

Artículo original

Actividad antibacteriana de diterpenos del kaurano aislados de *Coespeletia moritziana* (Sch. Bip. ex Wedd.) Cuatrec.

Antibacterial activity of diterpenos of the kaurano isolated of *Coespeletia moritziana* (Sch. Bip. ex-Wedd.) Cuatrec.

Cordero de Rojas Yndra², Lucena de Ustáriz María Eugenia², Araujo Liliana², Usubillaga Alfredo¹, Rojas-Fermín Luis^{1*}, Moujir Laila³.

¹Instituto de Investigaciones “Dr Alfredo Usubillaga del Hierro” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes. Mérida CP 5101, República Bolivariana de Venezuela. ²Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida CP 5101, República Bolivariana de Venezuela. ³Laboratorio Clínico e Histopatológico; Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Chimborazo, Ecuador. *Departamento de Microbiología y Biología Celular, Universidad de La Laguna, Santa Cruz de Tenerife CP 38200, España.

Recibid junio 2017 - Aceptado agosto 2017

RESUMEN

La actividad antibacteriana del ácido *ent*-kaur-16-eno-19-oico (ácido kaurénico, 1), ácido *ent*-kaur-9(11)16-dieno-19-oico (ácido grandiflorénico, 2), ácido 15 α -acetoxi-*ent*-kaur-16-eno-19-oico (ácido 15 α -acetoxi-kaurénico, 3) y 19-hidroxi-*ent*-kaur-16-eno (kaurenol, 4), se ensayó contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. Estos diterpenos fueron obtenidos a partir de *Coespeletia moritziana* (Sch. Bip. ex Wedd.) Cuatrec., una planta resinosa de los Andes venezolanos. La concentración inhibitoria mínima (CIM) fue determinada por el método de microdilución en caldo en placas de 96 pozos, a una concentración máxima de 40 μ g/mL. El ácido grandiflorénico presentó actividad sobre *Staphylococcus aureus* (CIM 20 μ g/mL), *Bacillus subtilis* (CIM 5 μ g/mL) y *Enterococcus faecalis* (CIM 10 μ g/mL). El ácido kaurenico mostró actividad únicamente sobre *Bacillus subtilis* (CIM 10 μ g/mL), al igual que el ácido 15 α -acetoxi-kaurénico y el kaurenol (CIM 40 μ g/mL). Estos resultados representan un aporte al estudio de la actividad antimicrobiana de estos compuestos.

PALABRAS CLAVE

Coespeletia moritziana, Asteraceae, ácido kaurenico, ácido grandiflorénico, ácido 15 α -acetoxi-kaurénico, kaurenol.

ABSTRACT

Antibacterial activity of *ent*-kaur-16-en-19-oic acid (kaurenic acid, 1), *ent*-kaur-9(11)16-dien-19-oic acid (grandiflorenic acid, 2), 15 α -acetoxi-*ent*-kaur-16-en-19-oic acid (15 α -acetoxi-kaurenic acid, 3), and *ent*-kaur-16-en-19-ol (kaurenol, 4), was assayed against Gram positive and Gram negative bacteria. These diterpenes were obtained from *Coespeletia moritziana* (Sch. Bip. ex Wedd.) Cuatrec., a resinous plant from the Venezuelan Andes. The minimum

inhibitory concentration (MIC) was measured using the broth microdilution method, in 96 well plates, at a maximum concentration of 40 μ g/mL. Grandiflorenic acid had activity against *Staphylococcus aureus* (MIC 20 μ g/mL), *Bacillus subtilis* (MIC 5 μ g/mL) and *Enterococcus faecalis* (MIC 10 μ g/mL). Kaurenic acid was active only against *Bacillus subtilis* (CMI 10 μ g/mL), 15 α -acetoxi-kaurenic acid and kaurenol (CMI 40 μ g/mL), were also found to have activity only against *Bacillus subtilis* at a MIC of 40 μ g/mL. These results are a contribution to the study of antibacterial activity of these compounds.

