

Artículo original

Derivados hemisintéticos del *ent*-kaurenol y evaluación de su actividad antimicrobiana.

Hemisynthetic derivatives of *ent*-kaurenol and evaluation of their antimicrobial activity.

Hamdan-Sánchez Mager¹, †Rojas-Fermín Luis¹, Obregón-Díaz Ysbelia^{1*}, Aparicio-Zambrano Rosa¹, Pérez-Colmenares Alida¹, Cordero Yndra², Díaz Clara³, Da Silva-Rojas Jossblerys⁴, Usubillaga Alfredo¹.

¹Instituto de Investigaciones “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro”, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes. ²Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes. ³Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, C.P. 5101 Venezuela. ⁴Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear Centro de Química, Instituto Venezolano de Investigaciones Científica (IVIC), Miranda, C.P. 1221 Venezuela.

Recibido: marzo de 2022–Aceptado: junio de 2022

RESUMEN

La obtención de seis nuevos derivados hemisintéticos a partir de *ent*-kaurenol (**I**), se realizó mediante la reacción de esterificación de Steglich empleando los ácidos *p*-cloro-fenil-acético, *o*-cloro-fenil-acético, *m*-cloro-fenil-acético, *p*-bromo-fenil-acético, nicotínico y salicílico; utilizando la combinación de dicitohexilcarbodiimida (DCC, agente de acoplamiento), 4-dimetilaminopiridina (DMAP, catalizador nucleofílico) y como solvente el diclorometano. Todos los compuestos fueron caracterizados mediante técnicas espectroscópicas de IR y RMN uni y bidimensionales, lográndose identificar como *ent*-kaur-19-O-[2'-(*p*-cloro-fenil)-carboximetil]-16-eno (**II**), *ent*-kaur-19-O-[2'-(*o*-cloro-fenil)-carboximetil]-16-eno (**III**), *ent*-kaur-19-O-[2'-(*m*-cloro-fenil)-carboximetil]-16-eno (**IV**), *ent*-kaur-19-O-[2'-(*p*-bromo-fenil)-carboximetil]-16-eno (**V**), *ent*-kaur-19-O-(*m*-piridil-carboxil)-16-eno (**VI**) y *ent*-kaur-19-O-(*o*-hidroxi-fenil-carboxil)-16-eno (**VII**). Estos compuestos no presentaron actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en

agar en pozo frente a cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans* a una concentración de 2 mg/mL.

PALABRAS CLAVE

Diterpenos, *ent*-kaureno, *ent*-kaurenol, esterificación de Steglich, actividad antimicrobiana.

ABSTRACT

Six new hemisynthetic derivatives were obtained from *ent*-kaurenol (**I**), this was performed by the Steglich esterification reaction using *p*-chloro-phenyl-acetic acid, *o*-chloro-phenyl-acetic acid, *m*-chloro-phenyl-acetic, *p*-bromo-phenyl-acetic, nicotinic and salicylic; using the combination of dicyclohexylcarbodiimide (DCC, coupling agent), 4-dimethylaminopyridine (DMAP, nucleophilic catalyst) and dichloromethane as solvent. All compounds were characterized by one- and two-dimensional NMR,

IR spectroscopic techniques and were identified as *ent*-kaur-19-*O*-[2'-(*p*-chloro-phenyl)-carboxymethyl]-16-ene (**II**), *ent*-kaur-19-*O*-[2'-(*o*-chloro-phenyl)-carboxymethyl]-16-ene (**III**), *ent*-kaur-19-*O*-[2'-(*m*-chloro-phenyl)-carboxymethyl]-16-ene (**IV**), *ent*-kaur-19-*O*-[2'-(*p*-bromo-phenyl)-carboxymethyl]-16-ene (**V**), *ent*-kaur-19-*O*-(*m*-pyridyl-carboxyl)-16-ene (**VI**) and *ent*-kaur-19-*O*-(*o*-hydroxy-phenyl-carboxyl)-16-ene (**VII**). These compounds did not exhibit antimicrobial activity by the well agar diffusion method against ATCC strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* at the concentration of 2 mg/mL.

KEY WORDS

Diterpenes, *ent*-kaurene, *ent*-kaurenol, Steglich esterification, hemisynthetic derivatives.

INTRODUCCIÓN

El *ent*-kaur-16-en-19-ol denominado *ent*-kaurenol es un diterpeno tetracíclico que fue sintetizado por primera vez por Mori y cols. (1966), este compuesto se detectó inicialmente en el endospermo de *Echinocystis macrocarpa* Greene (Cucurbitaceae), como uno de los productos intermediarios en la bioconversión del *ent*-kaureno en ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico en la biosíntesis de las giberelinas [1,2]. El aislamiento y caracterización como producto natural lo realizaron por primera vez Piozzi y cols. (1971) a partir de *Espeletia grandiflora*, posteriormente fue obtenido de *Anona squamosa* L. [3,4].

