

QK, 495
274237

REPUBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE INGENIERIA
POSTGRADO EN CIENCIAS APLICADAS



Tesis Doctoral

www.bdigital.ula.ve

**Estudio fitoquímico y farmacológico de
Coespeletia moritziana (Asteraceae)**

DONACION

Farm. MSc. Yndra Cordero de Rojas
Tutor: Dr. Alfredo Usubillaga
Co-tutora: Dra. María Eugenia Lucena

SERBIULA
Tullo Febres Cordero

Mérida-Venezuela
Diciembre, 2012

RESUMEN

El ácido *ent*-kaurénico y algunos de sus derivados son conocidos por poseer propiedades biológicas interesantes. De la *Coespeletia moritziana* se aislaron los siguientes compuestos el ácido kaurénico, ácido grandiflorénico, ácido 15 α hidroxikaurénico, el ácido 15 α acetoxikaurénico y kaurenol para estudiar su viabilidad celular y ensayar su posible actividad citotóxica y antimicrobiana. Por hemisíntesis del ácido kaurénico se obtuvo el ácido 16,17-epoxikaurénico, el ácido 15-oxo-*ent*-kaur-16-en-19-oico y el ester glucosídico del ácido kaurénico. La actividad citotóxica de estos compuestos se ensayo contra carcinoma epitelial de cuello de útero humano (HeLa), carcinoma de pulmón humano (A-549), adenocarcinoma de mama (MCF-7) y la línea celular no tumoral de riñón de mono verde africano (Vero). El compuesto ácido 15-oxo-*ent*-kaur-16-en-19-oico presentó una $IC_{50} \leq 9 \mu M$ frente a las tres líneas celulares cancerosas estudiadas. El ácido kaurenico resultó ser activo frente a las líneas celulares HeLa, A-549 y Vero pero no frente a la célula MCF-7. Otro compuesto interesante es el ácido grandiflorénico que mostró una moderada actividad frente a las cuatro líneas celulares. El derivado glucosídico, mostró una leve actividad contra las HeLa y A-549. El Kaurenol mostró una actividad moderada frente a la línea celular A-549. Se realizaron estudios sobre la viabilidad celular con células mononucleares, presentes en sangre periférica, separadas por la técnica de Ficoll-Hypaque, ajustadas a 2×10^6 cel/mL e incubadas con los compuestos en estudio a las concentraciones de 0.05, 0.5, 5 y 50 $\mu g/mL$. El ácido 15,16-epoxi-17-acetoxikauran 19-oico resultó ser el menos tóxico de todos los kaurenos estudiados con una viabilidad celular del 99% a la concentración de 0.05 $\mu g/mL$. El ester glucosídico del ácido kaurénico y el ácido 15 α -oxo kaurénico mostraron baja toxicidad a la concentración de 50 $\mu g/mL$ con una viabilidad celular del 44%. Entre los kaurenos mas tóxicos a todas las concentraciones se encuentra el acetato de kaurenol y el ácido 16 α -hidroxikaurénico. Por otra parte el ácido grandiflorénico, el ácido kaurénico y el kaurenol fueron poco tóxicos solamente a la mayor concentración estudiada. La actividad antimicrobiana del ácido kaurénico y sus derivados fue evaluada a una concentración máxima de 40 $\mu g/mL$ frente *Bacillus subtilis* CECT39, *Staphylococcus aureus* ATCC6538, *Enterococcus faecalis* CECT735, *Escherichia coli* CECT99, *Pseudomonas aeruginosa* AK958 y la levadura *Candida albicans* CECT 1039. La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue determinada por el método de microdilución en medio líquido en placas de 96 pozos. El ácido kaurénico fue activo contra *B. subtilis* a una CIM de 10 $\mu g/mL$, el ácido grandiflorénico presentó actividad contra *B. subtilis* CMI 5 $\mu g/mL$, *E. faecalis* CMI 10 $\mu g/mL$ y *S. aureus* 20 $\mu g/mL$. Mientras que el ácido 15 α -acetoxikaurénico y el ácido 15-oxo-*ent*-kaur-16-en-19-oico presentaron una moderada actividad frente a *B. subtilis* (CIM 40-20 $\mu g/mL$). De acuerdo con los resultados obtenidos se pudo observar que la estructura química de estos compuestos juega un papel importante en la actividad citotóxica y antimicrobiana ensayada. Se observó que si hay sustituyentes en la posición C-15, o se modifica el grupo carboxilo en C-19 o se elimina el doble enlace exocíclico en C-16 y C-17, estos cambios estructurales no favorecen la actividad biológica. A excepción del ácido 15-oxo kaur-16-en-19-oico que resultó ser el compuesto con mayor actividad citotóxica de los kaurenos ensayados en este estudio.

ABSTRACT

Ent-Kaurenic acid and some of its derivatives are known to have interesting biological properties. kaurenic acid, grandiflorenic acid, 15 α -OH-*ent*-kaur-16-en-19-oic acid, 15 α -acetoxi-*ent*-kaur-16-en-19-oic acid and kaurenol were isolated from *Coespeletia moritziana* to study their possible cytotoxic and antimicrobial activity. With the same purpose kauranic acid, 16,17-epoxi-*ent*-kauran-19-oic acid, 15-oxo-kaur-16-en-19-oic acid, and *ent*-kaur-16-en-19-oic acid glucopyranosyl ester were obtained through hemisynthesis and equally assayed. The cytotoxic activity of these compounds were assayed against human uterus carcinoma (HeLa), human lung carcinoma (A-549), breast cancer (MCF-7), and non-cancerous kidney cells of green african monkey (Vero). 15-oxo-kaur-16-en-19-oic acid presented $CI_{50} \leq 9 \mu M$ against the three cancerous cell lines studied. Kaurenic acid was active against HeLa, A-549, and Vero celular lines, but not against MCF-7. Another interesting compound was grandiflorenic acid which was moderately active against all four celular lines. The glucopyranosyl ester derivative only showed very low activity against HeLa and A-549, while kaurenol was found to be moderately active (CI_{50} of 28.2 μM) against A-549. Human mononuclear cells obtained from periferal blood (CMSP) were separated using the Ficoll-Hypaque technique, adjusted to a concentration of 2×10^6 cell / mL and incubated with the assayed compounds at concentrations of 0.05, 0.5, 5, and 50 $\mu g/mL$ during 48 hours to test their celular viability. The least toxic kaurenic derivative studied was 15,16-epoxi-17-acetoxi-(-)-kauran-19-oic acid with a celular viability of 99% at 0.05 $\mu g/mL$. Another compound that showed low toxicity was 2,3,4,6-tetra-acetyl- α -D-glucopyranosyl ester of 15-oxo-(-)-kaur-16-en-19-oic acid with 44% viability at 50 mmol/well. The most toxic compounds at all concentrations were (-)-kaur-16-en-19-ol acetate and 16 α -hydroxy-(-)-kauran-19-oic acid. On the other hand (-)-kaur-9(11)16-dien-19-oic acid, (-)-kauran-19-oic acid, and (-)-kaur-16-en-19-ol were toxic only at the highest concentration studied. Antibacterial activity was also evaluated against *Bacillus subtilis* CECT39, *Staphylococcus aureus* ATCC6538, *Enterococcus faecalis* CECT735, *Escherichia coli* CECT99, *Pseudomonas aeruginosa* AK958 and *Candida albicans* CECT 1039. Minimum inhibitory (CMI) concentration were determined using microdilution on 96 well plates. Kaurenic acid was active against *B. subtilis* (CIM 10 $\mu g/mL$), Grandiflorenic acid was active against *B. subtilis* (CIM 5 $\mu g/mL$), *E. faecalis*. (CIM 10 $\mu g/mL$), and *S. aureus* (CIM 20 $\mu g/mL$), while 15 α -acetoxi-*ent*-kaur-16-en-19-oic acid and 15-oxo-kaur-16-en-19-oic acid. Shower moderate activity against *Bacillus subtilis* (CMI 40-20 $\mu g/mL$). These results indicate that chemical structure might play a very important role on citotoxic and antibacterial activity. It was observed that substitution at C-15, changes at the carboxilic acid moeity or ellimination of the double bond C-16, C-17 lead to lower biological activity, with the exception of 15-oxo-kaur-16-en-19-oic acid which is the most active cytotoxic compound among the kaurene derivatives assayed in this study.

www.bdigital.ula.ve

"Da tu primer paso ahora. No es necesario que veas el camino completo, pero da tu primer paso. El resto irá apareciendo a medida que camines"

Martín Luther, Jr.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por haberme acompañado y guiado, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.