KEY WORDS

Coespeletia moritziana, Asteraceae, kaurenic acid, grandiflorenic acid, 15 α -acetoxi-kaurénic acid, kaurenol.

INTRODUCCIÓN

Coespeletia moritziana (Sch. Bip. ex Wedd.) Cuatrec., (Asteraceae) es una planta resinosa que crece por encima de los 2900 m de altitud en los Andes Venezolanos [1]. Posee hojas subcoriáceas y rígidas de 20 a 45 cm de largo y 1-2 cm de ancho que poseen un denso indumento amarillo-dorado en ambas superficies. Esta especie presenta flores solitarias y nutantes de color rojo con un diámetro de 4 a 5 cm sobre tallos florales simples y erectos [2]. Los campesinos de la zona la conocen con el nombre de frailejón amarillo.

Coespeletia moritziana pertenece a la subtribu Espeletiinae, en la cual se han descrito 8 géneros. Las especies pertenecientes a esta subtribu son conocidas popularmente como frailejones [3]. Estudios previos de esta especie revelaron la presencia de derivados del *ent*-kaurano (*ent*-kaur-16-eno, 19-hidroxi-*ent*-kaur-16-eno, 19-oxo-*ent*-kaur-16-eno y ácido *ent*-kaur-16-eno-19-oico) [4-6]. Estudios realizados sobre el aceite esencial obtenido de esta especie, en diferentes localidades, revelan la presencia de los siguientes componentes mayoritarios: α -pineno (47-38,9 %), β -pineno

(19,5–16,9 %), β -felandreno (18,2–0,8 %) y mirceno (7,6–1,7 %) [7, 8].

En especies pertenecientes a la subtribu Espeletiinae se ha encontrado en cantidades importantes ácido kaurénico y varios diterpenos tipo kaureno. El ácido kaurénico es una sustancia que posee propiedades biológicas tales como anti-inflamatoria, antipirética, antibacteriana, citotóxica y antiparasitaria [9-13]. El objetivo del presente estudio es determinar la actividad antimicrobiana del ácido kaurénico (1), del ácido grandiflorénico (2), del ácido 15 α -acetoxi-kaurénico (3) y del kaurenol (4).

MATERIAL Y MÉTODOS

General. Los espectros Infrarrojo se realizaron en un espectrómetro FT-IR Perkin Elmer, modelo FT-1725X, en pastillas de KBr. Los compuestos se analizaron por resonancia magnética nuclear protónica y de carbono-13, mediante experimentos uni- y bidimensionales, en un equipo Bruker-Advance 400 en solución de CDCl₃. La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) se realizó en un equipo Hewlett Packard modelo MSD 5973, provisto de una columna HP-5MS de 30 m de largo, 0,25 mm de diámetro y con un espesor de película de 0,25 μ m. Como gas portador se utilizó helio a una velocidad de flujo de 0,9 mL/m. Las condiciones utilizadas fueron las siguientes: Temperatura inicial: 250 °C, con un incremento de 5°/min hasta 300 °C, energía de ionización 70 ev. Los compuestos se identificaron mediante comparación directa con patrones puros existentes en el laboratorio. Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato digital Electrothermal.

Obtención del material vegetal. Las hojas frescas (17,2 Kg) de *Coespeletia moritziana* fueron recolectadas en septiembre del año 2007, en el Pico del Águila en la región nororiental de la Sierra de la Culata, vía de Piñango, Estado Mérida a 4120 msnm. La planta fue identificada por el Ing. Juan Carmona. Un voucher (AU28) fue depositado en el herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

