)	Inhibición Edema (%)	Grupo	ΔE (mg)	Inhibición Edema (%)
[I]	2,11 \pm 1,06	65,74	[IX]	2,92 \pm 1,17	52,67
[III]	2,48 \pm 0,99	59,81	[X]	2,36 \pm 0,93	61,75
[IV]	2,54 \pm 0,99	58,83	[XI]	3,04 \pm 0,76	50,73
[V]	2,46 \pm 0,96	60,13	[XII]	2,76 \pm 1,11	55,27
[VI]	3,10 \pm 1,18	49,76	[XIII]	0,84 \pm 0,60	86,39
[VII]	3,44 \pm 1,32	44,25	[XIV]	1,48 \pm 0,61	76,01
[VIII]	1,48 \pm 0,64	76,01	[XVI]	3,04 \pm 1,17	50,73

ácido *ent*-kaur-9(11),16-dieno-19-oico [I]; 9(11),16-dieno-19-(4-metoxibenzoil)-*ent*-kaureno [III]; 9(11),16-dieno-19-(2-metoxibenzoil)-*ent*-kaureno [IV]; 9(11),16-dieno-19-(4-trifluorometilbenzoil)-*ent*-kaureno [V]; 9(11),16-dieno-19-(2,3-dimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [VI]; 9(11),16-dieno-19-(2,4-dimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [VII]; 9(11),16-dieno-19-(2,5-dimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [VIII]; 9(11),16-dieno-19-(3,4,5-trimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [IX]; 9(11),16-dieno-19-(2,4,5-trimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [X]; 9(11),16-dieno-19-(2,3-dimetilbenzoil)-*ent*-kaureno [XI]; 9(11),16-dieno-19-(5-metil-2-nitrobenzoil)-*ent*-kaureno [XII]; 9(11),16-dieno-18-[2-(4-isobutilfenil) propil]-*ent*-kaureno [XIII]; 9(11),16-dieno-19-[2-(3-benzofenil)propil]-*ent*-kaureno [XIV]; 9(11),16-dieno-19-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil-*ent*-kaureno [XVI]. ΔE : Edema resultado de la diferencia de medias de los pesos (mg) entre oreja derecha e izquierda. Datos expresados como media \pm D.S. ANOVA, post prueba Sheffé $p < 0,05$. $n=6$, comparado con el control de Tween 80.

Tabla 39. Evaluación *in vivo* de la actividad antiinflamatoria del ácido grandiflorénico y derivados hemisintéticos por el método edema auricular inducido por xilol a dosis de 64 mg/kg.

Grupo	ΔE (mg)	Inhibición edema (%)	Grupo	ΔE (mg)	Inhibición edema (%)
[I]	1,86 \pm 0,80	69,85	[IX]	1,60 \pm 0,68	74,07
[III]	1,40 \pm 0,62	77,31	[X]	1,46 \pm 0,58	76,34
[IV]	2,18 \pm 0,83	64,67	[XI]	2,28 \pm 1,41	63,05
[V]	2,60 \pm 0,65	74,07	[XII]	2,60 \pm 1,03	57,86
[VI]	2,20 \pm 0,85	64,34	[XIII]	0,72 \pm 0,37	88,33
[VII]	2,54 \pm 0,97	58,83	[XIV]	1,40 \pm 0,62	77,31
[VIII]	1,30 \pm 0,57	78,93	[XVI]	2,28 \pm 0,87	63,05

ácido *ent*-kaur-9(11),16-dieno-19-oico [I]; 9(11),16-dieno-19-(4-metoxibenzoil)-*ent*-kaureno [III]; 9(11),16-dieno-19-(2-metoxibenzoil)-*ent*-kaureno [IV]; 9(11),16-dieno-19-(4-trifluorometilbenzoil)-*ent*-kaureno [V]; 9(11),16-dieno-19-(2,3-dimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [VI]; 9(11),16-dieno-19-(2,4-dimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [VII]; 9(11),16-dieno-19-(2,5-dimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [VIII]; 9(11),16-dieno-19-(3,4,5-trimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [IX]; 9(11),16-dieno-19-(2,4,5-trimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [X]; 9(11),16-dieno-19-(2,3-dimetilbenzoil)-*ent*-kaureno [XI]; 9(11),16-dieno-19-(5-metil-2-nitrobenzoil)-*ent*-kaureno [XII]; 9(11),16-dieno-18-[2-(4-isobutilfenil) propil]-*ent*-kaureno [XIII]; 9(11),16-dieno-19-[2-(3-benzofenil)propil]-*ent*-kaureno [XIV]; 9(11),16-dieno-19-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil-*ent*-kaureno [XVI]. ΔE : Edema resultado de la diferencia de medias de los pesos (mg) entre oreja derecha e izquierda. Datos expresados como media \pm D.S. ANOVA, post prueba Sheffé $p < 0,05$. $n = 6$, comparado con el control de Tween 80.

VIII. CONCLUSIONES

Con base a los resultados mostrados en el presente trabajo podemos formular las siguientes conclusiones:

1. A partir del ácido grandiflorénico [I] se obtuvo el *ent*-kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II], utilizado como material de partida para obtener por el método de esterificación de Steglich trece (13) derivados: 9(11),16-dieno-19-(4-metoxibenzoil)-*ent*-kaureno [III]; 9(11),16-dieno-19-(2-metoxibenzoil)-*ent*-kaureno [IV]; 9(11),16-dieno-19-(4-trifluorometilbenzoil)-*ent*-kaureno [V]; 9(11),16-dieno-19-(2,3-dimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [VI]; 9(11),16-dieno-19-(2,4-dimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [VII]; 9(11),16-dieno-19-(2,5-dimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [VIII]; 9(11),16-dieno-19-(3,4,5-trimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [IX]; 9(11),16-dieno-19-(2,4,5-trimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [X]; 9(11),16-dieno-19-(2,3-dimetilbenzoil)-*ent*-kaureno [XI]; 9(11),16-dieno-19-(5-metil-2-nitrobenzoil)-*ent*-kaureno [XII]; 9(11),16-dieno-18-[2-(4-isobutilfenil) propil]-*ent*-kaureno [XIII]; 9(11),16-dieno-19-[2-(3-benzofenil)propil]-*ent*-kaureno [XIV]; 9(11),16-dieno-19-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil-*ent*-kaureno [XVI], no reportados en la literatura, excepto el compuesto [II], lo cual constituye un importante aporte para el desarrollo de nuevos agentes hemisintéticos.
2. El método de esterificación de Steglich, resultó eficaz para la obtención de los ésteres a partir del *ent*-kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II], sin embargo, la hemisíntesis del éster 9(11),16-dien-18-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil-*ent*-kaureno [XVI] a partir del ácido grandiflorénico [I] no se realizó por este método debido a que fue necesario transformar el grupo hidroxilo (-OH) del 2-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etanol (metronidazol) en mejor grupo saliente con el cloruro de metanosulfonilo.
3. La esterificación del *ent*-kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II] con el ácido (R,S) 2-(4-isobutilfenil)propanoico y ácido (R,S) 2-(3-benzoilfenil)propanoico formó la mezcla de sus enantiómeros, debido a la presencia de un centro quiral en la molécula de los ácidos. Es importante resaltar, que en su mayoría las formas farmacéuticas de los ácidos (R,S) 2-(4-isobutilfenil)propanoico (Ibuprofeno) y (R,S) 2-(3-benzoilfenil)propanoico (ketoprofeno) consisten en las mezclas racémicas de los enantiómeros R y S, además está bien documentado que la forma (S) es la farmacológicamente activa para ambos, y que *in vivo* sufren una

inversión quiral por medio de la cual parte del enánimero (R) es transformado en la forma activa (S).

4. El estudio de la actividad antibacteriana del ácido grandiflorénico [I] y sus derivados hemisintéticos [II, III-XIV, XVI] empleando el método de microdilución, permitió comprobar que todos los compuestos presentan actividad antibacteriana superior a 600 µg/mL sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas, por lo tanto dichos compuestos no resultaron interesantes como antibacterianos.
5. Los resultados de la actividad antifúngica del ácido grandiflorénico [I] y sus derivados hemisintéticos [II, III-XIV, XVI] empleando el método de difusión en agar, permitió comprobar que los mismos no presentan buena actividad antifúngica debido a que la inhibición del crecimiento de *C. albicans* y *C. Krusei* fue mayor a 600 µg/mL.
6. El método de edema auricular inducido por xilol empleado para evaluar *in vivo* la actividad antiinflamatoria demostró ser adecuado para estudiar compuestos de naturaleza no esteroidea y esteroidea, debido a que tanto el ketoprofeno, diclofenac sódico (fármacos de naturaleza no esteroidea) como la desametaxona (fármaco de naturaleza esteroidea) provocaron inhibición de la inflamación aguda en ratones BIO:NMRI.
7. La mezcla de enánimeros de los compuestos [XIII] y [XIV] evidenció buena actividad antinflamatoria a todas las dosis ensayadas (64 mg/Kg, 32 mg/Kg y 16 mg/Kg), ya que el porcentaje de inhibición de inflamación fue superior a 65 para ambos compuestos.
8. El ácido grándiflorénico [I] y los derivados hemisintéticos [III-XIV, XVI] mostrarón ser compuestos con actividad antinflamatoria prometedora contra la inflamación aguda.
9. El estudio de la actividad antinflamatoria *in vivo* por el método de edema auricular inducido por xilol, permitió demostrar que la presencia del doble enlace endocíclico (C₉-C₁₁) en el ácido grandiflorénico [I] es indispensable para su actividad antiinflamatoria, está conclusión pudo concretarse luego de comparar los resultados de la actividad antinflamatoria del ácido grandiflorénico [I] con el ácido kaurénico [41].

10. La actividad antiinflamatoria *in vivo* por el método de edema auricular inducido por xilol, permitió demostrar que los ésteres derivados del *ent*-kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II] presentan mayor actividad antiinflamatoria que el ácido grandiflorénico [I], además dicha actividad se ve incrementada por grupos activadores (-OCH₃, CH₃) presentes en el anillo aromático que forma parte de los ésteres.
11. Todos los derivados hemisintéticos obtenidos en esta investigación [III-XIV, XVI], excepto el *ent*-kaur-9(11),16-dieno-19-ol [II], son compuestos nuevos con actividad antiinflamatoria, que pueden servir como modelo para la hemisíntesis de otros compuestos con potencial farmacológico, además resulta interesante el estudio de otras actividades biológicas en las cuales con base a los antecedentes el ácido grandiflorénico [I] a resultado activo.