Le doy gracias a mi madre y hermana, por apoyarme en todo momento, por los valores que me han inculcado y por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida, y ejemplo a seguir.

A mis hijos Mafer y Arturito, por ser lo más grande y valioso que Dios me ha regalado, quienes son mi fuente de inspiración y la razón que me impulsa a seguir adelante.

A mi esposo Luis, por ser una parte importante de mi vida y por el apoyo que me ha brindado siempre en bien de mi formación y superación. Gracias por estar siempre a mi lado, Te amo.

Es para mí motivo de gran satisfacción y orgullo el haber tenido la oportunidad de ser dirigida por Dr. Alfredo Usubillaga, a quien quiero agradecer de manera especial por su dedicación a esta investigación, por el apoyo que siempre me ha dado, por sus orientaciones y consejos, por la ilusión y el empeño que ha puesto en esta Tesis. Pero, sobre todo, quiero expresarle mi más profundo agradecimiento por ser mi maestro.

Quiero expresar mi agradecimiento especial a la Dra. María Eugenia Lucena de Ustáriz quien es mi amiga, compañera de trabajo y cotutora de esta tesis, siempre generosa y dispuesta como pocos, que compartió conocimientos y experiencias profesionales desde el primer momento, y que sacrificó su familia para poder realizar los ensayos biológicos fuera del país. Espero no defraudarte y contar siempre con tu valioso apoyo, sincero e incondicional.

A los profesores y amigos Grecia Méndez de Corao, José A. Cova, Janne Rojas, Alirica Suarez, Liliana Araujo, Alida Pérez, Diolimar Buitrago, María

Eugenia Rondón, Libia Alarcón, Alexis Peña y Judith Velazco, por sus ensayos, contribuciones y asesoría académica.

A la Dra. Dña. Laila Moujir Moujir del Departamento de Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad de La Laguna, por la inestimable ayuda en la realización de los ensayos para la determinación de las actividades antimicrobiana y citotóxica.

Gracias a todas y cada una de las personas (Marielba, Rosa, Eduardo, Johanna, Ysbelia, Ismer, Julio y Thayded) que sin esperar nada a cambio participaron invirtiendo su tiempo y conocimiento para ayudarme a completar mi proyecto de tesis y convertirlo en una realidad. Gracias por su amistad.

Finalmente debo agradecer a la Universidad de los Andes, al CDCHT en los proyectos FA-510-11-08-ED, FA-509-11-08-A, respectivamente, y a la Beca Misión Ciencia (contrato N° 200700482) por sus valiosos aportes y colaboración en la realización de esta investigación.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág
Introducción	1
Antecedentes	10
Consideraciones taxonómicas de la familia Asteraceae	11
Antecedentes geográficos	11
Antecedentes de la familia Asteraceae y el género <i>Coespeletia moritziana</i>	16
Constituyentes característicos de la sub-tribu Espeletiinae	21
Poliacetilenos	22
Hidroxiacetofenona	22
Diterpenos	23
Sesquiterpenos	26
Lactonas sesquiterpénicas	27
Triterpenos	27
Flavonoides	28
Biogénesis de los <i>ent</i> -kaurenos	29
Actividad biológica del ácido <i>ent</i> -kaureno	31
Hipótesis	32
Objetivos	34
CAPITULO I: Recolección y extracción de los <i>ent</i>-kauranos presentes en <i>Coespeletia moritziana</i>	36
Parte experimental	37
Técnicas generales aplicadas	37
Materiales y métodos	38
Obtención del material botánico	38
Obtención de los compuestos	38
Resultados y discusión	49
Caracterización de los productos naturales aislados de <i>Coespeletia moritziana</i>	49
II.3.1.- Acido kaurénico	50
II.3.2.- Acido Grandiflorénico	53
II.3.3.- Acido 15 α -hidroxi-kaur-16-en-19-oico	55
II.3.4.- Acido 15 α -acetoxi-kaur-16-en-19-oico	58
II.3.5.- Acido-kauran-19-oico (ácido kauránico)	61
II.3.6.- Acido 16 α -hidroxi-kauran-19-oico	62
II.3.7.- kaurenol	64
II.3.8.- Acetato de kaurenol	66
II.3.9.- Acido 15, 16-epoxi-17-acetoxi-kauran-19-oico	69
II.3.10.- Ester 2,3,4,6 tetra acetil- α -D-glucopiranosilo del ácido 15-oxo-kaur-16 en-19-oico	73
CAPITULO II: Actividad citotóxica sobre células tumorales y células no tumorales	78
Introducción	79
Células mononucleares	81

Células epiteliales	82
Células Vero	82
Células HeLa	83
Células A-549	83
Células MCF-7	84
Materiales y métodos	85
Soluciones de trabajo	85
Ensayo citotóxico con células mononucleares	86
Aislamiento de las células mononucleares CMSP	86
Preparación de las muestras de derivados del <i>ent</i> -kaureno	87
Ensayo citotóxico con líneas células establecidas	88
Análisis de la viabilidad celular sobre líneas celulares establecidas	89
Resultados y discusión	90
Ensayo citotóxico con células mononucleares	90
Ensayo citotóxico con líneas células establecidas de carcinoma	92
CAPITULO III: Actividad antibacteriana de los <i>ent</i>- kaurenos	97
Introducción	98
Género <i>Staphylococcus</i>	100
Género <i>Enterococcus</i>	102
Género <i>Bacillus</i>	103
Género <i>Escherichia</i>	104
Género <i>Pseudomonas</i>	105
Género <i>Candida</i>	106
Materiales y métodos	107
Microorganismos	107
Medios de cultivo	107
Mantenimiento y conservación de los microorganismos	109
Preparación de los inóculos microbianos	109
Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	109
Resultados y discusión	110
Conclusiones	113
Bibliografía	117
Anexos	136

INDICE DE FIGURAS

		Pág
Figura 1	Frailejones	14
Figura 2	Inflorescencia de las compuestas	16
Figura 3	Asteraceas	17
Figura 4	Espeletia	19
Figura 5	<i>Coespeletia moritziana</i>	20
Figura 6	Flor de <i>Coespeletia moritziana</i>	21
Figura 7	Poliacetilenos	22
Figura 8	Hidroxiacetofenona	22
Figura 9	Unidad fundamental de los <i>ent</i> -kauranos	23
Figura 10	Diterpenos	24
Figura 11	Sesquiterpenos	26
Figura 12	Lactonas sesquiterpénicas	27
Figura 13	Triterpenos	28
Figura 14	Flavonoides	28
Figura 15	Páramo la culata	39
Figura 16	Derivados del <i>ent</i> -Kauranos	40
Figura 16	Acido kaurénico	40
Figura 17	Acido Grandiflorénico	40
Figura 18	Acido 15 α -hidroxi-kaur-16-en19-oico	40
Figura 19	Acido 15 α -acetoxi-kaur-16-en19-oico	40
Figura 20	Acido 16 α -hidroxi-kauran-19-oico	41
Figura 21	Kaurenol	42
Figura 22	Acetato de kaurenol	43
Figura 23	Acido kauran 19-oico	43
Figura 24	ácido 15-oxo- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oico	44
Figura 25	Acido 15, 16-epoxi-17-acetoxi-kauran-19-oico	45
Figura 26	Algunos epóxidos obtenidos de trabajos anteriores	46
Figura 27	Ester 2,3,4,6 tetra acetil α -D-glucopiranosilo del ácido 15-oxo-kaur-16-en-19-oico	48
Figura 28	Correlación de los protones del ácido 15, 16-epoxi-17 acetoxi kauran 19-oico	73
Figura 29	Células Vero en cultivo	82
Figura 30	Células Hela	83
Figura 31	Células A-549	83
Figura 32	Células MCF-7	84
Figura 33	Relación estructura actividad citotóxica	95
Figura 34	Bacterias del género <i>Staphylococcus</i>	101
Figura 35	Bacterias del género <i>Enterococcus</i>	103

Figura 36	Bacterias del género <i>Bacillus</i>	104
Figura 37	Bacterias del género <i>Escherichia</i>	105
Figura 38	Género <i>Pseudomonas</i>	106
Figura 39	Género <i>Candida</i>	107
Figura 40	Relación estructura actividad antibacteriana	112
Figura 41	Cultivos en monocapa	137
Figura 42	Muestra de sangre periférica heparinizada	140
Figura 43	Cuadrado 3x3 mm de una cámara de Neubauer	146
Figura 44	Región de una cámara de Neubauer	147
Figura 45	Cámara de Neubauer	147

www.bdigital.ula.ve

INDICE DE ESPECTROS

ESPECTROS RMN ¹H

	Pág
Acido kaurénico	51
Acido Grandiflorénico	53
Acido 15 α -hidroxi-kaur-16-en-19-oico	56
Acido 15 α -acetoxi-kaur-16-en-19-oico	59
Acido kauran 19-oico	61
Acido 16 α -hidroxi-kauran 19-oico	63
Kaurenol	64
Acetato de kaurenol	67
Acido 15, 16-epoxi-17-acetoxi-kauran-19-oico	69
Ester 2,3,4,6 tetra acetil α -D-glucopiranosilo del ácido 15-oxo-kaur-16-en-19-oico	74