Extracción y purificación de los compuestos ensayados. Las hojas secas y molidas (4,9 Kg) se extrajeron con una mezcla de hexano: éter dietílico (3:1 v/v) a temperatura ambiente. Este extracto se agitó con una solución 0,5 molar de hidróxido de sodio para formar las sales sódicas de los ácidos presentes. La fase acuosa se acidificó mediante adición de ácido clorhídrico hasta un pH de 3,0. Luego se extrajo con hexano y mezclas de hexano/acetato de etilo para recuperar los ácidos libres, obteniéndose 14,8 g de ácido kaurénico (1) y 5,4 g de ácido grandiflorénico (2), 1,8 g de ácido 15 α -acetoxi-kaurénico (3). La fase etérea del extracto original que había sido sometida a agitación con hidróxido de sodio se concentró lográndose 270,0 g de fracción neutra de la cual se logró, por cromatografía de columna, aislar 2,8 g de kaurenol (4). En la figura 1 se presentan las fórmulas estructurales de los compuestos aislados. Los ácidos puros fueron metilados (diazometano en solución etérea) para obtener los espectros de masas por Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

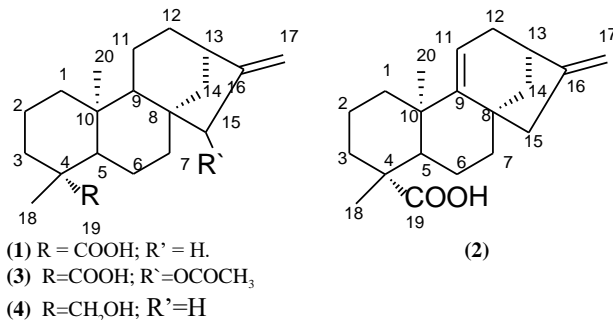


Fig. 1: compuestos aislados de *Coespeletia moritziana*.

A continuación se indican los valores espectroscópicos de los compuestos puros aislados de *C. moritziana*, estos fueron comparados con patrones auténticos y con la bibliografía [14-16].

Compuesto 1 [ácido *ent*-kaur-16-eno-19-oico (ácido kaurénico)]. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 2,63 (1H, s, H-13), 2,04 (2H, d, H-15), 4,73 (1H, s, H-17a), 4,79 (1H, s, H-17b), 1,24 (3H, s, H-18), 0,95 (3H, s, H-20). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 155,8 (C-16), 103 (C-17), 184,9 (C-19), 57,0 (C-5), 55,1 (C-9), 48,9 (C-15), 44,2 (C-8), 43,8 (C-13), 41,3 (C-7), 40,7 (C-1), 39,7 (C-14), 39,7 (C-10), 43,2 (C-4), 37,7 (C-3), 33,1 (C-12), 29,0 (C-18), 21,8 (C-6), 19,1 (C-2), 18,4 (C-11), 15,6 (C-20). EI-MS *m/z*: 302. IR cm⁻¹: 2985 (C-H), 1712 (C=O) (KBr). pf 175-177 °C.

Compuesto 2 [ácido *ent*-kaur-9(11),16-dien-19-oico (ácido grandiflorénico)]. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 5,23 (1H, t, H-11), 2,76 (1H, s, H-13), 2,60 (2H, d, H-15), 4,79 (1H, s, H-17a), 4,91 (1H, s, H-17b), 1,24 (3H, s, H-18), 1,02 (3H, s, H-20). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 155,8 (C-16), 103 (C-17), 184,9 (C-19), 57,0 (C-5), 155,1 (C-9), 48,9 (C-15), 44,2 (C-8), 43,8 (C-13), 41,3 (C-7), 40,7 (C-1), 39,7 (C-14), 39,7 (C-10), 43,2 (C-4), 37,7 (C-3), 33,1 (C-12), 29,0 (C-18), 21,8 (C-6), 19,1 (C-2), 114,9 (C-11), 15,6 (C-20). EI-MS *m/z*: 300. IR cm⁻¹: 2990 (C-H), 1705 (C=O) (KBr). pf 155-157 °C.