Por ser el *ent*-kaurenol uno de los precursores de las giberelinas, está presente en todas las plantas [3]; en tal sentido, se ha reportado en *Euphorbiaceae xerophilic* (*Ricinocarpus*, *Beyeria*) y en especies de la subtribu *Espeletiinae* como *Espeletia semiglobulata*, *Espeletia nana* y *Espeletopsis angustifolia* de las cuales existen estudios que indican que la fracción neutra de los extractos apolares de diferentes partes de estas plantas contiene un 30,0%, 7,1%; y 5,7% de *ent*-kaurenol, respectivamente [5-7]. Investigaciones preliminares reportan interesantes actividades

farmacológicas del *ent*-kaurenol como es la actividad antiparasitaria frente al *Trypanosoma cruzi* al inhibir la enzima transcriptasa inversa [8,9], otros estudios señalan que este diterpeno estimula la producción de corticosterona y aumenta el efecto estéreo diogénico en células adrenales y granulosa de ratas y de aves [10-12].

Existe un número importante de derivados hemisintéticos del *ent*-kaurenol, Baptista y cols. (2007) lograron obtener derivados epoxidados y glicosilados como *ent*-16,17-epoxi-19 α -hidroxi-kaurano, *ent*-19 α -acetoxi-kaur-16-eno, *ent*-19 α -acetoxi-16,17-epoxi-kaurano y el 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosido de *ent*-kaurenilo [13]. Asimismo, Aparicio y cols. (2007) reportan la preparación del *ent*-15 α ,19 α -dihidroxi-kaur-16-eno y *ent*-15,16-epoxi-17,19 α -dihidroxi-kaurano al tratar el *ent*-kaurenol con SeO₂/H₂O₂ [14]. De igual modo, Hueso y cols. (2011) realizaron esterificaciones del *ent*-kaurenol obteniendo dos derivados hemisintéticos: *ent*-19 α -acetoxi-kaur-16-eno y el dímero del ácido *ent*-kaur-19 β -(19 α -hidroxi-16-kaurenil)-16-en-sulfínico [15].

La presente investigación reporta la obtención y caracterización de seis nuevos derivados a partir de *ent*-kaurenol mediante la reacción de esterificación de Steglich empleando los ácidos *p*-cloro-fenil-acético, *o*-cloro-fenil-acético, *m*-cloro-fenil-acético, *p*-bromo-fenil-acético, nicotínico y salicílico. Siendo este un método muy conveniente para la síntesis de una amplia variedad de ésteres, además de ser una reacción versátil que puede ser aplicada a una amplia variedad de ácidos y alcoholes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Procedimientos generales: Los puntos de fusión se determinaron en un equipo Fisher Johns y no están corregidos. Los espectros infrarrojo (IR) se realizaron en un espectrófotometro Perkin Elmer Spectrum versión 10.03.06. Modelo de instrumento: Spectrum two, sobre celdas de NaCl. Los experimentos de resonancia magnética nuclear (¹H, ¹³C, DEPT-135, H-H-COSY, HMQC y HMBC) se realizaron en un espectrómetro Bruker-Ascend TM Biospin de 600 MHz en soluciones de CDCl₃. Para cromatografía en capa fina se usaron

placas de gel de sílice Merck 60 F254 y para cromatografía de columna gel de sílice Merck de 230-400 Mesh, la elución se llevó a cabo con una mezcla de Hexano:CH₂Cl₂ (80:20). Los ácidos *p*-cloro-fenil-acético, *o*-cloro-fenil-acético, *m*-cloro-fenil-acético, *p*-bromo-fenil-acético, nicotínico y salicílico se adquirieron de la compañía Aldrich (Milwaukee, USA). Otros reactivos como diciclohexilcarbodiimida (DCC) y 4-dimetilaminopiridina (DMAP) se adquirieron de la compañía Merck y no se purificaron antes de usarlos. Se utilizó hexano, diclorometano, acetona y acetato de etilo grado técnico previa destilación.

Obtención del *ent*-kaur-16-en-19-ol (I): El compuesto **I**, denominado comúnmente *ent*-kaurenol fue obtenido de las partes aéreas de *Espeletia semiglobulata* recolectada en el páramo de Piedras Blancas, a 13 Km del Pico de El Águila en la vía de Piñango, Estado Mérida, según lo descrito previamente por Baptista y cols. (2007), pf 141-142°C, idéntico a una muestra auténtica (pf, CCF, IR, EM, RMN-¹H, RMN-¹³C) [13].

Procedimiento general de reacción para la obtención de los derivados del *ent*-kaur-16-en-19-ol (I): Para obtener los derivados esterificados del *ent*-kaur-16-en-19-ol, se procedió a colocar 10 mL de CH₂Cl₂ anhidro a una temperatura de 0 °C, luego se agregó 1 equivalente los siguientes ácidos *p*-cloro-fenil-acético (295,60 mg, 1,733 mmol), *o*-cloro-fenil-acético (295,60 mg, 1,733 mmol), *m*-cloro-fenil-acético (295,60 mg, 1,733 mmol), *p*-bromo-fenil-acético (372,70 mg, 1,733 mmol), nicotínico (213,30 mg, 1,733 mmol) y salicílico (239,40 mg, 1,733 mmol) respectivamente para la obtención de cada derivado, y se agitó hasta completa disolución, posteriormente se adicionó 1 equivalente del *ent*-kaurenol (**I**) (500,00 mg, 1,733 mmol) y se continuó agitando durante aproximadamente 30 minutos para luego añadir 0,1 equivalentes de N,N-dimetilaminopiridina (DMAP, 21,1 mg, 0,17 mmol) y 1,1 equivalentes de diciclohexilcarbodiimida (DCC, 238,30 mg, 1,90 mmol), seguidamente la mezcla de reacción se colocó bajo una atmósfera de argón (Ar) y se dejó en agitación durante 24 horas, a temperatura ambiente. La mezcla resultante se lavó con ácido clorhídrico (0,5 N) y con una solución saturada de bicarbonato de sodio (15 mL), consecutivamente se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 20 mL). La fase orgánica

se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se llevó a sequedad en un rotavapor. Los residuos de cada reacción se purificaron sobre una columna de gel de sílice utilizando como fase móvil una mezcla de Hexano:CH₂Cl₂ (80:20), hasta la obtención de los compuestos puros.