ESPECTROS RMN ¹³C

Acido kaurénico	52
Acido Grandiflorénico	54
Acido 15 α -hidroxi-kaur-16-en-19-oico	57
Acido 15 α -acetoxi-kaur-16-en-19-oico	60
Acido kauran 19-oico	
Ester del ácido 16 α -hidroxi-kauran 19-oico	63
Kaurenol	65
Acetato de kaurenol	68
Acido 15, 16 epoxi-17-acetoxi-kauran 19-oico	70
Ester 2,3,4,6-tetra-acetil- α -D-glucopiranosilo del ácido-15-oxo-kaur-16-en-19-oico	75

ESPECTRO HMQC

Ester 2,3,4,6 tetra acetil α -D-glucopiranosilo del ácido 15-oxo-kaur-16-en-19-oico	72
--	----

ESPECTRO HMBC

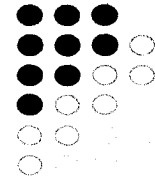
Ester 2,3,4,6-tetra-acetil α -D-glucopiranosilo del ácido 15-oxo-kaur-16-en-19-oico	72
--	----

INDICE DE TABLAS

		Pág
Tabla 1	Taxonomía de las <i>Espeletias</i>	22
Tabla 2	Número de especies de frailejón descritas para Colombia, Ecuador y Venezuela, distribuidas por géneros	24
Tabla 3	Características físicas del ácido kaurénico	50
Tabla 4	Desplazamientos químicos en el espectro RMN ¹ H del ácido kaurénico	51
Tabla 5	Desplazamientos químicos en el espectro RMN ¹³ C del ácido kaurenico	52
Tabla 6	Características físicas del ácido grandiflorénico	53
Tabla 7	Desplazamientos químicos en el espectro RMN ¹ H del ácido grandiflorénico	54
Tabla 8	Desplazamientos químicos en el espectro RMN ¹³ C del ácido grandiflorénico	55
Tabla 9	Características físicas del ácido 15 α-hidroxi-kaur-16-en19-oico	55
Tabla 10	Desplazamientos químicos en el espectro RMN ¹ H del ácido 15 α-hidroxi-kaur-16-en19-oico	56
Tabla 11	Desplazamientos químicos en el espectro RMN ¹³ C del ácido 15 α-hidroxi-kaur-16-en19-oico	57
Tabla 12	Características físicas del ácido 15α-acetoxi-kaur-16-en19-oico	58
Tabla 13	Desplazamientos químicos en el espectro RMN ¹ H del 15 α-acetoxi-kaur-16-en19-oico	59
Tabla 14	Desplazamientos químicos en el espectro RMN ¹³ C del ácido 15 α-acetoxi-kaur-16-en19-oico	60
Tabla 15	Características físicas del ácido kauran 19-oico	61
Tabla 16	Desplazamientos químicos en el espectro RMN ¹ H del ácido kauran 19-oico	62
Tabla 17	Características físicas del ácido 16 α-hidroxi-kauran 19-oico	62
Tabla 18	Características físicas del kaurenol	64
Tabla 19	Desplazamientos químicos en el espectro RMN ¹ H del kaurenol	65
Tabla 20	Desplazamientos químicos en el espectro RMN ¹³ C del kaurenol	66
Tabla 21	Características físicas del Acetato de kaurenol	66
Tabla 22	Desplazamientos químicos en el espectro RMN ¹ H del Acetato de kaurenol	67
Tabla 23	Desplazamientos químicos en el espectro RMN ¹³ C del Acetato de kaurenol	68

Tabla 24	Características físicas del ácido 15, 16 epoxi-17-acetoxi kauran 19-oico	69
Tabla 25	Desplazamientos químicos en el espectro RMN ¹ H del ácido 15, 16 epoxi-17-acetoxi kauran 19-oico	70
Tabla 26	Desplazamientos químicos en el espectro RMN ¹³ C del ácido 15, 16 epoxi-17-acetoxi kauran 19-oico	71
Tabla 27	Características físicas del Ester 2,3,4,6 tetra acetil α-D-glucopiranosilo del ácido 15 oxo-kaur-16-en-19-oico	73
Tabla 28	Desplazamientos químicos en el espectro RMN ¹ H del Ester 2,3,4,6 tetra acetil α-D-glucopiranosilo del ácido 15 oxo-kaur-16-en-19-oico	74
Tabla 29	Desplazamientos químicos en el espectro RMN ¹³ C del Ester 2,3,4,6 tetra acetil α-D-glucopiranosilo del ácido 15 oxo-kaur-16-en-19-oico	76
Tabla 30	Correlación de los desplazamientos químicos de ¹³ C de todos los compuestos	77
Tabla 31	Porcentaje de viabilidad de las CMSP humanas en presencia de kaurenos a diferentes concentraciones y sus respectivos IC ₅₀	91
Tabla 32	Actividad citotóxica de 8 diterpenos frente a las líneas celulares tumorales y las células Vero, incorporadas en la fase inicial de crecimiento y cultivadas durante 48 horas	94
Tabla 33	Correlación de los IC ₅₀ y índice de selectividad de los compuestos frente a las líneas celulares tumorales y las células Vero y CMPS en la fase inicial de crecimiento	95
Tabla 34	Concentraciones mínimas inhibitorias y mínimas bactericidas del ácido kaurénico y sus derivados frente a diferentes microorganismos	111

Introducción



www.bdigital.ula.ve

INTRODUCCION

En la década de los 70 y 80, los productos naturales pasaron por una fase de reducido interés en el descubrimiento de drogas, debido a los enormes esfuerzos necesarios para aislar los principios activos y elucidar sus estructuras. Sin embargo, el desarrollo tecnológico, que ha permitido reducir el tiempo y la cantidad de muestra para llevar a cabo el aislamiento, elucidación estructural y ensayos biológicos, junto con el amplio espectro de variación estructural encontrado en la naturaleza, han hecho resurgir el interés por los productos naturales (Kubinyi, 1995)

Estos ofrecen compuestos que abren enfoques terapéuticos nuevos; además, han contribuido sustancialmente a la identificación y entendimiento de nuevas rutas biogénicas, con lo que no sólo se dispone de drogas, sino que también han sido una herramienta esencial para la Bioquímica, la Biología Molecular (Grabley y Thiericke, 1999) y el desarrollo académico de estas disciplinas. Dado que sólo un pequeño porcentaje de los organismos vivientes en la biosfera han sido descritos hasta la fecha, existe un enorme reservorio de compuestos naturales sin descubrir, con una amplia diversidad estructural.

Muchos fármacos del mercado han llegado hasta nosotros mediante el uso que le ha dado la cultura popular y de los pueblos primitivos. Estos fármacos están siendo usados de alguna manera en la medicina moderna, aunque no necesariamente con el mismo propósito para el que eran empleados por el pueblo. La medicina popular ha sido una herramienta útil para el descubrimiento de muchos de los medicamentos que usamos y de otras sustancias biológicamente activas. Así, el conocimiento indígena ha permitido el descubrimiento de tres tipos de productos naturales con aplicación clínica:

Productos naturales sin modificar, donde el uso etnobotánico sugirió la eficacia clínica (ej.: glicósidos cardiotónicos de *Digitalis*).

Productos naturales sin modificar, en los que la eficacia terapéutica fue tan sólo remotamente sugerida por el uso indígena de plantas (ej.: vincristina).

Productos naturales modificados o sustancias sintéticas basadas en productos naturales usados en la medicina popular (ej.: aspirina). (Tomado y modificado de Núñez, 2004).

Sin embargo, no debemos olvidar el peligro asociado al descubrimiento de nuevos fármacos de origen natural y es que medicinalmente especies valiosas lleguen a estar amenazadas por la sobreexplotación, aunque se considera que el descubrimiento de una nueva droga derivada de planta será útil para su conservación (Prance, 1994).

La búsqueda de nuevos fármacos con fines terapéuticos se ha incrementado de forma considerable. En los últimos años la existencia de enfermedades para las cuales no existen medicamentos efectivos, como el cáncer, la resistencia de los agentes patógenos, los avances en las técnicas de biología molecular que han llevado a la identificación de un número cada vez mayor de moléculas "diana" junto con el conocimiento de la relación entre anomalías funcionales y estructurales con ciertas patologías, son algunos de los factores que han aumentado el interés en la búsqueda de fármacos que sean capaces de ejercer acciones específicas y que sean potentes.