IX. RECOMENDACIONES

1. Debido a que los compuestos [XIII] y [XIV] presentaron un buen efecto antiinflamatorio *in vivo* por el método de edema auricular inducido por xilol, es adecuado continuar la evaluación de dicha actividad a dosis más bajas hasta determinar la dosis efectiva 50 (DE₅₀), así mismo complementar esta actividad por otro método *in vivo* como el edema de pata inducido por carragenina.
2. Realizar la separación de los enantiómeros obtenidos de los compuestos [XIII] y [XIV], ya que a pesar de que los profenos sufren *in vivo* una inversión quiral por la cual el enantiómero (R) es transformado en la forma activa (S), debemos considerar que al tratarse de compuestos nuevos la extensión de la inversión podría ser variable.
3. Evaluar la posible actividad antiprotozoaria y el efecto sobre bacterias anaeróbicas del compuesto [XVI], considerando que la parte unida al grupo *ent*-kaureno corresponde al metronidazol lo cual constituiría un aporte importante a la investigación y generación de un nuevo agente antiparasitario y antibacteriano.
4. Para los compuestos que presentaron buen efecto antiinflamatorio realizar estudios toxicológicos que demuestren que el posible candidato a fármaco no ocasione posibles riesgos tóxicos.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Acosta, G y Torrenegra, R. (2011). Extracción, separación e identificación de la sustancia activa producida por *Espeletia killipii* como defensa ante el ataque de larvas de lepidópteros. *Revista de Facultad de Ciencias Básicas*, 7, 126-133.
2. Agath Boulyé (2012). Synthèse d'analogues de l'épicoconone par reaction d'oxydation désaromatisante: relation structure fluorescences et application en protéomique., Thèse de doctored, p. 275.
3. Akerele, O. (1993). Las plantas medicinales: un tesoro que no debemos desperdiciar. *Foro Mundial de la Salud*, 14, 390-395.
4. Alonso, R. (2006). Synthetic diterpene derivatives from kaura-9(11),16-dien-19-oic acid: cytostatic and cytotoxic activity against human cancer cell lines. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 40, 476-479.
5. Alvarado, Q; San Martín, E; Pérez, G. (2010). Evaluación citotóxica de las fracciones extraídas de Aranto (*Kalanchoe daigremontiana*). *V Simposio de Tecnología Avanzada 24-29 de junio. CICATA-IPN. México D. F.*
6. Ambrosio, S; Tirapelli, C; Coutinho, S; de Oliveira, D; de Oliveira, A; Da Costa, F. (2004). Role of the carboxylic group in the antispasmodic and vasorelaxant action displayed by kaurenoic acid. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56, 1407-1413.
7. Ambrosio, S; Tirapelli, C; da Costa, F; de Oliveira, A. (2006). Kaurane and pimarane-type diterpenes from the *Viguiera* species inhibit vascular smooth muscle contractility. *Life Sciences*, 79, 925-933.
8. Aparicio, R; Villasmil, T; Peña, A; Rojas, J; Usubillaga, A. (2013). Estudio fitoquímico de las hojas de *Espeletia semiglobulata* Cuatrec. *Revista de la Facultad de Farmacia*, 55, 2-5.
9. Arencibia, D; Rosario, L; Curveco D. (agosto-septiembre, 2009). Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. *Revista de Toxicología en Línea*, 19,40-52.
10. Ashour, M; Wink, M y Gershenzon. (2010). Biochemistry of terpenoids: monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes. *Annual Plant Reviews*, 40, 258-303.
11. Atkins, P y De Paula, J. (2008). Química Física. 8º Edición. Editorial Médica Panamericana, Madrid, España.
12. Atmaca, U; Usanmaz, H y Çelik M. (2014). Oxidations of alkenes with hypervalent iodine reagents: an alternative ozonolysis of phenyl substituted alkenes and allylic oxidation of unsubstituted cyclic alkenes. *Tetrahedron Letters*, 55, 2230-2232.
13. Avendaño C. (2001). Introducción a la Química Farmacéutica. 2a. Ed. Editorial McGraw- Hill- Interamericana. Madrid, España.
14. Ayala, Y. (2010). Aleopatía: un fenómeno desconocido por los agricultores primarios. Parte I. *Agronomía*, 1,19-37.
15. Azcón-Bieto, J y Talón, M. (2000). Fundamentos de fisiología vegetal. McGraw-Hill-Interamericana. Madrid, ESPAÑA.
16. Bahmani, M; Golshahi, H; Saki, K; Rafieian-Kopaei, M; Delfan, B; Mohammadi, T. (2014). Medicinal plants and secondary metabolites for diabetes mellitus control. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4, S687-S692.
17. Balekar, N; Nakpheng, T; Gangadhar, N; Srichana, T. (2012). Wound healing activity of *ent*-kaura-9(11),16-dien-19-oic acid isolated from *Wedelia trilobata* (L.) leaves. *Phytomedicine*, 19, 1178-1184.
18. Balekar, N; Nakpheng, T y Srichana, T. (2013). Wound-healing potential of grandiflorenic acid isolated from *Wedelia trilobata* (L.) leaves. *Songklanakar*

- Journal of Science and Technology*, 35, 537-546.
19. Barazarte, A. (2008). Reacciones de hidrogenación de productos naturales catalizada por el complejo diclorotetrakisdimetilsulfóxido rutenio (II) en medio homogéneo y bifásico tolueno/agua. Trabajo de grado de licenciatura, no publicado, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela. Disponible: http://tesis.ula.ve/pregrado/tde_busca/archivo.php?codArquivo=1629. [consulta: 2016, enero 31].
 20. Batista, R; Chiari, E y De Oliveira, A. (1999). Trypanosomicidal Kaurane diterpenes from *Wedelia padulosa*. *Planta Medica*, 64, 283-284.
 21. Batista, R; Garcia, P; Castro, M; Del Corral, M; Speziali, N y De Oliveira, A. (2005). Methyl *ent*-15-hydroxy-16-kauran-19-oate. *Acta Crystallographica*, Section E, 1525-1527.
 22. Batista, R; Humberto, J; Chiari, E; Braga, A. (2007). Synthesis and trypanocidal activity of *ent*-kaurane glycosides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15, 381-391.
 23. Batista, R; Brandão, G; Braga, F y Oliveira, A. (2009). Cytotoxicity of *Wedelia paludosa* D.C. extracts and constituents. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 19, 36-40.
 24. Batista, R; García, P; Castro, M; Del corral, J; Feliciano, A y De oliveira, A. (2010). *iso*-Kaurenoic acid from *Wedelia paludosa* D.C. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 82, 823-831.
 25. Batista, R; García, P; Castro, M; Del Corral, J; Speziali, N; Varotti, F; De Paula, A García-Fernández, L; Francesch, A; San Feliciano, A; De Oliveira, A. (2013). Synthesis, cytotoxicity and antiplasmodial activity of novel *ent*-kaurane derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 62, 168-176.
 26. Bayarsaihan, D. (2011). Epigenetic mechanisms in inflammation. *Journal of Dental Research*, 90, 9-17.
 27. Bejar, E; Enriquez, R y Lozoya, X. (1984). The *in vitro* effect of grandiflorenic acid and *Zoapatle* aqueous crude extract upon spontaneous contractility of the rat uterus during oestrus cycle. *Journal of Ethnopharmacology*, 11, 87-97.
 28. Bejar, E. (1988). Preliminary investigation of the estrogenic potential of grandiflorenic acid from *Montanoa tomentosa*. *Journal of Ethnopharmacology*, 23, 329-331.
 29. Berdonces, J. (1995). Principios activos y preparaciones farmacéuticas de las plantas medicinales. *Natura Medicatrix*, 37, 42-48.
 30. Bernal, M y Guzmán, M. (1984). El antibiograma de discos técnica de Kirby-Bauer. *BIOMEDICA*, 4, 112-121.
 31. Blair, S; Lacharme, L; Carmona, J y Tobón, A. (2001). Resistencia de *Plasmodium falciparum* a tres fármacos antimaláricos en Turbo (Antioquia, Colombia), *Revista Panamericana de Salud Pública*, 9, 23-29.
 32. Boeck, P; Sá, M; de Souza, B; Cercená, R; Escalante, A; Zachino, S; Filho, V; Yunes, R. (2005). A simple synthesis of kaurenoic esters and other derivatives and evaluation of their antifungal activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16 (6B), 1360-1366.
 33. Bohlmann, F; Suding, H; Cutreacasas, C; King, R; Robinson, H. (1980). Neue diterpene aus der subtribus Espeletiinae. *Phytochemistry*, 19, 267-271.
 34. Bohlmann, F; Zdero, C; Robinson, H; King, R. (1981). 15 α -methylacryloyloxy-*ent*-kaurenic acid from *Ichthyothere* species. *Phytochemistry*, 20, 522-523.
 35. Bohlmann, F; Zdero, C; King, R; Robinson, H. (1982). Naturally occurring terpenes derivatives: Edudesmanolides and kaurene derivatives from *Wedelia hookeriana*. *Phytochemistry*, 20, 751-757.
 36. Bohlmann, F; Ang, W; King, R; Robinson, H. (1984). A further steiractanolide from

- Wedelia grandiflora*. *Phytochemistry*, 23, 2069-2070.
37. Braithwaite, S. (1994). *Chromatografic Methods*. 4^o edición-Chapman & Hall-UK
 38. Bresciani, L; Yunesa, R; Bürgerb, C; De Oliveirab, L; Bo' fb, K; Cechinel-Filho, V. (2004). Seasonal Variation of Kaurenoic Acid, a Hypoglycemic Diterpene Present in *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (Asteraceae). *Zeitschrift für Naturforschung C*, 59,229-32.
 39. Brieskorn, C y Pöhlmann, E. (1968). Dyterpenes vom kaurantyp aus der Composite *Espeletia schultzzi* (Wedd). *Tetrahedron letters*, 54,5661-5664.
 40. Brizuela, M; García, L; Pérez, L y Mansur, M. (1998). Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. *Revista Iberoamericana de Micología*, 15, 69-74.
 41. Bruno, M; Rosselli, S; Pibiri, I; Kilgore, N Y Lee, K. (2002). Anti-HIV Agents Derived from the *ent*-Kaurane Diterpenoid Linearol. *Journal Natural Products*, 65, 1594-1597.
 42. Cáceres, A; Girgn, L y Martínez, A. (1987). Diuretic activity of plants used for the treatment of urinary ailments in guatemala. *Journal of Ethnopharmacology*, 19, 233-245.
 43. Camps, P; Vázquez, S; Escolano, C. (2009). Preparación de los grupos funcionales más usuales en fármacos. Problemas resueltos de síntesis de fármacos. Tomo 2. Publicaciones y edicions de la Universitat de Barcelona. España.
 44. Campos-Bedolla, P; Campos, M; Valencia-Sánchez, A y Ponce-Monter, H. (1997). Effect of kauranes from *Montanoa* spp. on rat uterus. *Phytotherapy Research*, 11, 11-16.
 45. Cantón, E y Martín, E., Espinel-Ingroff, A. (2007). Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (Documentos M27-A3, M38-A y M44-A). *Revista Iberoamericana de Micología*, 15a-1-15b-6.
 46. Carey, F. (2006). *Química Orgánica*. 6^o Edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana, México, México.
 47. Carrero, J. (2008). Epoxidación regioselectiva de diofelinas terpénicas mediante catalizadores heterogéneos. Trabajo de grado de doctorado, no publicado, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España. Disponible: http://eprints.ucm.es/8269/1/T30_651.pdf [consulta: 2016, enero 21].
 48. Carrillo, F. (2011). Síntesis y actividad de derivados de diterpenos de la serie del *ent*-kaurano. Trabajo de grado de doctor en Química Orgánica. Mención Productos Naturales, no publicado, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela. Pp, 67-71.
 49. Casaroli, R; Reina, M; Ràfols, C; y Vilaró, S. (2006). Estudio *in vitro* del efecto cicatrizante del extracto de cartílago micronizado. *Piel*, 21, 61-66.
 50. Castro, S. (2006). Evaluación de la actividad citotóxica de extractos y fracciones de *Isertia laevis* empleando líneas celulares derivadas de tumores humanos. Trabajo de grado de licenciatura en Biología, no publicado, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. Disponible: http://www.javerianaedu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis7_5.pdf [consulta: 2016, febrero 05].
 51. Cavalcanti, B; Costa-Lotufo, L; Moraes, M; Burbano, R; Silveira, E; Cunha, K; Rao, V; Moura, D; Rosa, R; Henriques, J; Pessoa, C. (2006). Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 388-392.
 52. Chacón, P. (2013). Análisis del aislamiento y la caracterización de dos nuevos esqueletos sesquiterpénicos. Examen de candidatura basado en el artículo "Volvalerelactones A and B, two new sesquiterpenoid lactones with an unprecedented skeleton from *Valeriana officinalis* var. *latifolia*". Postgrado interdisciplinario en