Obtención del *ent*-kaur-19-O-[2'-(*p*-cloro-fenil)-carboximetil]-16-eno (II): El compuesto **II** se presentó como un sólido blanco cristalino (444,00 mg, 58,09% de rendimiento), p.f. 77-79°C; IR (Celda NaCl, ν_{\max} cm⁻¹) 3065 (-C-H sp²), 1732 (C=O), 1606 y 1492 (C=C), 1249 (-C-O); RMN-¹H (CDCl₃, 600 MHz, Tabla 1); RMN-¹³C (CDCl₃, 150 MHz, Tabla 2).

Obtención del *ent*-kaur-19-O-[2'-(*o*-cloro-fenil)-carboximetil]-16-eno (III): El derivado **III** se presentó como un sólido blanco cristalino con un peso de 604,00 mg lo que representó un 79,02% del rendimiento de la reacción, p.f. 96-98°C; IR (Celda NaCl, ν_{\max} cm⁻¹) 3152 (-C-H sp²), 1734 (C=O), 1597 y 1402 (C=C), 1249 (-C-O); RMN-¹H (CDCl₃, 600 MHz, Tabla 1); RMN-¹³C (CDCl₃, 150 MHz, Tabla 2).

Obtención del *ent*-kaur-19-O-[2'-(*m*-cloro-fenil)-carboximetil]-16-eno (IV): El compuesto **IV** se obtuvo 639,00 mg (83,60% del rendimiento) como un líquido viscoso amarillo; IR (Celda NaCl, ν_{\max} cm⁻¹) 3152 (-C-H sp²), 1733 (C=O), 1592 y 1405 (C=C), 1250 (-C-O); RMN-¹H (CDCl₃, 600 MHz, Tabla 1); RMN-¹³C (CDCl₃, 150 MHz, Tabla 2).

Obtención del *ent*-kaur-19-O-[2'-(*p*-bromo-fenil)-carboximetil]-16-eno (V): El compuesto **V** (254,00 mg, 30,18% del rendimiento) como sólido blanco cristalino, p.f. 70-72°C; IR (Celda NaCl, ν_{\max} cm⁻¹) 3093 (-C-H sp²), 1718 (C=O), 1591 y 1402 (C=C), 1291 (-C-O); RMN-¹H (CDCl₃, 600 MHz, Tabla 1); RMN-¹³C (CDCl₃, 150 MHz, Tabla 2).

Obtención del *ent*-kaur-19-O-(*m*-piridil-carboxil)-16-eno (VI): El compuesto **VI** se presentó como un sólido blanco cristalino, obteniendo 356,00 mg (52,19% del rendimiento), p.f. 97-100°C; IR (Celda NaCl, ν_{\max} cm⁻¹) 3070 (-C-H sp²), 1670 (C=O), 1611 y 1588 (C=C), 1399 (C=N), 1248 (-C-O); RMN-¹H (CDCl₃, 600 MHz, Tabla 1); RMN-¹³C (CDCl₃, 150 MHz, Tabla 2).

Obtención del *ent*-kaur-19-*O*-(*o*-hidroxi-fenil-carboxil)-16-eno (VII): El compuesto VII se presentó como un sólido blanco cristalino, con un peso de 49,00 mg (6,92% del rendimiento), p.f. 96-98 °C; IR (Celda NaCl, ν_{\max} cm⁻¹) 3515 (Ar-O-H), 3065 (-C-H sp²), 1770 (C=O), 1613 y 1468 (C=C), 1248 y 1211 (-C-O); RMN-¹H (CDCl₃, 600 MHz, Tabla 1); RMN-¹³C (CDCl₃, 150 MHz, Tabla 2).

Actividad antimicrobiana: Las cepas utilizadas fueron *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29219), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) y *Candida albicans* B-385 proporcionadas por el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

La actividad antimicrobiana fue evaluada de acuerdo al método de difusión en agar en pozo [16], el ensayo se realizó con un cultivo de 18 horas de cada microorganismo en 2,5 mL de caldo Müeller-Hinton a 37 °C. El inóculo bacteriano fue ajustado con solución salina fisiológica al patrón de turbidez de Mac Farland N° 0,5 (10⁶⁻⁸ UFC/mL). Se prepararon las placas con 20 mL de agar Müeller-Hinton, se mezcló el inóculo preparado con el medio de cultivo, y se agregó a la placa. Se dejó solidificar el medio para luego abrir los pozos con una pipeta Pasteur invertida, luego se colocaron 10 μ L de cada compuesto (2 mg/mL), el control negativo (dimetilsulfóxido) y el estándar del antimicrobiano de referencia (Amikacina®, Ampicilina®, Fluconazol®) como control positivo para cada uno de los microorganismos.