Por su parte, los productos naturales facilitan dichas bases actuando como sustrato, modelo o estructura base para generar nuevas moléculas antitumorales por química combinatoria con comprobación inmediata de su actividad. Estudios recientes sobre compuestos antitumorales de origen vegetal están proporcionando nuevas estructuras, muchas de ellas sumamente complejas por lo que resulta difícil pensar que pudieran haber sido sintetizados de forma empírica con el fin de hallar nuevos fármacos (Prance, 1994).

Por otro lado, el cáncer es uno de los principales problemas de salud pública en el mundo y una de las enfermedades que están más ligadas al fenómeno del progreso humano. Se encuentra en general en todos los animales superiores y forma parte de una patología compleja ya que no existe un cáncer sino una multi-

tud de cánceres (abarca un grupo heterogéneo con más de 200 tipos de tumores malignos). Cada tipo de cáncer posee unas características particulares, pudiendo considerarse enfermedades independientes, con sus causas, su evolución y su tratamiento específico.

En el mundo occidental el riesgo de cáncer es mayor debido a los hábitos de vida poco saludables como el tabaquismo, el sedentarismo o el consumo de dietas hipercalóricas ricas en grasas saturadas que son factores que predisponen al cáncer de pulmón, al cáncer de mama o al cáncer de colon. En los países en vías de desarrollo el número de fallecimientos por cáncer es menor que en los países desarrollados debido a la mayor mortalidad infantil y a la mayor mortalidad por enfermedades infecciosas. En este sentido no se debería olvidar que el cáncer tiene mayor incidencia en los grupos de mayor edad y que, por tanto, la mayor esperanza de vida lograda en los países desarrollados tiene como contrapartida mayor incidencia de enfermedades ligadas al envejecimiento gradual de la población.

El cáncer se caracteriza por la multiplicación incontrolada de las propias células corporales (resistiendo a las señales exógenas de inhibición del crecimiento, proliferando sin control) y la diseminación dentro del organismo (invasión y metástasis), que es capaz de comprometer la funcionalidad del cuerpo y llegar a producir la muerte. Se produce como consecuencia de la acumulación de múltiples alteraciones o errores en el sistema que la célula usa para regular la proliferación. Así la célula adquiere la capacidad de propagarse de forma indefinida (capacidad de las células para generar sus propias señales mitógenas), en su sitio o bien en zonas diferentes de su localización normal como consecuencia de una pérdida de control de su proliferación, diferenciación o de la respuesta a las señales que ordenan su eliminación controlada por apoptosis (evadiendo la apoptosis) (Hanahan *et al*, 2000; Kuntz *et al*, 1999). El conocimiento del cáncer es tan antiguo como la utilización de determinadas plantas medicinales en su tratamiento (Cragg *et al*, 1997).

Los principios activos de algunas plantas con actividad antitumoral han podido ser identificados, uno de ellos es el podofilino: utilizado desde hace más de 2000 años por los chinos como fármaco antitumoral; las resinas de esta planta *Podophyllum hexandrum* han dado lugar al aislamiento de lignanos y heterósidos que poseen actividad antitumoral (Stahelin, 1973).

Aunque los componentes mayoritarios no son utilizables como fármacos, si son utilizados sus derivados semisintéticos como el etopósido que se utiliza en el tratamiento de tumores germinales, cáncer microcítico de pulmón, neoplasias hematológicas, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer gástrico y tumores de origen desconocido y el tenopósido que se utiliza en leucemias agudas infantiles mielomonocítica y linfoide. También es activo en linfomas, tumores uroteliales y neuroblastomas (Williams *et al*, 1987; Harvey, 1999).

La vinblastina y vincristina, alcaloides indólicos dímeros del *Cathartus roseus* constituyen el mayor logro en la quimioterapia del cáncer con actividad antileucémica; se emplean solos o en combinación con otras formas terapéuticas para el tratamiento del cáncer. La vincristina se utiliza en numerosos tumores infantiles y adultos (linfomas y leucemias, tumor de Wilms, sarcoma de Edwing, rabdomiosarcoma, mieloma múltiple y carcinoma microcítico de pulmón). La vinblastina se utiliza en la enfermedad de Hodgkin y cáncer de vejiga, también es activa en el sarcoma de Kaposi, neuroblastoma, cáncer de mama y de riñón (Noble, 1990; Devita, 1970).

El estudio de la actividad de determinados compuestos naturales ha ayudado a establecer mejor los mecanismos de acción de nuevos antitumorales. Así, los estudios sobre el Taxol® (registrado por la compañía Bristol-Myers Squibb, obtenido de la corteza del árbol *Taxus brevifolia* (Wani *et al*, 1971) y derivados como el Taxotere® interaccionan con los microtúbulos generando uniones estables que favorecen la polimerización de los microtúbulos y los estudios sobre la camptotecina obtenida a partir del árbol nativo de China *Camptotheca acuminata* (inhibición selectiva e irreversible de la ADN topoisomerasa I (Liu *et al*,

2000) que impide la replicación del ADN) han permitido potenciar la investigación en este campo, buscando nuevos antitumorales que actúen de forma similar.

Los terpenos representan un amplio grupo de compuestos de origen natural que tienen gran valor como prometedores agentes antitumorales (de ahí el interés mostrado a través de estos años y el fruto de esta tesis). Su amplia bioactividad y su elevada presencia en la dieta humana los hace merecedores de la atención de la investigación farmacológica.

La búsqueda de principios activos dentro de los terpenos tiene, desde el punto de vista farmacológico, algunas ventajas respecto a otros grupos de compuestos naturales. La más importante es la uniformidad de la configuración química de toda la familia, de modo que las relaciones entre estructura y actividad son más fáciles de establecer. Por otro lado, la disponibilidad de las moléculas terpénicas y la relativa facilidad de su obtención por síntesis favorecen la evaluación de sus propiedades.

Desde el punto de vista farmacológico, un gran número de derivados del *ent*-kaureno presentan amplia potencialidad como sustancias activas. Se pueden citar los siguientes ejemplos:

Edulcorantes: el steviosido, aislado de la *Stevia rebaudiana* Bert., es el responsable del sabor dulce de las hojas de la planta (Kohda *et al.*, 1976). Otros *ent*-kaurenos aislados con esta propiedad, son los rebaudiosidos y dulcosidos, todos ellos con 2 y 3 unidades de azúcares (Sakamoto *et al.*, 1977).

Antimicrobianos: un gran número de estos *ent*-kaurenos, han mostrado actividad contra bacterias y levaduras (Mitscher *et al.*, 1983; Padmaja *et al.*, 1995; Gutiérrez *et al.*, 1998; Velikova *et al.*, 2000; Kubo *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005).

Antiparasitarios: varios de estos compuestos se han ensayado contra el *Trypanosoma cruzi* (enfermedad de Chagas). Compuestos como él: *ent*-kaur-16-en-19-ol y el 16 α -hidroxi-*ent*-kaurano fueron particularmente activos (Da Costa *et al.*, 1996).

Antivirales: existen numerosos trabajos que muestran actividad antiviral de los derivados del *ent*-kaureno. Un ejemplo es la tripterifordina, esta es una lactona aislada del *Trypterigium wilfordii*, planta originaria de China y con demostradas actividades como antitumoral, inmunosupresiva y antiinflamatoria (Chen *et al.*, 1992); otro compuesto es el ácido 16 β -17-dihidroxi-*ent*-kaur-19-oico, el cual inhibe significativamente la replicación del virus HIV en las células linfocíticas H-9 con una EC₅₀ de 0,8 μ g/mL (índice terapéutico de >5) (Wu *et al.*, 1996).

Antiinflamatoria: el *ent*-kaureno: ácido 16 β ,17-dihidroxi-*ent*-kaur-19-oico aislado de la *Annona squamosa* (Yeh *et al.*, 2005) y utilizado como antiviral, presentó actividad antiinflamatoria moderada.

Antitumorales: existen numerosos trabajos de derivados del kaurano donde se cita la actividad citotóxica y antitumoral. El ácido *ent*-kaur-16-en-19-óico, presenta actividad antitumoral moderada *in vitro* contra varios tipos de tumores (Padmaja *et al.*, 1995; Fatope *et al.*, 1996). Los derivados sintéticos del ácido kaur-9(11), 16-dien-19-oico, muestran actividad citotóxica y citostática contra líneas de células cancerígenas humanas (Alonso *et al.*, 2005). Otro kaureno al que se le ha reportado actividad antitumoral *in vitro*, es el ácido 11 β -hidroxi-15-oxo-*ent*-kaur-16-ene-19-óico (Gustafson *et al.*, 1991).