- Química Aplicada, Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes.
53. Chakraborty, K; Lipton, A; Raj, A; Vijayan, K. (2010). Antibacterial labdane diterpenoids of *Ulva fasciata* Delile from southwestern coast of the Indian Peninsula, *Food Chemistry*, 119, 1399-1408.
 54. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2006. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. M7-A7. Pennsylvania, U.S.A.
 55. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2012). Método de sensibilidad microbiana por dilución. MIC Testing. M07-A8. Pennsylvania, U.S.A.
 56. Coll, M; Mercado, M; Grau, A; Catalán, C. (2010). *Ent*-kaurane derivatives from the root cortex of yacon and other three *Smallanthus* species (Heliantheae, Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 38, 1042-1048.
 57. Colmán, E. (2013). Cinética y mecanismos de las reacciones de ozonólisis de una serie de compuestos orgánicos volátiles oxigenados e insaturados (covois) empleando diferentes cámaras de simulación atmosféricas. Trabajo de grado de maestría, no publicado, Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay. Disponible: <http://www.conacyt.gov.py/sites/default/files/TES-BN-002.pdf> [consulta: 2016, febrero 01].
 58. Cordell, G. (1995). Changing strategies in natural products chemistry. *Phytochemistry*, 40, 1585-1612.
 59. Cotoras, M; Folch, C y Mendoza, L. (2004). Characterization of the antifungal activity on *Botrytis cinerea* of the natural diterpenoids kaurenoic acid and 3 α -hydroxy-kaurenoic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 2821-2826.
 60. Crich, D y Zou, Y. (2003). Catalytic allylic oxidation with a recyclable, fluorine seleninic acid. *Organic Letters*, 6, 775-777
 61. Cruz-Mondragón, P; Concepción, M; Ortiz, B; Enríquez, R; Soriano, M. (2009). X-ray Crystal structure of grandiflorenic acid [(2)-kaura-9(11)-16-dien-19-oic acid] methyl ester, a compound formerly considered as an oily derivative. *Journal of Chemical Crystallography*, 39, 474-477.
 62. Cuatrecasas, J. (1976). A new subtribe in the Heliantheae (Compositae): Espiletiinae, *Phytologia*, 35, 43-61.
 63. CYTED. (1995). Manual de técnicas de investigación. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Subprograma X. Química Fina Farmacéutica. Proyecto X-1. Búsqueda de principios bioactivos en plantas de la región.
 64. Da Silva, J; Balen, E; Lanza, U; Da Silva, J; Donomae, R; Barison, A; Mateus, M; Leite, C. (2016). Anti-nociceptive, anti-hyperalgesic and anti-arthritic activity of amides and extract obtained from *Piper amalago* in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 179, 101-109.
 65. Davidson, P., Parish, M., (1989). Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technology*, 43, 148-155.
 66. Del Campo, M. (2014). Pervivencia de los remedios vegetales tradicionales americanos en la terapéutica española actual. Trabajo de grado de doctorado, no publicado, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España. Disponible: <http://eprints.ucm.es/24963/> [consulta: 2015, diciembre 17].
 67. De Carvalho, G; De Carvalho, M, Ferreira, D ; Faria, T ; Braz-Filho, R.(2001). Diterpenos, triterpenos e esteróides das flores de *Wedelia paludosa*. *Química Nova*, 24, 24-26.
 68. De León, E; Morán, J; López, J; Suarez, O; Mondolis, E. (2008). Evaluación de la actividad vascular de diferentes productos obtenidos a partir de *Lourtegia*

- stoechadifolia*, *Espeletia schultzii* Y *Stevia lucida*. Proyecto de investigación, Panamá.
69. De los Ríos, C; Hidalgo, D; Contreras, Q; Crescente, O; Caserta, A. (1999). Phytochemical evaluation and antibacterial activity of *Espeletia schultzii* (Asteraceae) inflorescences. *Ciencia*, 7, 72-77.
 70. De Melo, A; Barros, B; Braga, A; Castro, F. (2001). HPLC quantitation of kaurane diterpenes in *Xylopi* species. *Fitoterapia*, 72, 40-45.
 71. Deng, X; Shen, Y; Yang, J; He, J; Zhao, Y; Peng, L; Leng, Y; Zhao, Q.(2013). Discovery and structure-activity relationships of ent-Kaurene diterpenoids as potent and selective 11 β -HSD1 inhibitors: Potential impact in diabetes. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 65, 403-414.
 72. Dewick, P. (2002). Medicinal Natural Products. A biosynthetic approach. Second edition. John Wiley & Sons, Ltd.
 73. Diamantino, M; Gomes, R; De Oliveira, L; Alves, L; Da Silva, H. (2008). Preparation and phytotoxicity of novel kaurane diterpene amides with potential use as herbicides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2985-2988.
 74. Díaz, R. (2007). Farmacología de Terpenoides de *Helianthus annuus* L. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 73, 725-746.
 75. Ding, C; Wang, L; Chen, H; Wild, C; Ye, N; Ding, Y; Wang, T; White, M; Shen, Q; Zhou J. (2014). ent-Kaurane-based regio- and stereoselective inverse electron demand hetero-Diels–Alder reactions: synthesis of dihydropyran-fused diterpenoids. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 12, 8442-8452.
 76. Duarte, A; Coelho, G; Goncalves, N; Heinrich, L; Aparecida, J; Diamantino, M. (2010). Hydroxylation at carbon -2 of ent-16-oxo-17-norkauran-19-oic acid by *Fusarium proliferatum*. *Journal of Natural Products*, 73, 1431-1433.
 77. Enríquez, R; Escobar, L; Romero, M; Chávez, M; Lozoya, X. (1983). Determination of grandiflorenic acid in organic and aqueous extracts of *Montanoa tomentosa* (zoapatle) by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 258, 297-301.
 78. Enríquez, R; Barajas, J; Ortiz, B; Lough, A; Reynolds, W; Yu, M; León, I; Gnecco, D. (1997). Comparison of crystal and solution structures and ¹H and ¹³C chemical shifts for grandiflorenic acid, kaurenoic acid and monoginoic acid. *Canadian Journal of Chemistry*, 75, 342-347.
 79. Espinal, C; Uribe, L; Eslaba, A; Rodriguez, M. (1981). Resistencia del *Plasmodium falciparum* a la combinación sulfa-pirimetamina descripción de los tres primeros casos en Colombia. *Biomedica*, 1, 213-217.
 80. Espinel-Ingroff, A; Barchiesi, F; Cuenca-Estrella, M; Pfaller, M; Rinaldi, M; Rodriguez-Tudela, J; Verweij, P. (2005). International and multicenter comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 broth microdilution methods for testing susceptibilities of *Candida* spp. to Fluconazole, Itraconazole, Posaconazole, and Voriconazole. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 3884-3889.
 81. Esplugues, J y López-Jaramillo, P. (1997). Mediadores celulares II. Eicosanoides, óxido nítrico y factor activador de plaquetas. *Farmacología Humana*. 3ª ed. Masson-Salvat, Barcelona, España, 328-341.
 82. Fatope, M y Audu, O. (1996). Bioactive ent-Kaurene Diterpenoids from *Annona senegalensis*.
 83. Fekete, T; Tumah, H; Woodwell, J; Truant, A; Satishchandran, V; Axelrod, P; Kreter, B. (2004). A comparison of serial plate agar dilution, Bauer-Kirby disk diffusion, and the vitek automicrobic system for the determination of susceptibilities of *Klebsiella* Spp., *Enterobacter* Spp., and *Pseudomonas aeruginosa* to ten antimicrobial agents,

- Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 18, 251-258.
84. Fernández, J. (2006). Funcionalización selectiva y síntesis biomiméticas mediadas por Ti^{III} de terpenoides. Trabajo de grado de doctorado en Química, no publicado, Universidad de Granada, Granada, España. Disponible: <http://digibug.ugr.es/bitstream/10481/1016/1/16157825.pdf> [consulta: 2016, enero 23].
 85. Fiege H. (2002). Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry. Sixth ed., Wiley-VCH, Weinheim.
 86. Fraga, B; Cabrera, I; Amaro-Luis, J. (2008). On the structures of the diterpenes licamichauxiioic acid A y B. *Journal of Natural Products*, 71, 1953-1956.
 87. Francis, M; Grant, P; Low, K; Weavers, R. (1976). Diterpene chemistry-VI-SeO₂/H₂O₂ oxidations of exocyclic olefins. *Tetrahedron*, 32, 95-101.
 88. Franco, L; Castro, J; Ocampo, Y; Pájaro, I; Díaz, F. (2013). Actividad antiinflamatoria, antioxidante y antibacteriana de dos especies del género *Tabebuia*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18, 34-46.
 89. Funk, C. (2001). Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoid biology. *Science*, 294, 1871-1875.
 90. García, R y Pérez R. (2003). Fitoalexinas: mecanismo de defensa de las plantas. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 9, 5-10.
 91. García, P; Braga, A; Batista, R. (2007). Occurrence, biological activities and synthesis of kaurane diterpenes and their glycosides. *Molecules*, 12, 455-483.
 92. García, A y Pérez-Urria, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*, 2, 119-145.
 93. Garcia, M. (2012). Efecto del extracto acetónico de *Agave angustifolia* Haw en un modelo de artritis experimental, en ratón albino. Trabajo de grado de Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos, no publicado, Instituto politécnico Nacional, Yautepec, México. Disponible: <http://tesis.ipn.mx:8080/xmlui/handle/123456789/13263> [consulta: 2016, abril 09].
 94. García, M; Sánchez, C; Martínez, J; Pérez, M. (2013). Actividad fitotóxica de los extractos de chile manzano (*Capsicum pubescens* R & P). *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 19, 23-33.
 95. Gilmore, T. (2006). Introduction to NF-B: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, 25, 6680-6684.
 96. Goldstein, G; Rada, F; Azocar, A. (1985). Cold hardiness and supercooling along an altitudinal gradient in andean giant rosette species. *Oecologia*, 68, 147-152.
 97. Gómez, H; González, K; Medina, J. (2011). Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 10, 182-217.
 98. González, M; Ospina, L; Rincón, J. (2011). Actividad antiinflamatoria de extractos y fracciones de *Myrcianthes leucoxila*, *Calea prunifolia*, *Curatella americana* y *Physalis peruviana* en los modelos edema auricular por TPA, edema plantar por carragenina y artritis inducida por colágeno. *BIOSALUD*, 1, 9-18.
 99. Goswami, R y Kistler, H. (2004). Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology*, 5, 515-525.
 100. Grădinaru, A; Aprotosoai, A; Trifan, A; Spac, A; Brebu, M; Miron, A. (2014). Interactions between cardamom essential oil and conventional antibiotics against *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *FARMACIA*, 62, 1214-1222.
 101. Graft, G; Anderson, L; Jaques, L; Scannell, R. (1990). Evidence for the formation of 2-hydroxyethyl esters by reaction of fatty acids with diazomethane in diethyl ether. *Chemistry and Physics of Lipids*, 53, 27-36.

102. Greenwell, M y Rahman, P. (2015). Medicinal Plants: Their Use in Anticancer Treatment. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3, 4103-4112
103. Grisham, M; d'Heuill, J; Wink, D. (1999). Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *American Journal Physioloy Gastrointestinal Liver Physiology*, 276: G315 - G321.
104. Gutiérrez, C y Droguet, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor, *BOLETÍN INTEXTER (U.P.C.)*, 122, 35-41.
105. Gutiérrez, A y Cegarra, J. (2009). La cromatografía de exclusión: análisis de la distribución de pesos moleculares en siliconas por GPC. *Boletín Intexter (U.P.C.)* 2009. N°.135, 33-40.
106. Hanson, J. (1991). Diterpenoids. In *methods in plants biochemistry*, Dey, P.M. Harborne, J.B., Ed, 7, p 263-287.
107. Hanson, J. (2002). Diterpenoids. *Natural Products Reports*, 19, 125-132.
108. Hanson, J. (2012). Diterpenoids of terrestrial origin. *Natural Products Reports*, 28, 1755-1772
109. Hanson, J. (2013). Diterpenoids of terrestrial origin. *Natural Products Reports*, 30, 1346-1356.
110. Hanson, J. (2015). Diterpenoids of terrestrial origin. *Natural Products Reports*, 32, 76-87.
111. Hasember, G. (2012). Estudio de síntesis de sales de fosfonio derivadas del ácido gálico. Trabajo de grado para optar al título de Químico, no publicado, Universidad de Chile, Santiago, Chile. Disponible: <http://www.repositorio.uchile.cl/handle/2250/111246>.
112. Hassner, A y Alexanian, V. (1978). Direct room temperature esterification of carboxylic acids. *Tetrahedron Letters*, 46, 4475- 4478.
113. He, M; Yan, J; Cao, D; Liu, S; Zhao, C; Liang, Y; Li, Y; Zhang, Z. (2013). Identification of terpenoids from *Ephedra* combining with accurate mass and in-silico retention indices. *Talanta*, 103, 116-122.
114. Hernández, R y Gally, M. (1981). *Plantas Medicinales*. Árbol editorial, S.A.de C.V. México. Impreso en Colombia. Pp 7-253.
115. Herz, W; Kulanthaivel, P; Watanabe, K. (1984). *Ent-* kauranes and other constituents of three *Heliantus* species. *Phytochemistry*, 22, 2021-2025.
116. Hesse, M; Meier, H; Zeed, B. (2007). *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*, 2° Edición. Editorial Rewiens.
117. Hinz, B y Brune, K. (2002). Cyclooxygenase-2 10 Years Later. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 300, 367-375.
118. Hirschmugl, C. (2002) *Frontiers in infrared spectroscopy at surfaces and interfaces*. *Surface Science*, 500, 577-604.
119. Holzappel, C; Van, B; De Castro, A; Marais, W; Herbst, M. (1995). A Chemotaxonomic Survev of Kaurene Derivatives in the Genus *Alepidea* (Apiaceae). *Biochemical Sistematics and Ecology*, 23, 799-803.
120. Hori, Y; Ida, T; y Mizuno, M. (2016). A comparative theoretical study of the hydride transfer mechanisms during LiAlH₄ and LiBH₄ reductions. *Computational & Theoretical Chemistry*, 1076, 86-93.
121. Huang, R., Zou, P., Zhang, Q., Wang, C., Shen, Y. (2016). Intramolecular charge transfer between novel ProDOT- σ -TTF. *Microelectronic Engineering*, 152, 48-51.