Compuesto 3 [ácido 15 α -acetoxi-*ent*-kaur-16-eno-19-oico (ácido 15 α -acetoxi-kaurénico)]. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 2,78 (1H, s, H-13), 5,25 (1H, s, H-15), 5,09 (2H, s, H-17), 1,22 (3H, s, H-18), 0,95 (3H, s, H-20), 2,07 (3H, s, H-22); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 155,4 (C-16), 110,0 (C-17), 183,7 (C-19), 56,7 (C-5), 52,8 (C-9), 83 (C-15), 47,4 (C-8), 42,4 (C-13), 34,7 (C-7), 40,5 (C-1), 37,1 (C-14), 39,8 (C-10), 43,6 (C-4), 37,6 (C-3), 32,6 (C-12), 28,9 (C-18), 20,7 (C-6), 18,9 (C-2), 18,3 (C-11), 15,8 (C-20), 171,1 (C-21), 21,3 (C-22); EI-MS *m/z*: 360; IR cm⁻¹: 2990 (C-H), 1715 (C=O), 1705 (C=O) (KBr). pf 175-178 °C.

Compuesto 4 [19-hidroxi-*ent*-kaur-16-eno (Kaurenol)]. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 0,76 (2H, dt, H-1), 0,89-1,74 (2H, td, H-3), 2,63 (1H, m, H-13), 2,06 (2H, m, H-15), 4,73 (1H, s, H-17a), 4,79 (1H, s, H-17b), 0,96 (3H, s, H-18), 3,44-3,74 (2H, 2d, H-19a; H-19b), 1,01 (3H, s, H-20); ¹³C NMR

(75 MHz, CDCl₃) d: 155,9 (C-16), 103 (C-17), 65,6 (C-19), 59,9 (C-5), 59,2 (C-9), 49,1 (C-15), 44,2 (C-8), 44,0 (C-13), 41,7 (C-7), 40,5 (C-1), 39,7 (C-14), 39,3 (C-10), 38,7 (C-4), 35,7 (C-3), 33,2 (C-12), 27,1 (C-18), 20,5 (C-6), 18,3 (C-2), 18,2 (C-11), 18,1 (C-20); EI-MS, m/z: 288; IR cm⁻¹: 3395, (O-H), 2960 (C-H), 1660 (C=C) (KBr). pf 140-141 °C.

Actividad antibacteriana. Se emplearon los siguientes microorganismos: bacterias Gram positivas: *Bacillus subtilis* CECT 39, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Enterococcus faecalis* CECT 735, bacterias Gram negativas: *Escherichia coli* CECT 99, *Pseudomonas aeruginosa* AK 958, mantenidas en agar nutritivo, a excepción de *E. faecalis* que por sus exigencias metabólicas se utilizó agar cerebro corazón (agar BHI). Las placas fueron conservadas a 4 °C, llevándose a cabo resiembra periódicas.

A partir de cultivos en medio sólido, se prepararon pre-inóculos en 20 mL de medio extracto de levadura-peptona (YP) que fueron incubados a 37 °C durante 18 horas en agitación orbital. Estos cultivos fueron diluidos en el medio caldo cerebro corazón (BHI) para la *E. faecalis* y caldo nutritivo para las otras bacterias para ser utilizados como inóculos y llevar a cabo los ensayos a la densidad celular deseada.

La concentración inhibitoria mínima (CIM) fue determinada por el método de microdilución en caldo, según la metodología descrita en el manual de Estándares Clínicos y de Laboratorio [17]. Se utilizaron placas de 96 pozos, y diferentes concentraciones (2,5; 5; 10; 20 y 40 µg/mL) de los diterpenos.

Se depositaron 200 µL de cada producto en el medio de cultivo según la bacteria (caldo nutritivo o caldo cerebro corazón, BHI) a una concentración doble de la requerida para el ensayo, para llevar a cabo diluciones seriadas. Estas placas fueron inoculadas con 100 µL de la suspensión del microorganismo de densidad 1-5×10⁵ ufc/mL. Se incluyeron los siguientes controles: control de crecimiento (caldo+microorganismo), control negativo con DMSO y como control positivo ciprofloxacina 256 µg/mL para *P. aeruginosa*, kanamicina 256 µg/mL para las demás bacterias.