Otras propiedades: la inhibición *in vitro* de la contracción arterial por parte del ácido *ent*-kaur-16-en-19-óico, aislado de la *Oyedaea verbesinoides*, ha sido también reportada (Muller *et al.*, 2003). Otros derivados del kaureno aislados de *Mikania hirsutissima*, han mostrado actividad en la proliferación de linfocitos (Ohkoshi *et al.*, 2004). La actividad espermicida y útero estimulante de varios kaurenos presentes en *Montanoa tomentosa* ha sido demostrada (Guzmán-Duran *et al.*, 1988; Campos-Lara *et al.*, 1990).

La subtribu Espeletiinae (Heliantheae: Asteraceae) está constituida por cerca de 180 especies que se distribuyen en los páramos desde el Norte de Ecuador hasta Venezuela. Aunque se asocia a la subtribu el hábito caulirrosulado, existe una diversidad de formas de vida que abarca desde delicadas rosetas sésiles de

menos de 50 cm de alto hasta caulirrósculas gigantes, arbustos y árboles de hasta 10 m de altura.

Coespeletia Cuatrec. es un género de la subtribu Espeletiinae, que consta de ocho especies de los páramos (viene del latín *paramus* y fue utilizada por los conquistadores españoles para designar las áreas del norte de los Andes que eran altas, inhóspitas, frías, con vientos y lluvias constantes, que al parecer les recordaba a la Península Ibérica (Luteyn, 1999)) y superpáramos venezolanos, siendo el páramo de Piedras Blancas la zona considerada por Cuatrecasas (1986) como su centro de especiación.

El género *Coespeletia*, descrito por Cuatrecasas en 1976, consta de ocho especies que se desarrollan entre los 3700 y los 4400 m de altitud. La *Coespeletia moritziana* posee hojas subcoriáceas y rígidas, cuyas láminas de 20 a 45 cm de largo y 1-2 cm de ancho poseen un denso indumento amarillo-dorado en ambas superficies, razón por la cual los campesinos la conocen por el nombre de frailejón amarillo y por sus aportes en la medicina tradicional. Esta especie presenta flores solitarias y nutantes de color rojo con un diámetro de 4 a 5 cm sobre tallos florales simples y erectos (Aristeguieta, 1964).

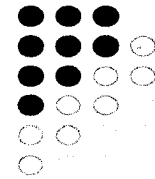
Por todo lo anteriormente expuesto se decidió aislar de *Coespeletia moritziana* al ácido kaurénico y algunos de sus derivados para realizarles estudios de la actividad antimicrobiana sobre ciertas cepas, *Bacillus subtilis* CECT39, *Staphylococcus aureus* ATCC6538, *Enterococcus faecalis* CECT735, *Escherichia coli* CECT99, *Pseudomonas aeruginosa* AK958 y la levadura *Candida albicans* CECT 1039, del mismo como producto natural y/o a través de modificaciones químicas.

En este trabajo se quiere mostrar también los efectos citotóxicos *in vitro* de sustancias aisladas de la planta *Coespeletia* frente a líneas celulares tumorales humanas: HeLa (carcinoma epitelial de cuello de útero humano), MCF-7 (adenocarcinoma de mama), A-549 (carcinoma de pulmón humano) y la línea celular no tumoral de riñón de mono verde africano (Alfonso *et al.*, 2006).

Es indispensable observar la toxicidad del principio activo frente a células normales y células obtenidas directamente de pacientes con cáncer; dentro del estudio de la molécula como posible agente antitumoral.

www.bdigital.ula.ve

Antecedentes



www.bdigital.ula.ve

I.- CONSIDERACIONES TAXONÓMICAS DE LA FAMILIA ASTERACEAE

I.1.- ANTECEDENTES GEOGRÁFICOS

El frailejón es la planta más representativa de la flora de los páramos andinos de Colombia, Ecuador y Venezuela. Los kauranos se distribuyen discontinuamente desde la región del Norte del Perú, conocida como Jalca hasta la Sierra Nevada de Santa Marta en Colombia (Luteyn, 1999). De Este a Oeste existen páramos desde la cordillera de Mérida en Venezuela hasta la cordillera de Talamanca en Costa Rica. En Venezuela, esta región empieza donde terminan los bosques y se extiende por encima de los 3000 metros hasta el límite inferior de las nieves perpetuas que se encuentra entre los 4500 y 4800 metros (Monasterios, 1980).

El ecosistema de páramo, hace parte de las montañas tropicales de América y se encuentra distribuido de manera discontinua. Es el último cinturón de vegetación y se encuentra, generalmente, sobre el límite superior del bosque húmedo altomontano. Al encontrarse por encima de la vegetación de bosque andino, el ecosistema se ve fragmentado, formando islas que representan una oportunidad de estudiar varios procesos evolutivos, como radiaciones adaptativas, por ser entes geográficos con límites definidos, por poseer flujo genético reducido con otras islas, por su tamaño pequeño y por poseer altos niveles de endemismo (Emerson, 2002).

Para llegar a esta distribución actual, los páramos han sufrido una historia compleja y dinámica, donde cada paramo puede ser resultado de un proceso diferente (Van der Hammen y Cleef, 1986). Los ciclos de glaciaciones ocurridos en el Pleistoceno tuvieron un gran impacto en las condiciones de la vegetación llevando a expansiones y contracciones del ecosistema, favoreciendo la especiación alopátrica (Simpson y Todzia, 1990). El aislamiento y su eventual contacto, la diversidad de nichos y ambientes, y la migración de especies desde diferentes lugares han contribuido a la evolución de esta flora (Van de Hammen y Cleef, 1986), y aunque este ecosistema es geológicamente reciente, 2–4 millones de años, se considera como uno de los ecosistemas de montaña que muestran

mayor diversidad y endemismo en el mundo (Luteyn, 1999), hacen de este ecosistema un lugar biogeográficamente único (Luteyn, 1999).

Según Cuatrecasas (Luteyn, 1999; Van der Hammen y Cleef, 1986), el páramo, está constituido por 3 zonas según la altitud y la estructura de la vegetación. Estas 3 zonas se denominan: subpáramo, el páramo propiamente dicho y superpáramo. Así mismo el páramo se puede clasificar dependiendo de las características topográficas, la exposición al viento y las condiciones climáticas, en páramo atmosféricamente húmedo y atmosféricamente seco. Según estas características las elevaciones a las que ocurre cada zona varían: el límite entre el bosque y el páramo puede ser más alto en la parte húmeda que en la seca (Van der Hammen y Cleef, 1986).

Dentro de las características particulares del ecosistema se encuentra una baja variación en la temperatura media entre estaciones, una gran variación en las condiciones climáticas diarias, altos niveles de radiación UV, fuertes vientos, baja presión atmosférica, bajos niveles en la presión parcial de oxígeno y la presencia de fuertes heladas (Vargas, 1998a; Luteyn, 1999). El patrón de “verano cada día e invierno cada noche” (Luteyn, 1999) es una de las características más determinantes y la que mayor impacto tiene en la evolución de las plantas tropicales de este ecosistema (Smith y Young, 1987).

Los suelos constituyen otra característica interesante: son relativamente jóvenes y poco desarrollados, almacenan grandes cantidades de agua, son pobres en nutrientes y su pH es ácido (Baruch, 1979, Vargas, 1998a). Todas estas condiciones abióticas llevan, como consecuencia, a que el crecimiento y desarrollo sea lento, la productividad primaria sea baja, a una lenta descomposición de biomasa muerta, una difícil absorción radicular de nutrientes, severas quemaduras en las plantas y a que la sucesión tome mucho tiempo (Castaño, 1995; Luteyn, 1999).

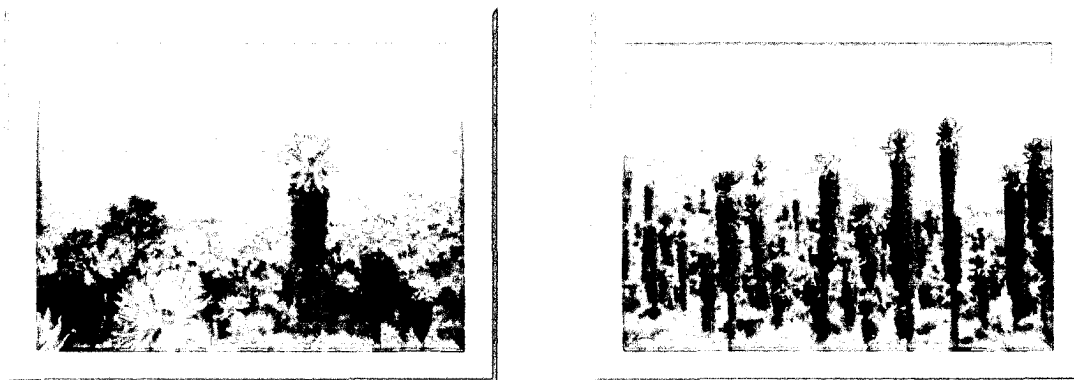
Varias de las adaptaciones morfológicas y fisiológicas que se encuentran en el páramo, se han desarrollado como un medio de escape o como una solución para tolerar las fluctuaciones extremas en el clima diario (Smith y Young, 1987).