122. Hueso-Falcón, I; Girón, N; Velasco, P; Amaro, L; Ravelo, A; De las Heras, B; Hortelano, S; Estevez, A. (2010). Synthesis and induction of apoptosis signaling pathway of *ent*-kaurane derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18, 1724-1735.
123. Hueso-Falcón, I; Cuadrado, I; Cidre, F; Amaro, L; Ravelo, A; Estevez, A; De las Heras, B; Hortelano, S. (2011). Synthesis and anti-inflammatory activity of *ent*-kaurene derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46, 1291-1305.
124. Ibañez, J; Usubillaga, A. (2006). The essential oil of *Espeletia schultzei* of different altitudinal populations. *Flavour and Fragrance Journal*, 21, 286-289.
125. Jogersen, J y Ferraro, M. (2009). Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases*, 49, 1749-55.
126. Johansson, A; Olsson, T; Bergström, G. (1996). A short and selective synthesis of (*S*)-*geranyl*citronellol via conjugate addition of a functionalized copper reagent to 2-substituted *exo-bornyl* crotonates. *Tetrahedron Letters*, 37, 7127-7128.
127. Kataev, V; Khaybullin, R; Sharipova, R; Strobukina, Y. (2011). *Ent*-Kaurane diterpenoids and glycosides: Isolation, Properties, and Chemical Transformations. *Review Journal of Chemistry*, 1, 93-160.
128. Katewa, S; Chaudhary, B; Jain, A. (2004). Folk herbal medicines from tribal area of Rajasthan, India. *Journal Ethnopharmacol*, 92, 41-46.
129. Lachman, J; Fernández, E; Orsák, M. (2003). Yacon [*Smallanthus sonchifolia* (Poepp. Et Endl.) H. Robinson] chemical composition and use – a review. *Plant Soil Environ*, 49 (6), 283-290.
130. Le Filliatre, G; Sayah, S; Latournerie, V; Renaud, J; Finet, M; Hanf, R. (2001). Cyclooxygenase and lipoxygenase pathways in mast cell dependent-neurogenic inflammation induced by electrical stimulation of the rat saphenous nerve. *British Journal of Pharmacology*, 132, 1581-1589.
131. Leal, M. (2009). Evaluación del efecto antiinflamatorio de un concentrado de frutos de *aristotelia chilensis* en un modelo de inflamación aguda subplantar inducida por carragenina en ratas. Trabajo de grado para obtener el título de Médico Veterinario, no publicado, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile. Disponible en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2009/fvl435e/doc/fvl435e.pdf>. [consulta: 2016, mayo 18].
132. Lee, E; Gershenzon, J; Mabry, T. (1984). Terpenoids of *Helianthus nuttallii*. *Journal of Natural Products*, 47, 1021-1023.
133. Li, X; Dong, M; Liu, Y; Shi, Q; Kiyota, H. (2007). Structures and Biological properties of the chemical constituents from the genus *Wedelia*. *Chemistry & Biodiversity*, 4, 823-836.
134. Li, J y Vederas, J. (2009). Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier?. *Science*, 325, 161-165.
135. Li, Q; Tan, W; Zhang, C; Gu, G; Guo, Z. (2015). Novel triazolyl-functionalized chitosan derivatives with different chain length of aliphatic alcohol substituent: design, synthesis, and antifungal activity. *Carbohydrate Research*, 418, 44-49.
136. Londoño, A., Guillermo, J., García, C., Carrillo, L., Quintero, M., García, S., Mendoza, M., Cruz, A. (2008). Estudio de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo de la abeja *Apis mellifera* proveniente del estado de México. *Tecnología en Marcha*, 21, 49-55.
137. López, N; Miguel, M; Aleixandre, A. (2012). Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud. *Nutrición Clínica y Diética Hospitalaria*, 32, 81-91.

138. Luteyn, J. (2000). Parámos: A checklist of plant diversity, geographical distribution and botanical literature, Memoirs of the New York Botanical Garden, 84.
139. Ma, B; Wen, C; Gao, Y; Ren, F; Wang, F; Liu, J. (2013). *ent*-Kaurane diterpenoids from the plant *Wedelia trilobata*. *Natural Products Bioprospec*, 3, 107-111.
140. Maldonado, H; Guzmán, E; Márquez, S; Tupayachi, A; Albán, J. (2012). Estudio de sapogeninas esteroidales de especies peruanas del género *Dioscorea*. *Revista de Sociedad de Química Peruana*, 78, 208-218.
141. Mann, K; Lewis, N; Miskowski, V; Erwin, D; Hammond, G; Gray, H. (1977). Allylic Oxidation of Olefins by Catalytic and Stoichiometric Selenium Dioxide with tert-Butyl Hydroperoxide. *Journal of the American Chemical Society*, 99, 5527-5528.
142. Marcano, D y Hasegawa, M. (2002). Fitoquímica orgánica. Universidad Central de Venezuela Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Caracas, Venezuela, 588pp.
143. Marín, Y y Pedrozo, J. (1997). Evaluación de la toxicidad de *Espeletia killipi*, Cuatr, sobre el gusano blanco (*Pemnotrypes vorax*, H) que afecta tubérculos de papa *Solanum tuberosum*, L). Memorias V Congreso Colombiano de Fitoquímica, Medellín.
144. Marquina, S; Parra, J; González, M; Zamilpa, A; Escalante, J; Trejo-Hernández, M; Álvarez, L. (2009). Hydroxylation of the diterpenes *ent*-kaur-16-en-19-oic and *ent*-beyer-15-en-19-oic acids by the fungus *Aspergillus niger*. *Phytochemistry*, 70, 2017-2022.
145. Marti, B; Lucena, F; Arribas, S; Hernández, J. (2003). Química Analítica Cualitativa, Editorial Thompson, España, 321-322.
146. Matuschek, E; Brown, D; Kahlmeter, G. (2014). Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*, 20, 255-266.
147. Maurya, R; Ravi, M; Singh, S; Yadav, P. (2012). A review on cassane and norcassane diterpenes and their pharmacological studies. *Fitoterapia*, 83, 272-280.
148. McMurry, J. (2012). Química Orgánica. 8ª Edición. México. CENGAGE Learning Editores S.A.
149. Meccia, G; Quintero, P; Rojas, L; Usubillaga, A; Carmona, J. (2010). Análisis de los ácidos kaurénicos presentes en *Espeletia angustifolia* Cuatrec. de los Andes venezolanos. *Avances en Química*, 5, 45-49.
150. Meinzer, F; Goldstein, G; Rundel, P. (1985). Morphological changes along an altitude gradient and their consequences for an andean giant rosette plant. *Oecologia*, 65, 278-283.
151. Mendoza, D. (2004). Malaria y la resistencia a antimalaricos. *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud*, 1, 114-123.
152. Mestres, J; Usubillaga, A; Diaz, L; Larroque, M; Vian, L; Marti-Mestres, G. (2011). Assessment of in vitro dermal absorption of the kaurenic acid from *Coesepetia moriziana* extracts. *Fitoterapia*, 82, 585-590.
153. Meyer, B; Ferrigni, N; Putnam, J; Jacobsen, L; Nichols, D; McLaughlin, J. (1982). Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plants constituents. *Journal of Medicinal plant Research*, 45, 31-34.
154. Molina, E. (2005). Síntesis enantoselectiva de guayanos y norguayanos naturales a partir de (+) –Dihidrocarvona. Trabajo de grado de doctorado, no publicado, Universidad de Valencia, Valencia, España. Disponible: <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/10287/molina.pdf?sequence=1> [consulta: 2015, diciembre 17].
155. Monasterio, M. (1979). El páramo desértico en el altiano de Venezuela. El medio ambiente paramo. (ed. por M.L. Salgado-Labouriau), pp. 117-146. Ediciones del CEA-

- IVIC, Caracas. Venezuela.
156. Mondolis, E; Morán, J; Rojas, F; López, J; Abad, A; Amaro, J; Guerrero, E. (2013). Vasorelaxant effects in aortic rings of eight diterpenoids isolated from three Venezuelan plants. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23, 769-775.
 157. Morais, M; Dworakowska, S; Reis, A; Gouveia, L; Matos, C; Bogdał, D; Łukasik, R. (2014). Chemical and biological-based isoprene production: Green metrics. *Catalysis Today*, 239, 38-43.
 158. Muñoz, J. (2014). Nuevas reacciones promovidas/catalizadas por [TiCp₂Cl]. Aplicación a la síntesis de productos naturales de interés. Trabajo de grado de doctorado, no publicado, Universidad de Granada, Granada, España. Disponible: <http://digibug.ugr.es/bitstream/10481/34183/1/24033182.pdf> [consulta: 2016, enero 17].
 159. National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2000). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: Seventh edition: Approved standard M2–A7. Wayne, PA: NCCLS.
 160. National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2001). Performance standard for antimicrobial susceptibility testing. Document M100-S11. Wayne, PA: NCCLS.
 161. National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2004). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing. Fourteenth informational supplement. M100-514. Wayne, PA: NCCLS.
 162. Nathan C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature*, 420, 846-852.
 163. Neises, B., Steglich, W. (1978). Simple method for the esterification of carboxylic acids, *Angewandte Chemie International Edition in English*, 17, 522-524.
 164. Ni, G; Fu, N; Zhang, D; Yang, H; Chen, X; Yu, D. (2015). An unusual dihydrobenzofuroisocoumarin and ent-kaurane diterpenoids from *Pteris multifida*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 17, 423-429.
 165. Norouzi, S; Mohseni, M; Yahyaei, H. (2016). Preparation and characterization of an acrylic acid modified polyhedral oligomeric silsesquioxane and investigating its effect in a UV curable coating. *Progress in Organic Coatings*, 99, 1-10.
 166. Núñez, M; Reyes, C; Jiménez, I; Hayashi, H; Tokuda, H; Bazzocchi, I. (2011). *ent*-Rosane and abietane diterpenoids as cancer chemopreventive agents. *Phytochemistry*, 72, 385-390.
 167. Ogwen, A; Ojwach, S; Akerman, M. (2014). Cationic pyridyl (benzoazole) ruthenium (II) complexes: efficient and recyclable Catalysts in Biphasic Hydrogenation of Alkenes and Alkynes. *Applied Catalysis A: General*, 486, 250-258.
 168. Ohkoshi, E; Kamo, S; Makino, M; Fujimoto, Y. (2004). *ent*-kaurenoic acids from *Mikania Hirsutissima* (Compositae). *Phytochemistry*, 65, 885-890.
 169. Olivé, J; Casas, J; Garcia, J; Guadayol, J. (1994). Cromatografía i electroforesi. Edicions UPC. Barcelona.
 170. Oliveira, M. (2011). Efeito de extratos da alga marinha *Caulerpa mexicana* em modelos de inflamação em murinos. Trabajo de grado de Maestría en Ciencia Farmacéuticas, no publicado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil. Disponible: <https://repositorio.ufrn.br/jspui/handle/123456789/13461?locale=en> [consulta: 2016, marzo 08].
 171. Organización Mundial de la Salud (1979). The selection of essential drugs. *Who Technical Reports series*, 641, 1-44.
 172. Ordaz, G; D'Armas, H; Yáñez, D; Hernández, J; Camacho, A. (2009). Metabolitos secundarios, letalidad y actividad antimicrobiana de los extractos de tres corales y tres moluscos marinos de Sucre, Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, 58, 677-688.