Posteriormente, las placas se dejaron en la nevera a temperatura de 4°C aproximadamente durante 30 min (pre-incubación), para que las muestras difundieran a través del agar, luego se llevó a la estufa durante 24 h (bacterias) 48 h (hongos) a temperatura de 37°C en posición invertida en atmósfera aeróbica. Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a examinar la placa, de acuerdo a la sensibilidad o resistencia de la cepa. Se consideró como resultado positivo cuando un halo de inhibición de crecimiento se observó alrededor del disco. En el caso contrario, la ausencia de halo se interpretó como resultado negativo o resistente. El diámetro de la zona de

inhibición, producto de la actividad antimicrobiana de las muestras se expresó en milímetros (mm).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Derivados hemisintéticos: El tratamiento del *ent*-kaurenol (I) con los ácidos *p*-cloro-fenil-acético, *o*-cloro-fenil-acético, *m*-cloro-fenil-acético, *p*-bromo-fenil-acético, nicotínico y salicílico, mediante las condiciones experimentales antes descritas permitió la obtención de seis derivados hemisintéticos (Fig 1): *ent*-kaur-19-*O*-[2'-(*p*-cloro-fenil)-carboximetil]-16-eno (II), *ent*-kaur-19-*O*-[2'-(*o*-cloro-fenil)-carboximetil]-16-eno (III), *ent*-kaur-19-*O*-[2'-(*m*-cloro-fenil)-carboximetil]-16-eno (IV), *ent*-kaur-19-*O*-[2'-(*p*-bromo-fenil)-carboximetil]-16-eno (V), *ent*-kaur-19-*O*-(*m*-piridil-carboxil)-16-eno (VI) y *ent*-kaur-19-*O*-(*o*-hidroxi-fenil-carboxil)-16-eno (VII), los cuales no han sido reportados previamente en la literatura como productos naturales ni como derivados hemisintéticos.

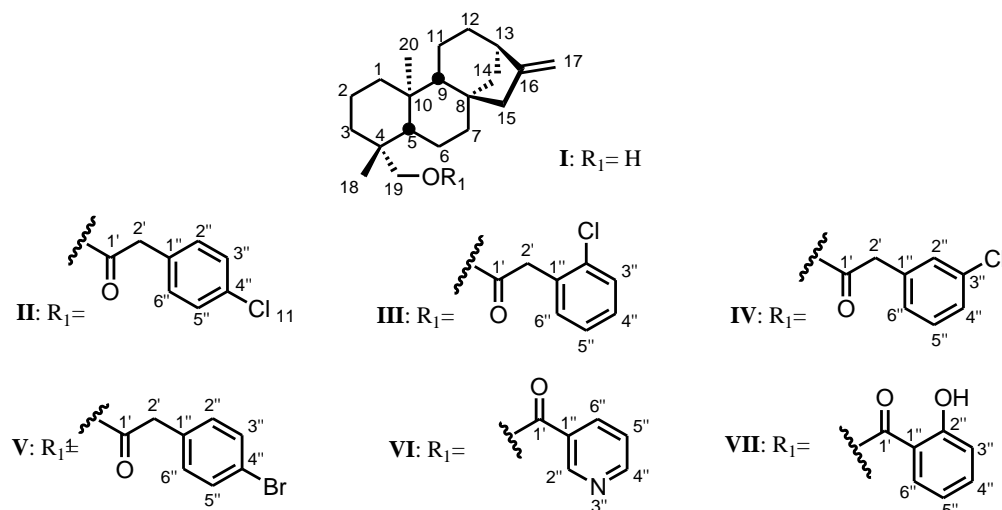
En el espectro de IR de los compuestos obtenidos (II-VII) destaca la desaparición de la vibración de tensión OH del compuesto de partida (I), y se observan las señales características del grupo éster debido a una banda intensa correspondiente al grupo carbonilo con una frecuencia de 1732 cm⁻¹ (II), 1734 cm⁻¹ (III), 1733 cm⁻¹ (IV), 1718 cm⁻¹ (V), 1670 cm⁻¹ (VI) y 1770 cm⁻¹ (VII), esta señal se confirmó con la vibración de tensión de los enlaces -C-O a 1249,68 cm⁻¹ (II), 1249 cm⁻¹ (III) 1250 cm⁻¹ (IV), 1291 cm⁻¹ (V), 1248 cm⁻¹ (VI) y 1248 cm⁻¹ (VII), respectivamente.

La asignación de los desplazamientos químicos tanto protónicos como de carbono 13 de todos los compuestos, se realizó con ayuda de experimentos ¹H-¹H-COSY, DEPT, HMQC y HMBC. En los espectros de resonancia protónica (Tabla 1) se visualizaron las señales correspondientes al núcleo del *ent*-kaurenol (I) y los derivados hemisintéticos (II-VII), entre las cuales destacan los dobletes de los protones H-19 que se encuentran desplazados a campo más bajo en comparación con el compuesto de partida (I), por el efecto desapantallante del grupo carbonilo del éster (δ H19a: 3,90 ppm *d J*=11 Hz; δ H19b: 4,20 ppm *d J*=11 Hz). Adicionalmente se visualizó la aparición de un singulete (2H)

desapantallado que fue asignado a H-2' en los derivados II-V.