Después de 24 horas de incubación a 37 °C en agitación orbital se determinó la turbidez de los cultivos en un lector de ELISA (Titertek Multiskan Plus) a 550 nm. De aquellos pozos en los que no se observó crecimiento visible, se tomaron alícuotas (100 µL) con el fin de establecer la CIM. Cada ensayo fue realizado por duplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La actividad antibacteriana del ácido kaurénico y sus derivados fue evaluada a una concentración máxima de 40 µg/mL frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas. La tabla 1 muestra los resultados obtenidos de la evaluación de la actividad antibacteriana de los ácidos kaurénico, grandiflorénico, 15 α -acetoxi-kaurénico, como del kaurenol. El ácido kaurénico fue activo solo contra *B. subtilis* a una CIM de 10 µg/mL, este resultado coincide con los reportados

en la literatura, [18-21]. En relación a la actividad de este compuesto contra *S. aureus*, los resultados obtenidos en este estudio difieren de lo señalado por diversos investigadores [9, 20-26], quienes indican inhibición del desarrollo de este microorganismo a concentraciones mayores a las probadas en este estudio (700-1600 µg/mL). El ácido grandiflorénico fue activo contra las bacterias Gram positivas ensayadas, con valores de CIM que oscilaron entre 5 y 20 µg/mL (*B. subtilis* CIM 5 µg/mL, *E. faecalis* CIM 10 µg/mL y *S. aureus* 20 µg/mL). Estos resultados son similares a los reportados por Gutiérrez y Col (1998) [24], quienes señalan una CIM de 100 µg/mL frente a *S. aureus* y 23,3 µg/mL frente a *B. subtilis*, esta diferencia podría atribuirse a la metodología utilizada para determinar la actividad antimicrobiana, que en el caso de Gutiérrez fue el método de difusión con perforación en agar. El ácido 15 α -acetoxi-kaurénico inhibió el desarrollo de *B. subtilis* con una CIM de 40 µg/mL, la actividad antibacteriana de este compuesto ya ha sido estudiada [18].

Tabla 1

Actividad antibacteriana del ácido kaurénico y sus derivados.

| Microorganismos | Compuestos CIM (µg/mL) | | | |
|-----------------------------|------------------------|-----------------------|--------------------------------|----------|
| | Ácido kaurénico | Ácido grandiflorénico | 15 α -acetoxi kaurénico | kaurenol |
| <i>S. aureus</i> ATCC 6538 | NA | 20 | NA | NA |
| <i>E. faecalis</i> CECT 735 | NA | 10 | NA | NA |
| <i>B. subtilis</i> CECT 39 | 10 | 5 | 40 | 40 |
| <i>E. coli</i> CECT 99 | NA | NA | NA | NA |
| <i>P. aeruginosa</i> AK 958 | NA | NA | NA | NA |

CIM: Concentración inhibitoria mínima.

La sustitución del ácido carboxílico en el carbono 19 por un alcohol primario, disminuyó la actividad contra *B. subtilis*, evidenciado por el aumento de la CIM contra esta bacteria de 10 a 40 µg/mL. La actividad del ácido kaurénico, el ácido grandiflorénico y del ácido 15- α -acetoxi-ent-kaur-16-en-19-oico, nos lleva a suponer que el grupo carboxilo presente en la posición C-19 y el doble enlace Δ 16 son importantes.

La mayoría de los estudios muestran que el ácido ent-kaur-16-en-19-oico tiene actividad solamente contra bacterias Gram positivas [9, 26, 27], actividad que podría tener relación directa con la composición de la pared celular de estas bacterias. Tal como lo comenta Ghisalberti (1997) [9], Peña y Col (2009) [28], que sustituciones en la posición C-19 como glucósidos, sulfóxidos y derivados pirazolidínicos entre los C-16 y C-17, afectan negativamente la actividad antibacteriana.