173. Otto, A; Simoneit, B. (2001). Chemosystematics and diagenesis of terpenoids in fossil conifer species and sediment from the Eocene Zeitz formation, Saxony, Germany. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 65, 3505-3527.
174. Page, E; Balza, F; Nishida, T; Towers, N. (1992). Biologically active diterpenes from *Aspilia mossambicensis*, a chimpanzee medicinal plant. *Phytochemistry*, 31, 3437-3439.
175. Paiva, L; Gurgel, L; Silva, R; Tome, A; Gramosa, N; Silveira, E; Santos, F; Rao, V. (2003). Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. *Vascular Pharmacology*, 39, 303-307.
176. Palazzini, J; Alberione, E; Torres, A; Donat, C; Köhl, J; Chulze, S. (2016). Biological control of *Fusarium graminearum* sensu stricto, causal agent of *Fusarium* head blight of wheat, using formulated antagonists under field conditions in Argentina. *Biological Control*, 94, 56-61.
177. Peixoto, A.; de Melo, D.; Fernandes, T.; Fonseca, Y.; Gusevskaya, E.; Silva, A.; Contreras, R.; Reyes, M.; Usubillaga, A.; dos Santos, E.; Pereira, M.; Bayón, J. (2008). Rhodium catalyzed hydroformylation of kaurane derivatives: a route to new diterpenes with potential bioactivity. *Applied Catalysis A: General*, 340, 212-219.
178. Peixoto, P; Severin, R; Tseng, C; Chen D. (2011). *Angewandte Chemie International Edition*, 50, 3013-3016.
179. Peña, A; Alarcón, L; Usubillaga, A. (2008). *Ent*-15 α -(3-methoxy-3-methyl-butanoyl)-kaur-16-en-19-oic acid a new *ent*-kaurenic acid derivative isolated from *Coespeletia moritziana* (Sch. Bip. ex Wedd) Cuatrec. (Asteraceae). *Avances en Química*, 3, 95-97.
180. Peña, A; Alarcón, L; Usubillaga, A; Velasco, J; Delgado, P. (2009). Contribución a los ácidos Kaurénicos aislados a partir de *Coespeletia moritziana* Sch. Bip. ex Wedd. (Frailejón) y su actividad antibacteriana. *Revista AGROLLANIA*, Enero-Diciembre, 77-74.
181. Peña, A; Alarcón, L; Baptista, J; Aparicio, R; Villasmil, T; Usubillaga, A. (2012). A Phytochemical Analysis of *Espeletia nana* Cuatrec. a Midget Espeletiinae from Paramo Ortiz, Venezuela. *Avances en Química*, 7, 187-192.
182. Peña, A; Alarcón, L; Aparicio, R; Rojas, J; Usubillaga, A. (2014). On the allylic hydroxylation of *ent*-kaurenic acid with SeO₂. *Avances en Química*, 9, 7-13.
183. Pérez, O y Lazo, F. (2010). Ensayo de *Artemia*: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Revista de Protección Vegetal*, 22, 34-43.
184. Pineda, J. (2006). Nueva ruta de síntesis de la 6-metoxi-5-metil- α -tetralona y la 6-metoxi-2,5-dimetil- α -tetralona, intermediarios para la obtención de terpenoides y esteroides. Trabajo de grado de licenciatura en Química, no publicado, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela. Disponible: http://www.tesis.ula.ve/pregrado/tde_busca/archivo.php?codArchivo=1307 [consulta: 2016, febrero 10].
185. Piozzi, F; Sprio, V; Passannanti, S; Mondelli, R. (1968). Estructure of grandiflorenic acid. *Gazzetta Chimica Italiana*, 98, 907-910.
186. Pochettino, M; Arenas, P; Sánchez, D; Correa, R. (2008). Conocimiento botánico tradicional, circulación comercial y consumo de plantas medicinales en un área urbana de Argentina. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 7, 141-148.
187. Ramírez, L y Marín, D. (2009). Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*, 42, 263-268.
- Ramsay, J. (1949). A new method of freezing-point determination for small quantities.

- Journal of Experimental Biology*, 26, 57-54.
188. Requena, A y Zuñiga, J. (2004). Espectroscopia. Editorial Pearson Education S.L.
 189. Reynolds, W; Enríquez, R; Escobar, L; Lozoya, X. (1984). Total assignment of ¹H and ¹³C spectra of kauradien-9(11),16-oic acid with the aid of heteronuclear correlated 2D spectra optimized for geminal and vicinal ¹³C - ¹Hcoupling constants: or what to do when "INADEQUATE" is imposible. *Canadian Journal of Chemistry*, 62, 2421-2425.
 190. Rico, G. (2010). Evaluación del efecto antiinflamatorio de compuestos kauranos extraídos de plantas del género *Croton*. Trabajo de grado de licenciatura en Biología, no publicado, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. Disponible: [http:// 190.169.94.11:8080/jspui/handle/123456789/9299](http://190.169.94.11:8080/jspui/handle/123456789/9299) [consulta: 2016, enero 16].
 191. Ríos, J; Recio, M; Giner, R; Máñez, S. (2004). Métodos de estudio *in vivo* de extractos y productos antiinflamatorios. En Nuevas Fuentes de Antioxidantes Naturales (Rosas A, ed.), CYTED, Caracas, 107-116.
 192. Ríos, J., y Recio, M. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 80-84.
 193. Ríos, M; Leon, I. (2006). Chemical constituents and cytotoxic activity of *Smalanthus maculatus*. *Chemistry of Natural Compounds*, 42, 497-498.
 194. Robbins, S y Cotran, R. (2007). Inflamación aguda y crónica. *Patología estructural y funcional*. 7º ed. Saunders, Madrid, España, 47-46.
 195. Robles-Zepeda, R; Lozaya-Gloria, E; López, M; Villarreal, M; Ramírez-Chávez, E; Molina-Torres, J. (2008). *Montanoa tomentosa* glandular trichomes containing kaurenoic acids chemical profile and distribution. *Fitoterapia*, 80, 12-17.
 196. Robles-Zepeda, R; Lozoya-Gloria, E; López, M; Villarreal, M; Ramírez-Chávez, E; Molina-Torres, J. (2009). *Montanoa tomentosa* glandular trichomes containing kaurenoic acids chemical profile and distribution. *Fitoterapia*, 80,12-17.
 197. Rocha, D; Takahashi, J; Boaventura, M. (2009). Di- and tri- hydroxylated kaurane derivatives from microbial transformation of *ent*-kaur-16-en-19-ol by *Cephalosporium aphidicola* and their allelopathic activity on *Lactuca sativa* (Lettuce). *Eclética Química*, 34, 57-62.
 198. Rojas, J; Perea, J; Ortiz, C. (2009). Compuestos con potencial aplicación farmacológica obtenidos por biotransformación de geraniol y pineno. Revista de la Universidad Industrial de Santander. *Salud*, 41, 251-258.
 199. Rojas, J; Aparicio, R; Villasmil, T; Peña, A; Usubillaga, A. (2011). On the isomerization of *ent*-kaurenic acid. *Natural Product Communications*, 6, 935-938.
 200. Ruan, Y; Ma, B; Lia, L; Wang, X. (2014). Specific 12 α -hydroxylation of grandiflorenic acid by permeabilised fungus *Fusarium graminearum*. *Natural Product Research*, 28, 677-679.
 201. Ruiz, Y; Rodríguez, J; Arvelo, F; Usubillaga, A; Monsalve, M; Diez, N; Galindo-Castro, I. (2008). Cytotoxic and apoptosis-inducing effect of *ent*-15-oxo-kaur-16-en-19-oic acid, a derivative of grandiflorolic acid from *Espeletia schultzei*. *Phytochemistry*, 69, 432-438.
 202. Rustaiyan, A; y Sadjadi, A. (1987). Kaurene derivatives from *Alepidea amatyusia*. *Phytochemistry*, 26, 7, 2106-2107.
 203. Rubinson, K., Rubinson, J. (2004) Análisis Instrumental, Editorial Prentice Hall, España.
 204. Ruzicka, L. (1959). History of the isoprene rule. *Product Chemistry Society*, 341-360.
 205. Ryu, S; Ahn, J; Han, Y; Han, B; Kim, S. (1996). *In vitro* antitumor activity of diterpenes from *Aralia cordata*. *Archives of Pharmacal Research*, 19, 77-78.

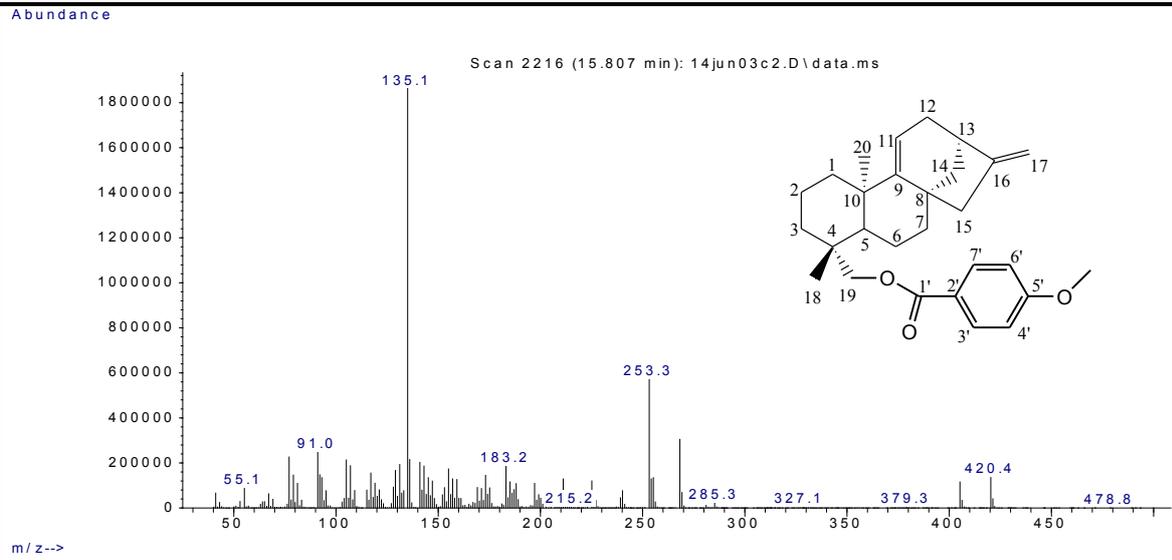
206. Sánchez, A; Fang, M; Ahmed, A; Sánchez-Delgado, R. (2014). Hydrogenation of arenes, N-heteroaromatic compounds, and alkenescatalyzed by rhodium nanoparticles supported on magnesium oxide. *Applied Catalysis A: General*, 477, 117-124.
207. Schteingart, C y Pomilio, A. (1981). Terpenoids from *wedelia buphthalmiflora*. *Phytochemistry*, 20, 2589- 2590.
208. Scortichini, M y Pia, M. (1991). Preliminary *in vitro* evaluation of the antimicrobial activity of terpenes and terpenoids towards *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.* *Journal of Applied Bacteriology*, 71, 109-112.
209. Sethi, A; Bhatia, A; Shukla D; Kumar, A; Sonker, R; Prakash, R; Bhatia, G. (2012). *Journal of Molecular Structure*, 1028, 88-96.
210. Shaabani, A; Soleimani, E; Hossein, A. (2007). A novel approach for the synthesis of aryl amides. *Tetrahedron Letters*, 48, 6137-6141.
211. Sharma, M; Thakral, N; Thakral, S. (2009). Chemistry and *in vivo* profile of *ent*-kaurene glycosides of *Stevia rebaudiana* Bertoni- An overview. *Natural Product Radiance*, 8, 181-189.
212. Sheldon, J; Balick, M; Laird, S. (1997). *Medicinal plants: ¿can utilization and conservation coexist?*. New York Botanical Garden. Nueva York, EEUU. 104 pp.
213. Silva, E; Takahashi, J; Boaventura, M; Oliveira, A. (1999). The biotransformation of *ent*-kaur-16-en-19-oic acid by *Rhizopus stolonifer*. *Phytochemistry*, 52, 397-400.
214. Silva, E; Takahashi, J; Oliveira, A. (2002). An interesting backbone rearrangement and novel derivatives from the biotransformation of trachyloban-19-oic acid by *Rhizopus stolonifer*. *Journal of Brazil Chemical Society*, 13, 101-105.
215. Sims, J y Pettus, J. (1976). Isolation of free *cis* and *trans*-phytol from the red alga *Gracilaria andersoniana* . *Phytochemistry*, 15, 1076-1077.
216. Sivagurunathan, K; Mohamed, R; Shafí, S; Ali, F; Ragavan, R. (2011). Efficient one-pot selective reduction of esters in β -ketoesters using LiHMDS and lithium aluminium hydride, *Tetrahedron Letters*, 52, 1205-1207.
217. Skoog, W., Holler, C. (2001). *Química Analítica*. 7ª edición. McGraw Hill, México.
218. Skoog, West. (2005). *Fundamentos de Química Analítica*. 8ª Edición. Ediciones PARAINFO.S.A.
219. Slimestad, R; Marston, A; Maui, S; Host, K. (1995). Larvicidal Constituents of *Melantheria albinervia*. *Planta Medica*, 61, 562-563.
220. Soares, A; Mendes, A; Taleb-Contini; Rodrigues, D. (2007) Constituents of *Mikania lasiandrae*. *Chemistry of Natural Compounds*, 43, 708-709.
221. Sobrevila, C. (1989). Effects of pollen donors on seed formation in *Espeletia schultzii* (Compositae) populations at different altitudes. *Plant Systematics and Evolution*, 166, 45-67.
222. Somova, L; Shode, F; Moodley, K; Govender, Y. (2001). Cardiovascular and diuretic activity of kaurene derivatives of *Xylopiya aethiopica* and *Alepidea amatymbica*. *Journal of Ethnopharmacology* , 77, 165-174.
223. Solis, P; Wright, C; Anderson, M; Gupta, M; Phillipson, J. (1993). A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (Brine Shrimp). *Planta Medica*, 59, 250-252.
224. Sosa-Sequera, M; Suárez, O; Daló, N, (2010). Kaurenic acid: An *in vivo* experimental study of its antiinflammatory and antipyretic effects. *Indian Journal of Pharmacology*, 42, 293-296.
225. Srivastava, S; Gupta, P; Sethi, A; Pratap, R. (2016). One pot synthesis of Curcumin-NSAIDs prodrug, spectroscopic characterization, conformational analysis, chemical reactivity, intramolecular interactions and first order hyperpolarizability by DFT method. *Journal of Molecular Structure*, 1117, 173-180.