Las formas de crecimiento constituyen un ejemplo de las adaptaciones que han sufrido diferentes especies de plantas, como respuesta a las presiones que ejerce el ecosistema. Dentro de estas formas de crecimiento se encuentran las rosetas (acaules o caulescentes), los pajonales, cojines, arbustos micrófilos y enanos, y las geófitas (Hedberg y Hedberg, 1979; Luteyn, 1999).

Sin embargo, estas formas de crecimiento no son exclusivas del páramo. Resulta interesante la recurrencia en el hábito de roseta y la correlación entre la fisiología y las historias de vida en muchos lugares del Nuevo y Viejo mundo (Sur América, Este de África y Hawái). Esto soporta la idea de evolución convergente, pues estas características son aparentemente adaptaciones para ambientes tropicales de alta montaña (Knox y Palmer, 1995). Ejemplos de evolución convergente en rosetas gigantes, se encuentran en las lobelias (Lobeliae), y los *Dendrosenecio* de África, la alianza de los "Silverswords" en Hawai y *Espeletiinae* y *Puya*, en América.

En el páramo, una de las especies más típicas y emblemáticas son las pertenecientes a la subtribu *Espeletiinae*, asignado por ciertos biólogos y botánicos, que se habían dedicado a su estudio y recolección. No se sabe que otro nombre le daban al frailejón las comunidades indígenas pero, para el resto de la humanidad son frailejones, y los llamaron así por su porte erguido, el cual le fue dado por los soldados de Sebastián de Benalcazar cuando en su avance hacia el Norte, se encontraron a su paso por el páramo de El Ángel, con sus tallos cubiertos por muchas hojas secas y otras más relativamente grandes, que terminan formando una roseta en la punta, que de lejos y entre las neblinas, los hace parecidos a unos frailes gigantescos (Ibáñez, 2004) .

Figura 1: Frailejones



Fuente: <http://www.paramo.org/node>

<http://gualmatan-narino.gov.co>

En 1801, Humboldt y Bonpland hicieron una recolección de 3 especies de frailejón en Bogotá, las cuales agruparon bajo el nombre de *Espeletia*, que luego publicaron en 1808; este género había sido creado por José Celestino Mutis y dedicado al Virrey del nuevo reino de Granada José de Espeleta.

Este homenaje sobrepasó las expectativas del autor y el nombre *Espeletia* fue validado por Humboldt y multiplicado no sólo en el número de frailejones, que supera la centena, sino en la creación de nuevos géneros y de una subtribu que llevan los nombres de *Espeletiopsis*, *Coespeletia* y *Espeletiinae* todos ellos derivados del apellido Espeleta (Papavero, 1995).

Para el año de 1799, Humboldt recolectó en Caracas un árbol resinoso que en el año 1814 fue descrita como *Trixis neriifolia*, pero en 1856 Schultz Bipontinus lo transfirió al género *Espeletia*, y en 1870 Ernst creó para esta especie un nuevo género *Libanothamus*, nombre derivado de la palabra griega libanos, que significa resina y que por mucho tiempo fue considerado sinónimo de *Espeletia* (Ibáñez, 2004).

Smith y Koch en 1935 realizaron el primer tratamiento filogenético del género y hasta ese momento se habían identificado 30 especies de frailejón las cuales incluían 3 especies de árboles y 27 de plantas herbáceas.

Para 1964 se conocía la existencia de 45 especies venezolanas (Aristeguieta, 1964) y en 1969 el número de especies conocidas era de 91 (Ibáñez, 2004). Ese mismo año José Cuatrecasas, realizó una serie de recolecciones en los páramos colombianos los cuales complementó con viajes sucesivos a los Andes Venezolanos en los años 1970 y 1973, en compañía de los profesores Luis Ruiz Terán y Manuel López Figueiras de la Facultad de Farmacia de la Universidad de los Andes, en donde identificaron 33 nuevas especies.

Todos estos viajes le permitieron a Don José Cuatrecasas observar las formas de crecimiento y otras características vegetativas de todas las especies de frailejón conocidas hasta ese momento, y propuso separarlas en 7 géneros *Carramboa*, *Coespeletia*, *Espeletia*, *Espeletiopsis*, *Libanothamus*, *Ruilopezia* y *Tamania*, que tenían algo en común en relación a sus flores y frutos, que era la presencia de 19 cromosomas, considerando que constituían una unidad taxonómica superior, lo que llevó a agruparlas bajo la subtribu Espeletiinae (Cuatrecasas, 1986). Posteriormente, un octavo género, fue reconocido por Cuatrecasas en 1995, *Paramiflos*. La transferencia del género *Espeletia* a la subtribu Espeletiinae (Heliantaeae) (Cuatrecasas, 1976), fue sustentada por Robinson en 1981.

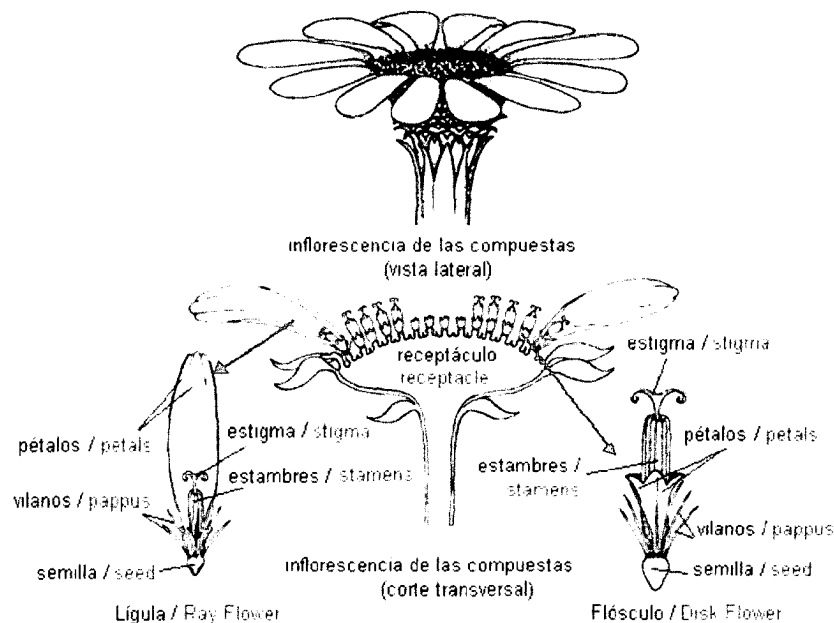
Según Cuatrecasas (1986), el género está muy bien definido y se diferencia claramente, a nivel morfológico, de los otros géneros de la subtribu. Sin embargo, estudios moleculares recientes (Rauscher, 2000), mediante la secuenciación del ADN de ribosomas del núcleo de varias especies de frailejón muestran que las relaciones dentro de Espeletiinae no son claras, y que varios de los géneros no coinciden con la división en 8 géneros del complejo *Espeletia*. Esto se debe a la gran diversidad morfológica en formas de crecimiento y especialización ecológica, Rauscher reconoce la necesidad de realizar estudios moleculares más amplios y disponer de datos morfológicos más detallados (Ibáñez, 2004). Previamente, Hoffman había clasificado al género *Espeletia* dentro de la subtribu Melampodiinae. La clasificación de Hoffman fue mantenida por Smith y Koch en 1935, así como por Stuessy en 1977.

I.2.- ANTECEDENTES DE LA FAMILIA ASTERACEAE Y EL GÉNERO *Coespeletia*

Las asteráceas (Asteraceae), también denominadas antiguamente compuestas (Compositae), reúnen más de 23.000 especies (Jeffrey, 2007; Stevens, 2001) por lo que son la familia de Angiospermas con mayor riqueza y diversidad biológica. La familia está caracterizada por presentar las flores dispuestas en una inflorescencia compuesta denominada capítulo la cual se halla rodeada de una o más filas de brácteas (involucro). El nombre "Asteraceae" deriva del género tipo de la familia *Aster*, término que a su vez- proviene del griego *ἀστήρ* que significa "estrella" y hace alusión a la forma de la inflorescencia.