CONCLUSIONES

A partir de la de *Coespeletia moritziana* (Sch. Bip. ex Wedd.) Cuatrec., se aislaron el ácido *ent-kaur-16-eno-19-oico* (ácido kaurénico, 1), ácido *ent-kaur-9(11)16-dieno-19-oico* (ácido grandiflorénico, 2), ácido *15 α -acetoxi-ent-kaur-16-eno-19-oico* (ácido *15 α -acetoxi-kaurénico*, 3) y *19-hidroxi-ent-kaur-16-eno* (kaurenol, 4). La actividad antibacteriana de estos compuestos fue determinada por el método de microdilución en caldo en placas de 96 pozos, el ácido grandiflorénico presentó actividad sobre *Staphylococcus aureus* (CIM 20 $\mu\text{g/mL}$), *Bacillus subtilis* (CIM 5 $\mu\text{g/mL}$) y *Enterococcus faecalis* (CIM 10 $\mu\text{g/mL}$). El ácido kaurénico mostró actividad únicamente sobre *Bacillus subtilis* (CIM 10 $\mu\text{g/mL}$), al igual que el ácido *15 α -acetoxi-kaurénico* y el kaurenol (CIM 40 $\mu\text{g/mL}$). Por último los resultados obtenidos en el presente trabajo representan un aporte al estudio de la composición química de la *Coespeletia* y a la actividad antibacteriana de los kaurenos aislados.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. Al programa de apoyo a grupos de investigación del CDCHTA (ADG: Grupo de Productos Naturales y Química Medicinal-ULA).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Cuatrecasas, J. A new Subtribe in the Helianthae (Compositae) Espeletiinae. *Phytologia*. 1976; 35(1): 43-61.
- [2] Aristeguieta L. Compositae. En: Lasser T. Ed. Flora de Venezuela. Edición Especial del Instituto Botánico. Caracas; 1964; X(1): 407-462.
- [3] García-Barriga, H. Flora Medicinal de Colombia. Bogotá, Imprenta Nacional. 1975; Vol. 3, p 345.
- [4] Bohlmann F, Suding H, Cuatrecasas J, King RM, Robinson H. Tricyclic sesquiterpenes and further diterpenes from *Espeletiopsis* species. *Phytochemistry*. 1980; 19(11): 2399-2403.
- [5] Usubillaga A, Morales A. Kaurenic acid in *Espeletia* species. *Phytochemistry*. 1972; 11(5): 1856-1857.
- [6] Usubillaga A, Romero M, Aparicio R. Kaurenic acid in Espeletiinae. *Acta Horticulturae*. 2003; 597: 129-130.
- [7] Aparicio R, Romero M, Rojas LB, Khouri N, Usubillaga A. Volatile constituents from the leaves of three species of *Coespeletia* from the Venezuelan Andes. *J. of Essent Oil Res*. 2002;14(1): 37-39.
- [8] Ibañez J, Usubillaga A. Analysis of the essential oil of two different altitudinal populations of *Coespeletia moritziana* (Sch. Bip. ex Wedd) Cuatrec. *Flavour Frag. J*. 2006; 21(5): 760-763.
- [9] Ghisalberti EL. The biological activity of naturally occurring kaurene diterpenes. *Fitoterapia*. 1997; 68(4): 303-325.
- [10] Sosa-Sequera M, Suarez O, Dalo N. Kaurenic acid: An in vivo experimental study of its antiinflammatory and antipyretic effects. *Indian J Pharmacol*. 2010; 42(5): 293-296.
- [11] Hueso-Falcón I, Cuadrado I, Cidre F, Amaro Luis J, Ravelo A, Estévez-Braun A, et al. Synthesis and anti-inflammatory activity of the *ent-kaurene* derivatives. *Eur J Med Chem*. 2011; 46(4): 1291-1305.
- [12] Cordero Y, Corao GM, Cova JA, Usubillaga A. Effect of some *ent-kaurenes* on the viability of human peripheral blood mononuclear cells. *Nat Prod Comm*. 2012; 7(5): 563-564.
- [13] Cordero Y., Estudio fitoquímico y farmacológico de *Coespeletia moritziana* (Asteraceae). Tesis doctoral. Universidad de Los Andes. Venezuela. 2012.
- [14] Bohlmann F., Suding H., Cuatrecasas J., Kings R. und Robinson H. Neue Diterpene aus der Subtribus Espeletiinae. *Phytochemistry*. 1980; Vol. 19(2): 267-271.
- [15] Torrenegra R., Tellez A. *Phytochemistry of Espeletia killipii* Cuatrec. and Giberelic activity of some of the isolated compounds. *Rev. Latinoamer. Quim*. 1996; 24(1): 2-6.
- [16] Bohlmann F., Zdero C., Cuatrecasas J., Kings R., und Robinson H. neue sesquiterpene und norditerpene aus vertretern der gattung *Libanothammus*. *Phytochemistry*. 1980; 9(6): 1145-1148.
- [17] National Comité for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria grow aerobically 4th cd. NCCLS document M7-A4, 17. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. 1997.
- [18] Davino S. C., Giesbrecht A. M. and Roque N. F. Antimicrobial Activity of kaurenic acid derivatives substituted on Carbon-15. *Brazilian J. Med. Biol. Res*. 1989; 22(9): 1127-1129.
- [19] Velikova, M., Bankova, V., Tsvetkova, I., Kujumgiev, A., and Marcucci, M.C. Antibacterial *ent-kaurene* from Brazilian propolis of native stingless bees. *Fitoterapia*. 2000; 71(6): 693.
- [20] Zgoda-Pols J. R., Freyer A. J., Killmer L. B., Porter J. R. Antimicrobial diterpenes from the stem bark of *Mitrephora celebica*. *Fitoterapia*. 2002; 73(5): 434-438.
- [21] Wilkens M., Alarcón C., Urzúa A., Mendoza L. Characterization of the Bactericidal Activity of the Natural Diterpene Kaurenic Acid. *Planta Med*. 2002; 68(5), 452-454.
- [22] Peña, A. Monografía de Tesis para optar al título de Licenciado en Química. Universidad de Los Andes. Venezuela. 2008.
- [23] De Los Rios, C., Hidalgo Baez, D., Contreras, Q., Crescente, O., and Caserta, A. Evaluación fitoquímica y actividad antibacteriana de las inflorescencias de *Espeletia schultzii* (Asteraceae). *Ciencia-Maracaibo*. 1999; 7(1): 72-77.