De igual manera, se observaron las señales características de los sistemas aromáticos disustituídos (1,2; 1,3 y 1,4). El compuesto II presentó un patrón de sustitución 1,4 representado por dos dobletes que fueron asignados a H-2'' y H-6'' (δ H: 7,19 ppm d $J=8,3$ Hz), H-3'' y H-5'' (δ H: 7,28 ppm d $J=8,3$ Hz). Por otra parte, en el compuesto III se evidenció un sistema 1,2-

disustituído con la aparición de dos dobletes y dos tripletes característicos de este esquema de sustitución: H-3'' (δ H: 7,35 ppm d $J=8,6$), H-4'' y H-5'' (δ H: 7,20 ppm t) y H-6'' (δ H: 7,26 ppm d $J=8,6$). Asimismo en el compuesto IV se determinó una sustitución 1,3 ya que presentó un singulete: H-2'' (δ H: 7,27 ppm s), dos dobletes: H-4'' (δ H: 7,21 ppm d $J=8,6$), H-6'' (δ H: 7,13 ppm d $J=8,6$) y un multiplete H-5'' (δ H: 7,22 ppm).



Leyenda: I: *ent*-kaurenol. II: *ent*-kaur-19-*O*-[2'-(*p*-cloro-fenil)-carboximetil]-16-eno. III: *ent*-kaur-19-*O*-[2'-(*o*-cloro-fenil)-carboximetil]-16-eno. IV: *ent*-kaur-19-*O*-[2'-(*m*-cloro-fenil)-carboximetil]-16-eno. V: *ent*-kaur-19-*O*-[2'-(*p*-bromo-fenil)-carboximetil]-16-eno. VI: *ent*-kaur-19-*O*-(*m*-piridil-carboxil)-16-eno. VII: *ent*-kaur-19-*O*-(*o*-hidroxi-fenil-carboxil)-16-eno.

Fig. 1. Derivados hemisintéticos del *ent*-kaurenol

De igual modo, en el compuesto V se evidenció un sistema 1,4-disustituído establecido por la aparición de dos dobletes que integran para 2H cada uno (δ : 7,12 ppm H-2'' y H-6'' d J : 9,0 Hz y δ : 7,43 ppm H-3'' y H-5'' d J : 9,0 Hz).

En relación al compuesto VI, se apreciaron señales características de un sistema aromático, entre las cuales destacan, la aparición de un singulete a campo bajo (δ : 9,20 ppm), por el efecto desapantallante del grupo carbonilo y al átomo de nitrógeno, fue asignado a H-2'', adicionalmente, se evidenciaron dos dobletes que integran para 1H, con un desplazamiento de δ : 8,75 ppm (d J : 8,8 Hz) y δ : 8,27 ppm (d J : 8,8 Hz) que corresponden a H-4'' y H-6'', respectivamente, mientras que H-5'' se correlaciona con un multiplete a δ : 7,37 ppm.

En el compuesto VII se apreciaron señales características de un sistema aromático, entre las cuales destacan, la aparición de un singulete a campo bajo (δ : 10,83 ppm) correspondiente al hidrógeno del grupo hidroxilo del anillo aromático (H-7''), asimismo, se evidenciaron dos dobletes que integran para 1H, con un desplazamiento de δ : 6,95 ppm (d J : 8,8 Hz) y δ : 7,80 ppm (d J : 8,8 Hz) que corresponden a H-3'' y H-6'', respectivamente. Por otra parte, H-4'' y H-5'' generaron unos tripletes que integran para 1H, con unos desplazamientos de δ : 7,45 ppm y 6,85 ppm. El resto de las señales corresponden con la estructura del compuesto de partida *ent*-kaurenol (I).

TABLA 1.

Desplazamientos químicos de ^1H del *ent*-kaurenol (**I**), *ent*-kaur-19-*O*-[2'-(*p*-cloro-fenil)-carboximetil]-16-eno (**II**), *ent*-kaur-19-*O*-[2'-(*o*-cloro-fenil)-carboximetil]-16-eno (**III**), *ent*-kaur-19-*O*-[2'-(*m*-cloro-fenil)-carboximetil]-16-eno (**IV**), *ent*-kaur-19-*O*-[2'-(*p*-bromo-fenil)-carboximetil]-16-eno (**V**), *ent*-kaur-19-*O*-(*m*-piridil-carboxil)-16-eno (**VI**) y *ent*-kaur-19-*O*-(*o*-hidroxi-fenil-carboxil)-16-eno (**VII**).