226. Steinfeld, J. (1989). *Molecules and radiation: An introduction to modern molecular spectroscopy*, 2^o edición, MIT Press, Londres.
227. Sturm, T; Weissensteiner, W; Spindler, F. (2002). A novel class of ferrocenyl-aryl-based diphosphine ligands for Rh- and Ru-catalysed enantioselective hydrogenation. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 345, 160-164.
228. Suárez, A; Chavez, K; Blanco, Z; Compagnone, R; Tilletta, S; Torrico, F. (2013). Estudio fitoquímico de la corteza de *Croton gossypifolius* colectada en Venezuela. *Revista Latinoamericana de Química*, 41, 161-170.
229. Sun, H; Huang, S; Han Q. (2006). Diterpenoids from *Isodon* species and their biological activities. *Natural Products Reports*, 23, 673-698.
230. Sun, Z; Chen, Y; Guo, Y; Qiu, J; Zhu, C; Jin, J; Tang, G; Bu, X; Yin, S. (2015). Isolation and cytotoxicity evaluation of taxanes from the barks of *Taxus wallichiana* var. *mairei*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25, 1240-1243.
231. Suresh, A; Baburajan, P; Ahmed, M. (2015). Synthesis of primary amides by aminocarbonylation of aryl/hetero halides using non-gaseous NH₃ and CO sources. *Tetrahedron Letters*, 56, 4864-4867.
232. Swenson, J; Killgore, G; Tenover, F. (2004). Antimicrobial susceptibility testing of *Acinetobacter* spp. by NCCLS broth microdilution and Disk Diffusion Methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 5102-5108.
233. Szekanecz, Z; Szucs, G; Szanto, S; Koch, A. (2006). Chemokines in rheumatic diseases. *Curr Drug Targets*, 7, 91-102.
234. Takahashi, J; Vieira, H; Silva, E; Boaventura, M; De Oliveira, E; Chiari, E. (2002). Preparation and activity of diterpenoids against trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 12, 118-120.
235. Tapia, C. (2009). Actualización en pruebas de susceptibilidad antifúngica. *Revista Chilena de Infectología*, 26, 144-150.
236. Tirapelli, C; Ambrosio, S; Da Costa, F; De Oliveira, A. (2002). Inhibitory action of kaurenoic acid from *Viguiera robusta* (Asteraceae) on phenylephrine-induced rat carotid contraction. *Fitoterapia*, 73, 56-62.
237. Tirapelli, C; Ambrosio, S; Coutinho, S; De Oliveira, D.; Da Costa, F; De Oliveira, A. (2005). Pharmacological comparison of the vasorelaxant action displayed by kaurenoic acid and pimaradienoic acid. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 57, 997-1004.
238. Torrenegra, R. (2003). Biotransformación de diterpenos obtenidos de Asteraceas por hongos filamentosos nativos. Proyecto de investigación 193-2000. Potinfiacia Universidad Javeriana, Bucaramanga, Colombia. 1-27pp.
239. Torres, O; Espinosa, R; Saez, A; Santafé, G. (2014). Evaluación de la actividad antimalárica y citotóxica de estilrilquinolinas obtenidas a partir de 8 hidroxiquinaldina con aldehídos aromáticos. *Información Tecnológica*, 25, 91-100.
240. Trosset, J y Carbonell, P. (2015). Synthetic biology for pharmaceutical drug discovery. *Drug Design, Development and Therapy*, 9, 6285-6302.
241. Usubillaga, A; Romero, M; Aparicio, R. (2003). Kaurenic Acid in Espeletiinae. *Acta Hortoculturae*, 597, 129-130.
242. Valdés, R y Balbín, María Irene. (2000). Curso de fisiología y bioquímica vegetal. UNAH. La Habana, Cuba. 89 p.
243. Valencia, A.; Wens, A.; Ponce-Monter, H.; Pedron, N.; Gallegos, A.; Quijane, A.; Calderon, J.; Gómez, F.; Rios, T. (1986). Zoapatle XII. *In vitro* effect of kaurenoic acid isolated from *Montana frutescens* and two derivatives upon human spermatozoa. *Journal of Ethnopharmacology*, 18, 89-94.

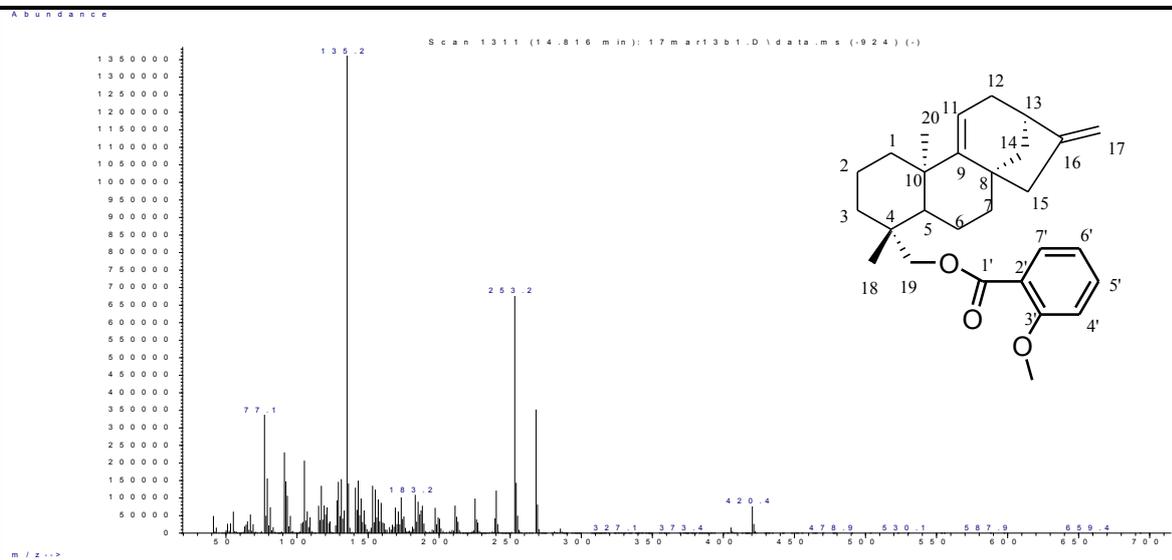
244. Velandia, J y De Carvalho, M. (1998). Ácido *ent-16 α ,17*-diidroxicauran-19-óico aislado de *Ouratea semiserrata* e os desafios estereoquímicos dos carbonos quirais C-4 e C-16. *Química Nova*, 21, 397-404.
245. Verma, N y Khosa, R. (2015). Chemistry and biology of genus *Wedelia* Jacq.: A review. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 6, 71-90.
246. Vetrivelan, S., Subasini, U, Velmurugan, C, Muthuramu, T, Shankar, J, Revathy. (2013). Anti-inflammatory activity of *Cucumis sativus* seed in carrageenan and xylene induced edema model using albino wistar rats. *International Journal Biopharmaceutical*, 1, 34-37.
247. Vieira, H; Takahashi, J; Oliveira, A; Chiari, E; Boaventura, A. (2002). Novel derivatives of kaurenoic acid: preparation and evaluation of their trypanocidal activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 13, 151-157.
248. Vieira, H; Takahashi, J; Pimenta, L; Boaventura, M. (2005). Effects of kaurane diterpene derivatives on germination and growth of *Lactuca sativa* seedlings. *Zeitschrift für Naturforschung*, 60c, 72-78.
249. Villa-Ruano, N; Betancourt-Jiménez, M; Lozoya-Gloria, E. (2009). Biosynthesis of uterotonic diterpenes from *Montanoa tomentosa* (Zoapatle). *Journal of Plant Physiology*, 166, 1961-1967.
250. Villa-Ruano, N; Betancourt-Jiménez, M y Lozoya-Gloria, E. (2010). cDNA isolation and gene expression of kaurene oxidase from *Montanoa tomentosa* (Zoapatle). *Revista Latinoamericana de Química*, 38, 81-88.
251. Villa-Ruano, N. (2013). Ensayos distintivos de zoapatle mexicano y su metabolismo secundario. *Temas de Ciencia y Tecnología*, 17, 3-9.
252. Villar del Fresno, A. (1999). Farmacognosia general. Editorial Síntesis. Madrid, 335pp.
253. Wade, L. (2004). Química Orgánica. 5^{ta} Edición. México, Editorial Prentice Hall Hispanoamericana, S.A. de C.V.
254. Xiao, H y Zhong. (2016). Production of Useful Terpenoids by Higher-Fungus Cell Factory and Synthetic Biology Approaches. *Trends in Biotechnology*, tomado el 09 de febrero del 2016 de <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.12.007>
255. Yong Quian; Hong-Jia Zhang; Hao Zhang; Chen Xu; Jing Zhao; Hai-Liang Zhu. (2010). Synthesis, molecular modeling, and biological evaluation of cinnamic acid metronidazole ester derivatives as novel anticancer agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18, 4991-4996.
256. Zamora-Martínez, M; y De Pascual C. (1992). Medicinal plants used in some rural populations of Oaxaca, Puebla and Veracruz, Mexico. *Journal of Ethnopharmacology*, 35, 229-251.
257. Zhang, H; Wynne, G; Mander, L. (2001). Synthesis of *ent-9 α ,15 α* -cyclokaurene from grandiflorenic acid. *ARKIVOC*, viii, 40-58.