El "centro de la flor" forma una amplia base, la cual es llamada receptáculo. Sobre este receptáculo se asientan las diminutas flores y cada una de estas flores es portadora de una única semilla.

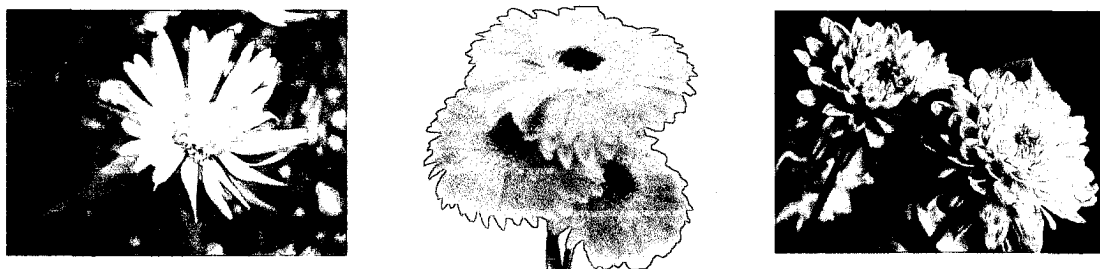
**Figura 2: Inflorescencia (capítulo) de compuestas (Asteraceae).
Crédito: BIODIDAC**



Fuente: <http://lacienciaysusdominios.com>

Las Asteraceae comprenden más de 1700 géneros y unas 24000 especies distribuidas por todo el mundo (distribución cosmopolita), es una de las familias más grandes, solamente comparable a la familia Orquidiaceae y ha sido objeto de muchos estudios. En Venezuela se conocen cerca de 760 géneros y 2100 especies (Badillo, 1997; Katinas *et al.*, 2007).

Figura 3: Asteraceas



Fuente: <http://es.wikipedia.org/wiki/Asteraceae>

Los miembros de esta familia son plantas herbáceas, raramente árboles, arbustos o lianas (tampas trepadoras que forman bejucos). Muchas especies presentan látex y también aceites esenciales. Pueden o no ser resinosas. Sus hojas, bien desarrolladas, aunque en algunos casos se hallan muy reducidas, generalmente alternas u opuestas simples y la inflorescencia en capítulos. Las flores son pequeñas, hermafroditas o, en ocasiones, funcionalmente unisexuales o estériles, generalmente son pentámeras (Katinas *et al.*, 2007).

La descripción actual comprende tres Sub-familias y 16 tribus. Asteroideae (Astereae, Anthemideae, Calenduleae, Eupatorieae, Gnaphalieae, Heliantheae, Inuleae, Plucheeae, Senecioneae), Cichorioideae (Arctoteae, Cardueae, Lactuceae, Liabeae, Mutisieae, Vernonieae) y Barnadesioideae (Barnadesieae).

Taxonómicamente, el género hace parte de la familia Asteraceae, tribu Heliantheae, subtribu Espeletiinae (Cuatrecasas, 1986). **Ver tabla 1.**

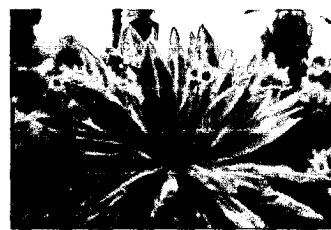
Tabla 1: Taxonomía de las *Espeletias* (Heywood *et al*, 1977)

División	Spermatophytes (plantas con granos)
Sub-división	Angiospermas (plantas con flores)
Clase	Dicotiledoneas
Sub-clase	Asteridae
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Sub-Familia	Asteroideae
Tribu	Heliantheae
Sub-tribu	Espeletiinae
Género en estudio	<i>Coespeletia mutis</i>
Especie en estudio	<i>Coespeletia moritziana</i> Sch. Bip. Wedd

La subtribu Espeletiinae comprende ocho géneros y más de 100 especies endémicas de Venezuela, Colombia y Ecuador. Los frailejones se desarrollan generalmente, por encima de los 3000 m de altitud y presentan diferentes formas de crecimiento relacionadas con el tipo de vegetación donde se encuentran (Cuatrecasas, 1979). Según Smith y Koch (1935), ninguna especie de frailejón está ampliamente distribuida, pero cada grupo de páramos se encuentra habitado por una o más especies.

A pesar de tener una amplia distribución en los páramos de estos tres países, y ser un elemento tan destacado en el ecosistema, existen algunos cuestionamientos con respecto a su origen.

Figura 4: *Espeletia* sp. (Asteraceae). Páramo el Angel



Fuente: <http://alpandino.org/es>

Hasta el momento se han descrito para Venezuela 74 especies de frailejón (Badillo, 2001), 105 para Colombia (Rodríguez y Cobos, 2006) y una para el Ecuador. En la tabla 2, se muestra la distribución de estas especies en los ocho géneros de la subtribu Espeletiinae. Algunas especies se encuentran tanto en Colombia como en Venezuela, como es el caso de *Espeletia brassicoidea*, *Espeletia perijaensis*, *Espeletiopsis purpurascens* y *Tamania chardonii*. Por otra parte la *Espeletia pycnophylla* que se encuentra en la zona limítrofe del Sur de Colombia y Norte de Ecuador. (Ibáñez, 2004) pero una subespecie se encuentre 500 km más al sur, en la cordillera de Llanganati en medio de la selva amazónica, no se sabe como llegó hasta allí.

Coespeletia Cuatrec., con hábito caulirrosulado, es un tallo (subterráneo o de hasta 12 m de altura) con hojas agrupadas en forma de roseta al final del tallo; consta de ocho especies que se distribuyen por los páramos y superpáramos venezolanos, siendo el páramo de Piedras Blancas, la zona considerada por Cuatrecasas (1986), como su centro de especiación.

Tabla 2: Número de especies de frailejón descritas para Colombia, Ecuador y Venezuela, distribuidas por géneros (Ibáñez, 2004).

GENERO	COLOMBIA	ECUADOR	VENEZUELA
<i>Espeletia</i>	71	1	17
<i>Espeletiopsis</i>	27	-	9
<i>Carramboa</i>	-	-	5
<i>Coespeletia</i>	-	-	8
<i>Libanothamus</i>	5	-	12
<i>Paramiflos</i>	1	-	-
<i>Ruilopezia</i>	-	-	22
<i>Tamania</i>	1	-	1

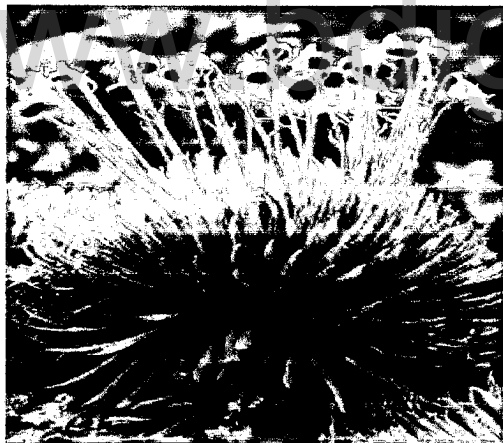


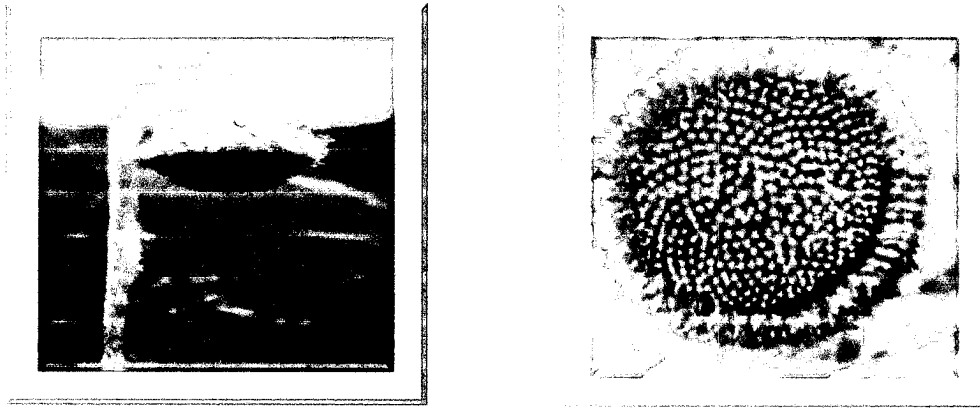
Figura 5: *Coespeletia moritziana* Sch. Bip. Wedd., (sinónimo frailejón amarillo bravo).