H	I	II	III	IV	V	VI	VII
1a	0,76 dt	0,75 dt	0,76 dt	0,75 dt	0,78 dt	0,82 dt	0,80 dt
1b	1,85 m	1,79 m	1,80 m	1,80 m	1,81 m	1,83 m	1,88 m
2a	1,40 m	1,37 m	1,31 m	1,38 m	1,32 m	1,60 m	1,42 m
2b	1,75 m	1,53 m	1,55 m	1,50 m	1,57 m	1,70 m	1,58m
3a	0,93 m	1,48 m	1,50 m	1,55 m	0,95 m	1,08 m	1,10 m
3b	1,74 td	1,57 td	1,52 td	1,57 td	1,57 td	1,76 td	1,80 td
5	0,93 dd	0,87 dd	0,85 dd	0,88 dd	0,90 d	1,00 dd	1,02 d
6a	1,70 m	1,54 m	1,42 m	1,54 m	1,53 m	1,40 m	1,70 m
6b	1,92 m	1,58 m	1,58 m	1,58 m	1,58 m	1,73 m	1,75 m
7a	1,55 t	1,45 t	1,38 t	1,44 t	1,42 t	1,51 t	1,42 t
7b	1,68 t	1,78 t	1,76 t	1,78 t	1,78 t	1,78 t	1,78 t
9	1,08 m	1,03 m	1,01 m	1,02 m	1,03 m	1,10 m	1,10 m
11a	1,31 m	1,33 m	1,38 m	1,58 m	1,38 m	1,42 m	1,63 m
11b	1,66 m	1,63 m	1,62 m	1,60 m	1,60 m	1,59 m	1,72 m
12a	1,58 m	1,44 m	1,42 m	1,43 m	1,43 m	1,47 m	1,45 m
12b	1,48 m	1,60 m	1,60 m	1,61 m	1,60 m	1,56 m	1,63 m
13	2,63 s.a	2,63 s.a	2,63 s.a	2,60 s.a	2,61 s.a	2,60 s.a	2,62 s.a
14a	2,12 m	1,88 m	1,88 m	1,82 m	1,82 m	1,96 m	1,95 m
14b	1,05 m	1,84 m	1,83 m	1,05 m	1,05 m	1,08 m	1,12 m
15a	2,06 m	2,03 m	2,01 m	2,00 m	2,00 m	2,00 m	2,03 m
15b	2,06 m	2,03 m	2,01 m	2,00 m	2,00 m	2,00 m	2,03 m
17a	4,73 s	4,70 s	4,70 s	4,70 s	4,70 s	4,72 s	4,72 s
17b	4,79 s	4,77 s	4,77 s	4,77 s	4,77 s	4,79 s	4,77 s
18	0,96 s	0,84 s	0,81 s	0,87 s	0,84 s	1,05 s	1,03 s
19a	3,44 d	3,90 d	3,93 d	3,90 d	3,90 d	4,14 d	4,14 d
19b	3,74 d	4,20 d	4,18 d	4,20 d	4,20 d	4,52 d	4,52 d
20	1,01 s	0,96 s	1,00 s	0,95 s	0,95 s	1,08 s	1,08 s
1'	-	-	-	-	-	-	-
2'	-	3,57 s	3,76 s	3,57 s	3,55 s	-	-
1''	-	-	-	-	-	-	-
2''	-	7,19 d	-	7,27 d	7,12 d	9,20 s	-
3''	-	7,28 d	7,35 d	-	7,43 d	-	6,95 d
4''	-	-	7,20 t	7,21 m	-	8,75 d	7,45 t
5''	-	7,28 d	7,20 t	7,22 m	7,43 d	7,37 m	6,85 t
6''	-	7,19 d	7,26 d	7,13 m	7,12 d	8,27 d	7,80 d
7''	-	-	-	-	-	-	10,83 s

Abreviaturas: singulete (s), singulete ancho (s.a), doblete (d), doblete de triplete (dt), triplete (t), multipléte (m).

El análisis de los espectros de RMN- ^{13}C y DEPT-135 permitió identificar las señales de los carbonos del *ent*-kaurenol (**I**) así como de los derivados hemisintéticos (**II-VII**), clasificándolos en metilos, metilenos, metinos y cuaternarios, las señales más destacadas corresponden a los carbonos aromáticos, olefínicos y carbonílicos (Tabla 2).

A través de los espectros HMQC se identificaron las correlaciones de todos los carbonos con sus protones, las señales más interesantes fueron las correspondientes a los carbonos C-19 con H-19a y H-19b, C-17 con H-17a y H-17, C-2' con H-2' y las del sistema aromático

de cada derivado (**II-VII**). Por otra parte, en los espectros HMBC destacaron las correlaciones entre los protones H-19a y H-19b con los carbonos cuaternarios del grupo carbonilo señalado como C-1' de cada compuesto (**II-VII**), permitiendo de esta manera reafirmar que la molécula de partida se encontraba unida por medio de un enlace éster, de igual modo estos protones se correlacionan con los carbonos asignados como C-18, C-4 y C-5, del núcleo de partida. Se apreciaron las señales de H-2' con los carbonos C-1'', C-2'', C-3'', C-5'' y C-6'' correspondientes de los anillos aromáticos de cada molécula.

TABLA 2.

Desplazamientos químicos de ^{13}C del *ent*-kaurenol (**I**), *ent*-kaur-19-*O*-[2'-(*p*-cloro-fenil)-carboximetil]-16-eno (**II**), *ent*-kaur-19-*O*-[2'-(*o*-cloro-fenil)-carboximetil]-16-eno (**III**), *ent*-kaur-19-*O*-[2'-(*m*-cloro-fenil)-carboximetil]-16-eno (**IV**), *ent*-kaur-19-*O*-[2'-(*p*-bromo-fenil)-carboximetil]-16-eno (**V**), *ent*-kaur-19-*O*-[2'-(*m*-piridil-carboxil)-16-eno (**VI**) y *ent*-kaur-19-*O*-(*o*-hidroxi-fenil-carboxil)-16-eno (**VII**).