[24] Gutiérrez, S.R., Fuentes, O., Téllez, A.N., and Torrenegra, R.D. Principios activos antibacterianos de *Espeletia barclayana*. Rev. Latim. Quím. 1998; 26(3): 71-74.

[25] Slimestad R., Marston A., Mavi S. and Hostettmann K. Larvicidal Constituents of *Melantheria albinervia*. Planta Med. 1995; 61(6): 562-563.

[26] Yamaguchi M., Taniguchi M., Kubo I. and Kubota T. Inhibitory Effect of Antibacterial and Antitumor Diterpenoids on Oxidative Phosphorylation in Mitochondria Isolated from Rat Liver. Agric. Biol. Chem. 1977; 41(12): 2475-2477.

[27] Lin L-H., Lee L-W., Sheu S-Y. and Lin P-Y. Study on the Stevioside Analogues of Steviolbioside, Steviol, and Isosteviol 19-Alkyl Amide Dimers: Synthesis and Cytotoxic and Antibacterial Activity. Chem. Pharm. Bull. 2004; 52(9): 1117- 1122.

[28] Peña, A., Alarcón, L., Usubilaga, A., Velasco, J., Delgado P. Contribución al estudio de los ácidos kaurénicos aislados a partir de *Coespeletia moritziana* Sch. Bip. Ex. Wedd. (Frailejón) y su actividad antibacteriana. Argrollania. 2009; 6, 67-84.