X. ANEXOS

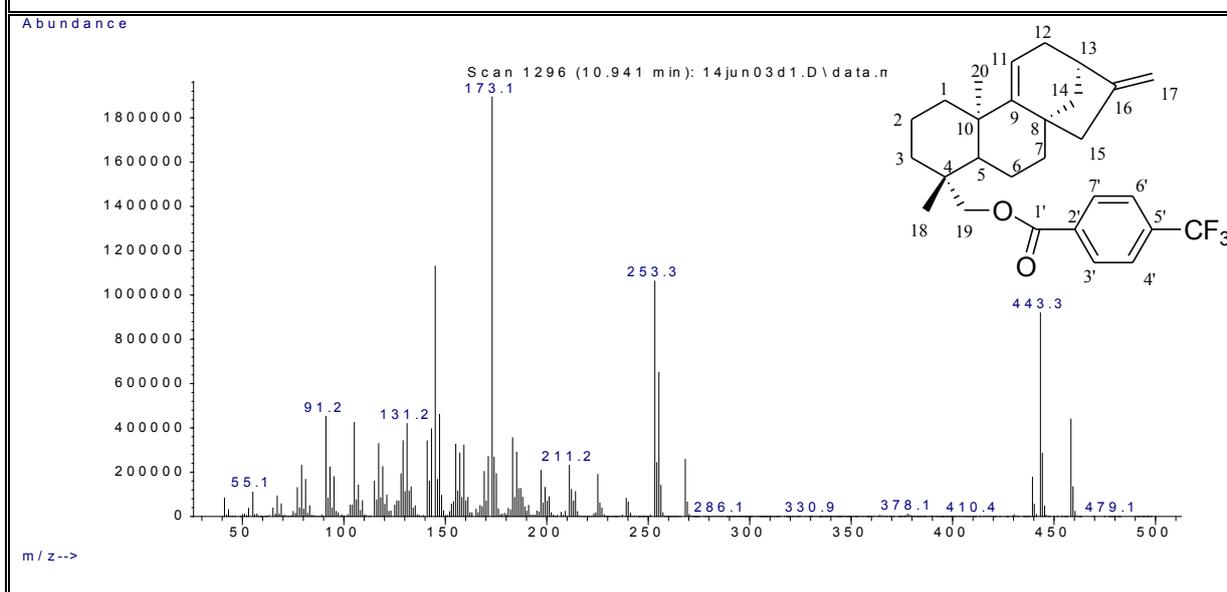
Anexo 1. Espectro de Masas (impacto electrónico) del
9(11),16-dieno-19-(4-metoxibenzoil)-*ent*-kaureno [III]



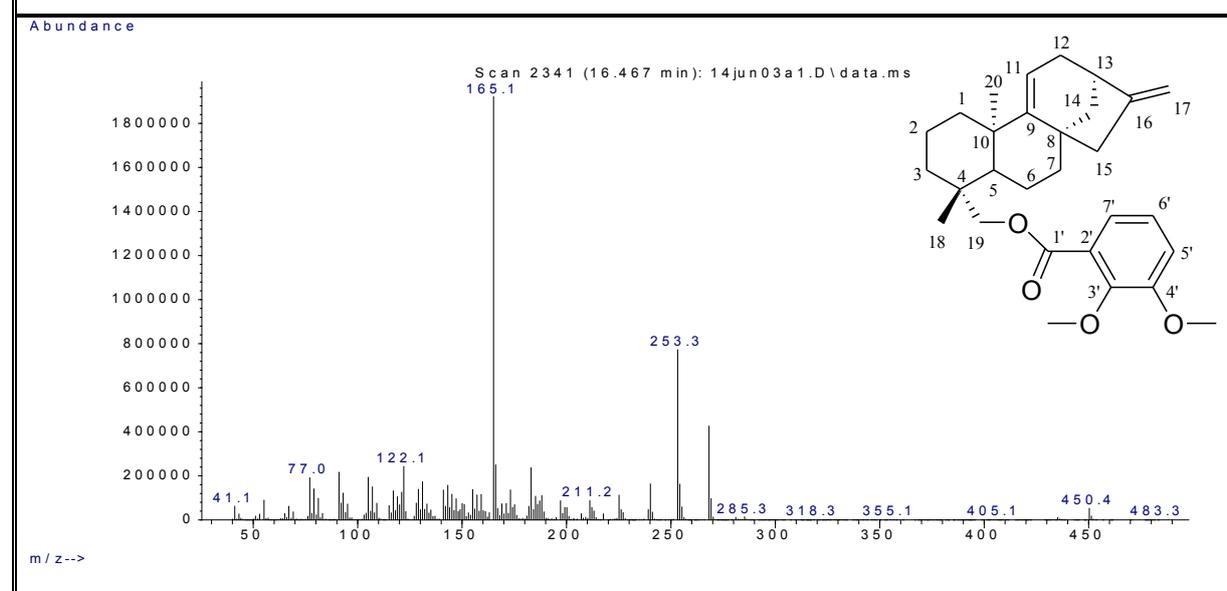
Anexo 2. Espectro de Masas (impacto electrónico) del
9(11),16-dieno-19-(2-metoxibenzoil)-*ent*-kaureno [IV]



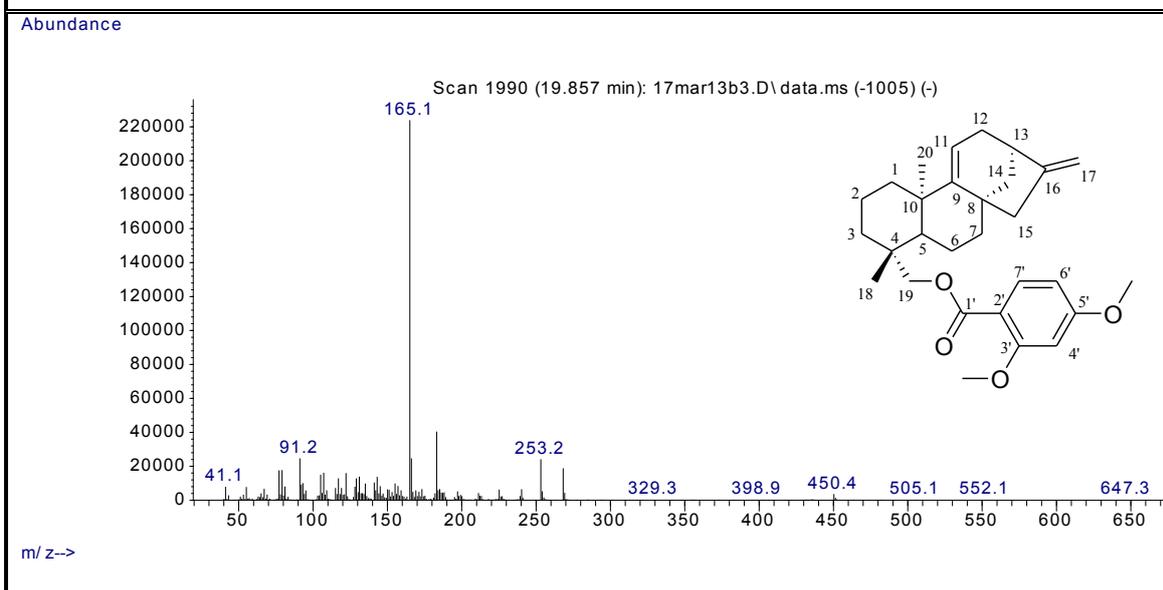
Anexo 3. Espectro de Masas (impacto electrónico) del
9(11),16-dieno-19-(4-trifluorometilbenzoil)-*ent*-kaureno [V]



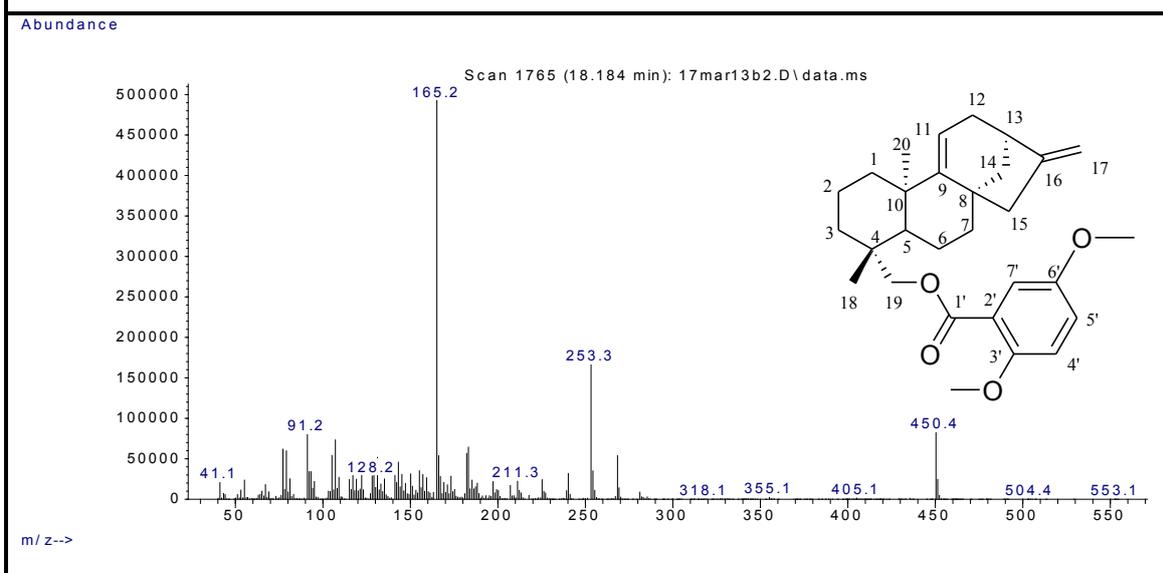
Anexo 4. Espectro de Masas (impacto electrónico) del
9(11),16-dieno-19-(2,3-dimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [VI]



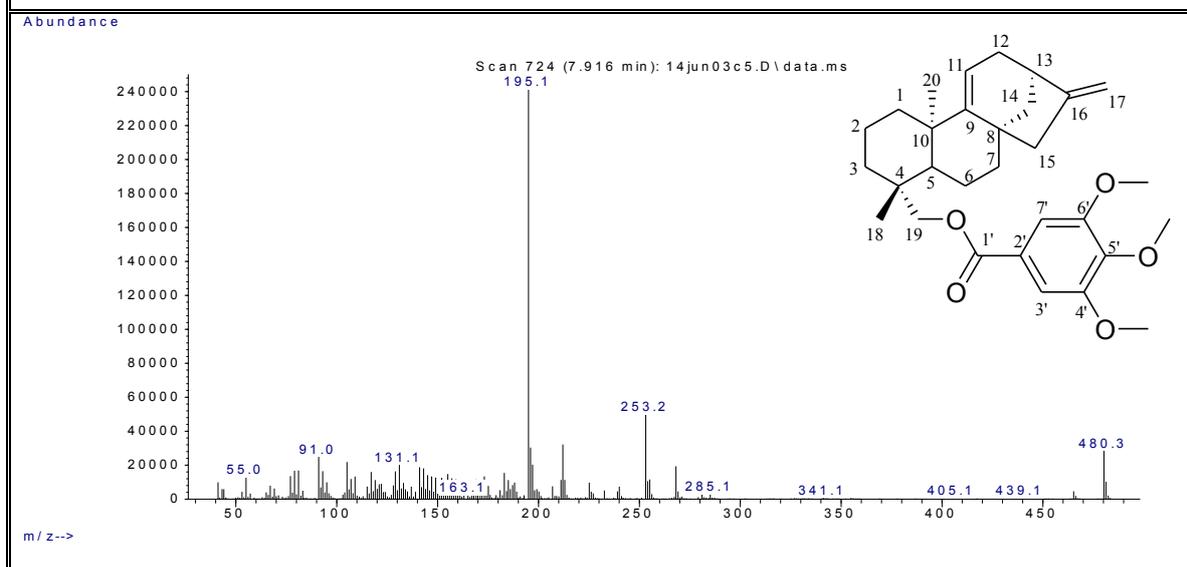
Anexo 5. Espectro de Masas (impacto electrónico) del
9(11),16-dieno-19-(2,4-dimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [VII]