C	I	II	III	IV	V	VI	VII
1	40,5	40,3	40,3	41,2	40,3	40,3	40,2
2	18,3	18,2	18,1	18,1	18,1	18,2	18,2
3	35,3	36,5	36,7	36,5	36,5	36,6	36,5
4	39,3	39,5	39,1	39,1	39,1	39,2	39,2
5	56,9	56,7	56,6	56,7	56,7	56,8	56,7
6	20,5	20,5	20,4	20,5	20,5	20,6	20,5
7	41,7	41,5	41,5	41,5	41,5	41,5	41,5
8	44,0	44,1	44,1	44,1	44,1	44,1	44,1
9	56,2	56,1	56,1	56,1	56,1	56,1	56,1
10	38,7	37,1	37,0	37,0	37,1	37,4	37,4
11	18,2	18,2	18,2	18,2	18,2	18,3	18,3
12	33,2	33,1	33,1	33,1	33,1	33,1	33,1
13	44,2	43,9	43,9	43,9	43,9	43,9	43,9
14	39,7	39,1	39,5	39,5	39,6	39,6	39,6
15	49,1	48,9	48,9	49,0	49,0	49,0	49,9
16	155,9	155,8	155,8	155,8	155,8	155,8	155,7
17	103,0	102,9	102,9	102,9	102,9	103,0	103,0
18	27,1	27,6	27,6	27,5	27,6	27,7	27,7
19	65,6	68,1	68,5	68,2	68,2	68,3	68,0
20	18,1	17,8	17,8	17,8	17,8	18,1	18,1
1'	-	171,3	170,7	171,1	171,2	165,4	170,3
2'	-	40,9	39,6	40,3	41,1	-	-
1''	-	132,7	132,6	134,3	121,1	126,4	112,7
2''	-	130,7	134,6	129,5	131,0	150,8	161,6
3''	-	128,7	129,5	136,0	131,6	-	117,6
4''	-	132,9	128,6	129,7	133,1	153,3	135,5
5''	-	128,7	126,8	127,2	131,6	123,3	119,1
6''	-	130,7	131,5	127,5	131,0	137,0	129,7

Actividad antimicrobiana: La actividad antimicrobiana del *ent*-kaurenol (**I**) y los derivados hemisintéticos obtenidos (**II-VII**) fue evaluada a través del método de difusión en agar en pozo, determinándose que los compuestos no fueron activos frente a los microorganismos ensayados, demostrando que la esterificación del grupo hidroxilo en C19 no mejora la actividad y que las modificaciones químicas realizadas no tienen influencia frente a estos microorganismos. Estos resultados tienen relación a los obtenidos por Peña y cols. (2015) quienes señalan que los derivados sulfóxidos obtenidos de la esterificación del ácido *ent*-kaurénico no presentaron actividad antibacteriana por el método de difusión en disco y de microdilución en caldo [17]. De igual modo, Cordero de Rojas y cols. (2017) evaluaron la actividad antibacteriana del *ent*-kaurenol (**I**) por el

método de microdilución en caldo y determinaron que es inactivo frente a *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, sin embargo presentó actividad sobre *Bacillus subtilis* (CIM 40 µg/mL) [18]. Considerando que los ésteres obtenidos (**II-VII**) son compuestos nuevos, es importante resaltar que estos resultados reportan por primera vez la evaluación de la actividad antimicrobiana.

CONCLUSIONES

Las reacciones de esterificación del *ent*-kaurenol (**I**) con los ácidos *p*-cloro-fenil-acético, *o*-cloro-fenil-acético, *m*-cloro-fenil-acético, *p*-bromo-fenil-acético, nicotínico y salicílico; permitieron la obtención de seis derivados hemisintéticos denominados como:

ent-kaur-19-*O*-[2'-(*p*-cloro-fenil)-carboximetil]-16-eno (**II**), *ent*-kaur-19-*O*-[2'-(*o*-cloro-fenil)-carboximetil]-16-eno (**III**), *ent*-kaur-19-*O*-[2'-(*m*-cloro-fenil)-carboximetil]-16-eno (**IV**), *ent*-kaur-19-*O*-[2'-(*p*-bromo-fenil)-carboximetil]-16-eno (**V**), *ent*-kaur-19-*O*-(*m*-piridil-carboxil)-16-eno (**VI**) y *ent*-kaur-19-*O*-(*o*-hidroxi-fenil-carboxil)-16-eno (**VII**), los cuales no han sido reportados previamente en la literatura como productos naturales ni como productos de hemisíntesis.

Se evaluó la actividad antimicrobiana del *ent*-kaurenol (**I**) y los derivados hemisintéticos obtenidos (**II-VII**) a través del método de difusión en agar en pozo frente a seis cepas de referencia internacional: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*; determinándose que los compuestos no fueron activos frente a las cepas ensayadas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento al Instituto de Investigaciones “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. Al Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear Centro de Química, Instituto Venezolano de Investigaciones Científica (IVIC) por los espectros uni- y bi-dimensionales realizados, y al Cepario del Laboratorio de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Mori K, Wtsui M, Ikekwa H, Sumiki Y. Total synthesis of the racemates of kaur-16-en-19-ol monogynol and some oxygenated kauranes. *Tetrahedron Lett.* 1966; 29: 3395-3400.

[2] Fujita E, Fujita, T. The Chemistry on Diterpenoids in 1967. *Bull. Inst. Chem. Res.* 1969; 47: 522-551.

[3] Piozzi F, Passannanti S, Paternostro M. Kauranoid diterpenes in *Espeletia grandiflora*. *Phytochemistry.* 1971; 10: 1164-1166.

[4] Bohlmann F, Rao N. Naturally occurring terpene derivatives. XXI. Constituents of *Annona squamosa*. *Chem. Ber.* 1973; 106: 841-844.

[5] Aparicio A, Villasmil T, Peña A, Rojas J, Usubillaga A. Estudio fitoquímico de las hojas de *Espeletia semiglobulata* Cuatrec. *Rev. Fac. Farm.* 2013; 55: 2-5.

[6] Meccia G, Quintero P, Rojas L, Usubillaga A, Carmona, J. Análisis de los ácidos kaurénicos presentes en *Espeletiopsis angustifolia* Cuatrec. de los Andes venezolanos. *Av. Qui.* 2010; 5 (1): 45-49.

[7] Peña A, Alarcón L, Baptista J, Aparicio R, Villasmil T, Usubillaga, A. A Phytochemical Analysis of *Espeletia nana* Cuatrec. A Midget Espeletiinae from Paramo Ortiz, Venezuela. *Av. Qui.* 2012; 7 (3): 187-192.

[8] Costa F, Albuquerque S, Vichnewski W. Diterpenes and synthetic derivatives from *Viguiera aspillioides* with Trypanomicidal Activity. *Planta Médica.* 1996; 62: 557-559.

[9] Chang F, Yang P, Lin J, Lee K, Wu Y. Bioactive kaurane from *Annona glabra*. *J. Nat. Prod.* 1988; 61: 437-439.

[10] Moriwaki K, Gomi M, Itoh Y, Iida S, Tsuqawa M, Tarui S, Fuji K, Node M, Kajimoto T. Steroidogenic effect of *ent*-kaur-16-en-15-ol (kaurenol) on isolated rat adrenal cells. *Life. Sci.* 1986; 38: 453-458.

[11] Asem E, Tsang B. Effect of kaurenol on steroidogenesis and cyclic adenosine monophosphate production in rat granulosa cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1988; (1-2): 149-156.

[12] Hertelendy F, Asem E. Influence of kaurenol on basal, LH- and forskolin-stimulated progesterone and cAMP production in avian granulosa cells. *J. Steroid. Biochem.* 1989; 33: 53-57.

[13] Baptista J, Monsalve M, Alonso M, Ávila J, Usubillaga A. Ensayos de actividad antialimentaria sobre *Tribolium castaneum* y *Sitophilus oryzae* de algunos derivados del *ent*-kaurenol. *Ciencia.* 2007; 15 (2): 248- 258.

[14] Aparicio R, Bahsas A, Usubillaga A. Allylic oxidation of *ent*-Kaurenic acid, *ent*-Kaurenic acid Methyl Ester and *ent*-Kaurenol. *Av. Qui.* 2007; 2: 3-8.

[15] Hueso I, Cuadrado I, Cidre F, Amaro L, Ravelo A, Estévez A, De Las Heras B, Hortelano S. Synthesis and anti-inflammatory activity of *ent*-

kaurene derivatives. Eur. J. Med. Chem. 2011; 46: 1291-1305.

[16] Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing, 30th. 2020. [Página Web] 2020 [acceso: 5 de noviembre de 2020]. Disponible en:

https://www.clsi.org/media/2663/m100ed29_sample.pdf

[17] Peña A, Usubillaga A, Alarcón L, Velasco J, Aparicio R. Obtención de derivados azufrados del ácido kaurénico y de otros kaurenos substituidos en la posición C-15 y su actividad antibacteriana. Rev. Fac. Farm. 2015; 57: 3-8.

[18] Cordero de Rojas Y, Lucena de Ustáriz M, Araujo L, Usubillaga A, Rojas-Fermín L, Moujir L. Actividad antibacteriana de diterpenos del kaurano aislados de *Coespeletia moritziana* (Sch. Bip. ex Wedd.) Cuatrec. Rev. Fac. Farm. 2017; 59: 3-7.

Hamdan-Sánchez Mager, Orcid ID: 0000-0002-4354-8688

†**Rojas-Fermín Luis**, Orcid ID: 0000-0003-4508-1927

Obregón-Díaz Ysbelia, Orcid ID: 0000-0001-6152-6696

Aparicio-Zambrano Rosa, Orcid ID: 0000-0002-5020-0954

Pérez-Colmenares Alida, Orcid ID: 0000-0001-8910-4663

Cordero Yndra, Orcid ID: 0000-0001-7015-2796

Díaz Clara, Orcid ID: 0000-0002-1287-8326

Da Silva-Rojas Jossblerys, Orcid ID: 0000-0002-6883-9465

Usubillaga Alfredo, Orcid ID: 0000-0002-2913-5684