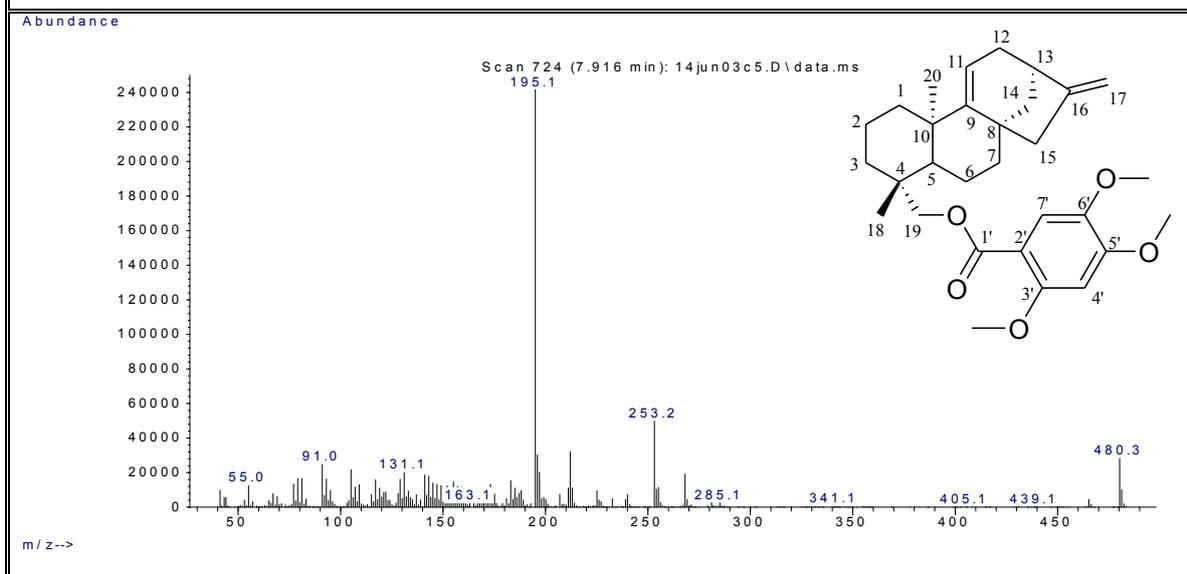
Anexo 6. Espectro de Masas (impacto electrónico) del
9(11),16-dieno-19-(2,5-dimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [VIII]



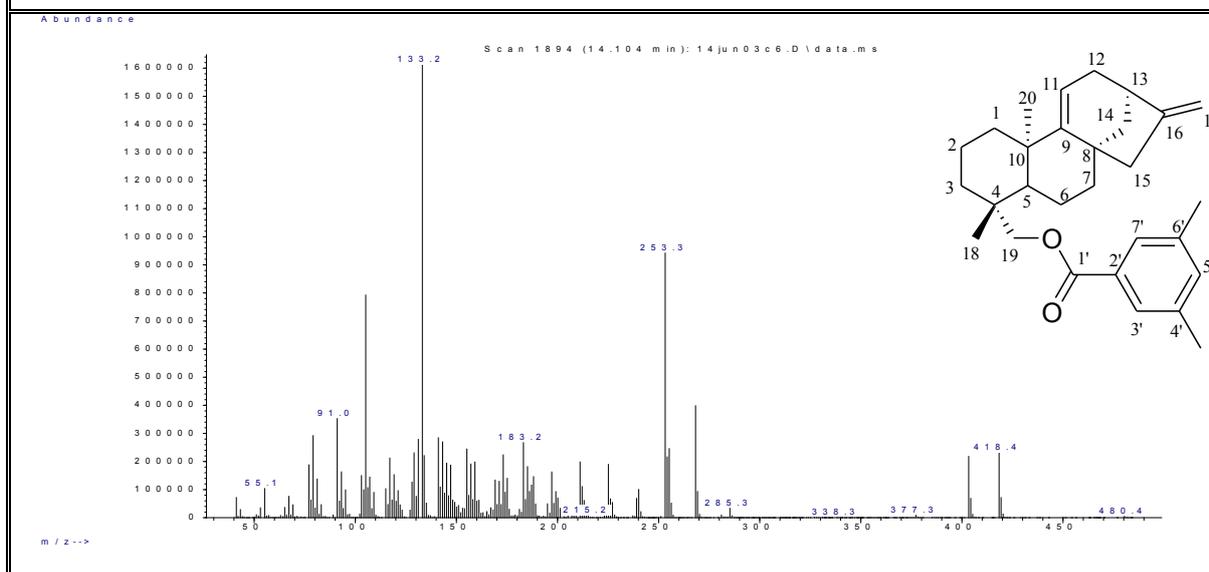
Anexo 7. Espectro de Masas (impacto electrónico) del
9(11),16-dieno-19-(3,4,5-trimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [IX]



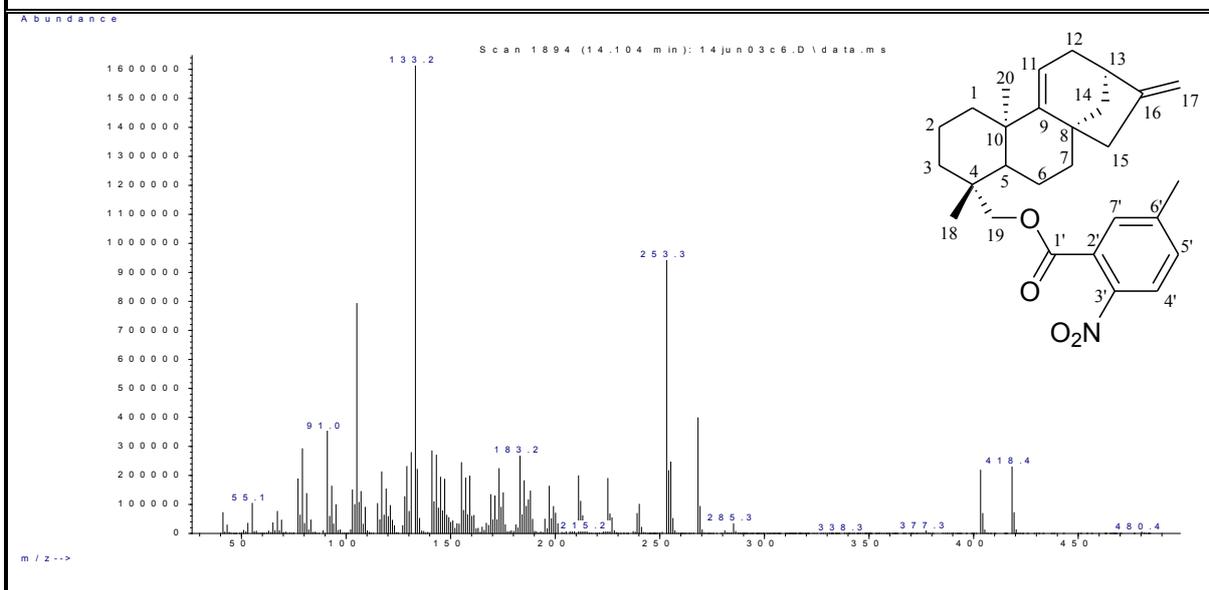
Anexo 8. Espectro de Masas (impacto electrónico) del
9(11),16-dieno-19-(2,4,5-trimetoxibenzoil)-*ent*-kaureno [X]



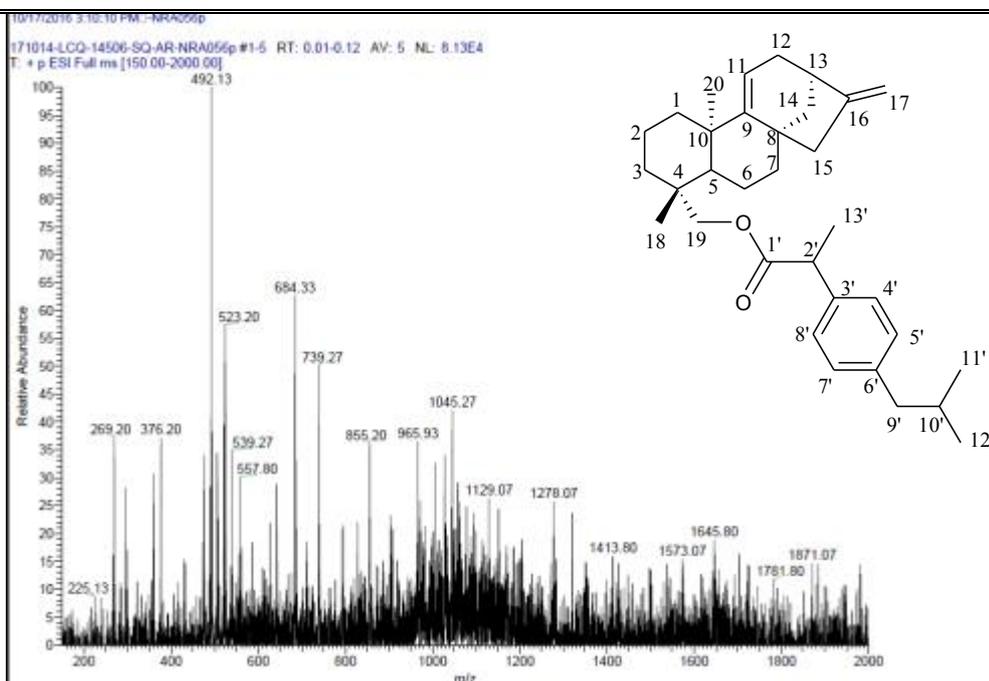
Anexo 9. Espectro de Masas (impacto electrónico) del
9(11),16-dieno-19-(2,3-dimetilbenzoil)-*ent*-kaureno [XI]



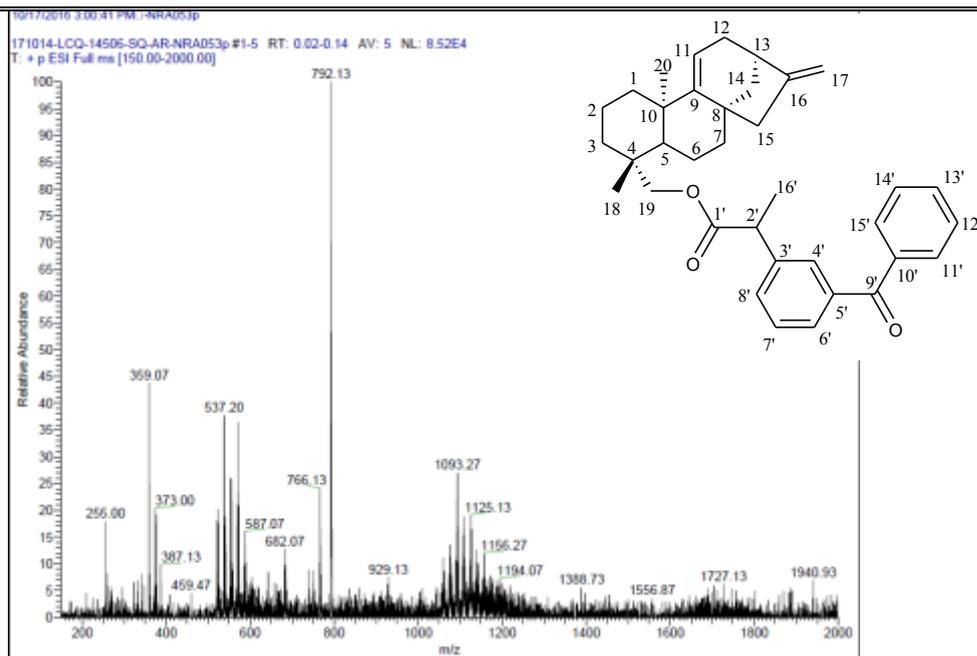
Anexo 10. Espectro de Masas (impacto electrónico) del
9(11),16-dieno-19-(5-metil-2-nitrobenzoil)-*ent*-kaureno [XII]



Anexo 11. Espectro de Masas (impacto electrónico) del
9(11),16-dieno-18-[2-(4-isobutilfenil)propil]-*ent*-kaureno [XIII]



Anexo 12. Espectro de Masas (impacto electrónico) del
9(11),16-dieno-19-[2-(3-benzofenil)propil]-*ent*-kaureno [XIV]



Anexo 13. Espectro de Masas (impacto electrónico) del
9(11),16-dieno-19-(2-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etil-*ent*-kaureno [XVI]