Fuente: <http://www.flickriver.com/photos>

Coespeletia moritziana, (Figura 5) se presenta como una planta arrosetada, con tronco sin ramificación. Hojas lineales enteras, poco flexibles de 40cm de largo por 1,5 de ancho, agudas en el ápice, angostándose gradualmente hacia la base, densamente amarillo-tomentosas por ambas caras con pelos a modo de lana. Flores de 4 a 7 cm de diámetro, con numerosas flores solitarias, (Figura 6) nutantes de color blanco cremoso. Tallos florales no ramificados, erectos de 80cm.

Distribución: Especie endémica de los páramos andinos entre los 3.900 y 4.500 m.s.n.m.

Figura 6: Flor de *Coespeletia moritziana*



Fuente: <http://www.flickrriver.com/photos>

En muchos páramos coexisten varias especies de frailejón y si la época de floración coincide, las condiciones son favorables para que ocurra el proceso de hibridación que probablemente ha contribuido a la formación de nuevas especies (Ibáñez, 2004).

1.3.- CONSTITUYENTES CARACTERÍSTICOS DE LA SUBTRIBU ESPELETIINAE

Esta familia produce un gran número de componentes químicos de gran importancia quimiotaxonómica y farmacológica. Cada vez es mayor el número de artículos reportados cada año que versan sobre la extracción de componentes químicos a partir de especies de esta familia.

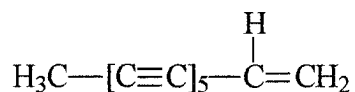
Las especies de esta subtribu producen casi exclusivamente diterpenos del tipo kaureno. Estos tienen interés a nivel químico, botánico y medicinal, así mismo muestran una complejidad superior a las otras familias vegetales (Abdala, 2000).

Otros compuestos biosintetizados por este grupo son: triterpenos, poliacetilenos, lactonas sesquiterpénicas, aceites esenciales.

A continuación se enumeran algunos de los componentes químicos aislados de esta subtribu, haciendo énfasis en los diterpenos, los cuales son los más abundantes.

Poliacetilenos

Los poliacetilenos son estructuras que no están presentes en esta subtribu, pero existe un compuesto de este tipo aislado de la especie *Espeletia schultzii* Wedd., se trata del pentayneno (1) (Bohlmann y Rao, 1973).

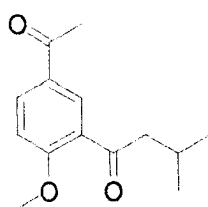


Pentayneno (1)

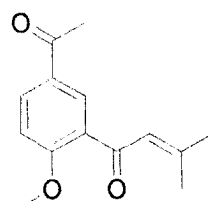
Figura 7: Poliacetileno

Hidroxiacetofenona

Son compuestos raramente encontrados en la subtribu Espeletiinae, Bohlmann & Rao (Bohlmann y Rao, 1973) aislaron de la *Espeletia schultzii* Wedd., dos derivados de la hidroxiacetofenona, la espeletona (2) y la dehidroespeletona (3).



speletona (2)



dehidroespeletona (3)

Figura 8: hidroxiacetofenonas

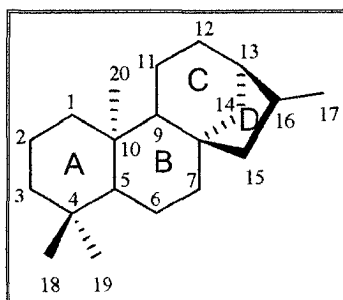
Diterpenos

Son compuestos encontrados en la mayoría de las especies pertenecientes a la subtribu Espeletiinae. Dentro de los terpenoides se encuentra este grupo de compuestos, que se caracterizan por poseer una gran variedad de estructuras químicas, que tienen en común un esqueleto único constituido por cuatro unidades de isopreno (Hanson *et al.*, 1991).

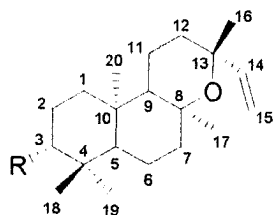
Estos diterpenos tetracíclicos dan origen a la serie del *ent*-kaureno, los cuales se han destacado por su gran variedad de propiedades biológicas (Ghisalberti, 1997), lo que ha motivado a innumerables estudios con el fin único de obtener sustancias potencialmente activas.

Los *ent*-kaurenos se han aislados principalmente en las familias de las Asteraceae (Usubillaga y Nakano, 1979; Torrenegra *et al.*, 2001; Meccia *et al.*, 2010), Labiateae (Liu *et al.*, 2000; Bruno *et al.*, 2005; Piozzi y Bruno, 2011), Euphorbiaceae (Chen *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2010) y Annonaceae (Yang *et al.*, 2002; Batista *et al.*, 2007).

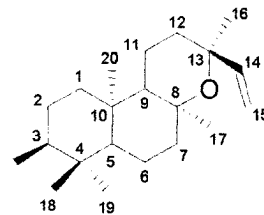
Figura 9: Unidad fundamental de los ent-kaurenos



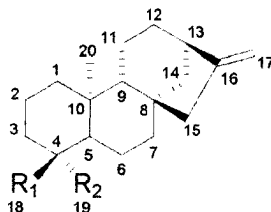
A continuación se presentan las estructuras encontradas en esta sub-tribu.



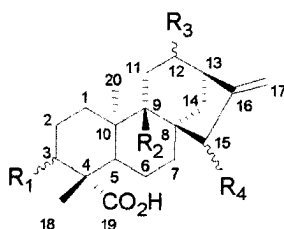
13-epi-ent-oxido de manoilo = R = H (4)
 3α-hidroxi-ent-oxido de manoilo = R = OH (5)



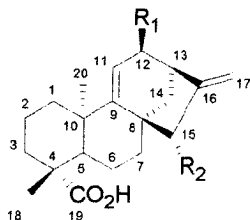
ent-oxido de manoilo = R = H (6)
 3β-hidroxi-ent-oxido de manoilo = R = OH (7)



ent-kaur-16-ene = R₁ = R₂ = Me (8)
 19-hidroxi-ent-kaur-16-ene = R₁ = Me, R₂ = CH₂OH (9)
 19-acetoxi-ent-kaur-16-ene = R₁ = Me, R₂ = CH₂OAc (10)
 19-oxo-ent-kaur-16-ene = R₁ = Me, R₂ = CHO (11)
 ácido ent-kaur-16-ene-19-oico = R₁ = Me, R₂ = CO₂H (12)
 ester glicólico del ácido ent-kaur-16-ene-19-oico = R₁ = Me, R₂ = CO₂Gly (13)



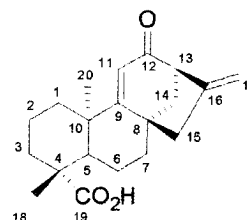
ácido 12α-hidroxi-ent-Kaur-16-en-19-oico = R₁ = R₂ = H, R₃ = α-OH, R₄ = H (14)
 ácido grandiflorólico = R₁ = R₂ = R₃ = H, R₄ = α-OH (15)
 ácido 15α-acetoxi-ent-Kaur-16-en-19-oico = R₁ = R₂ = R₃ = H, R₄ = α-OAc (16)
 ácido 15α-angeloiloxi-ent-Kaur-16-en-19-oico = R₁ = R₂ = R₃ = H, R₄ = α-OAng (17)
 ácido 15α-seneciiloxi-ent-Kaur-16-en-19-oico = R₁ = R₂ = R₃ = H, R₄ = α-OSen (18)
 ácido 15α-isovaleriloxi-ent-Kaur-16-en-19-oico = R₁ = R₂ = R₃ = H, R₄ = α-O-Oi-Val (19)
 ácido 15α-isobutiriloxi-ent-Kaur-16-en-19-oico = R₁ = R₂ = R₃ = H, R₄ = α-O-Oi-But (20)
 ácido 9β-hidroxi-15α-seneciiloxi-ent-Kaur-16-en-19-oico = R₁ = H, R₂ = OH, R₃ = H, R₄ = α-OSen (21)
 ácido 9β-hidroxi-15α-isovaleriloxi-ent-Kaur-16-en-19-oico = R₁ = H, R₂ = OH, R₃ = H, R₄ = α-Oi-Val (22)



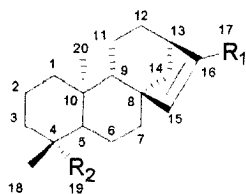
ácido *ent*-Kaur-9(11)-16-dien-19-óico
= R₁, R₂ = H (23)

ácido 12β-hidroxi-*ent*-Kaur-9(11)-16-dien-19-óico
= R₁ = OH, R₂ = H (24)

ácido 15α-hidroxi-*ent*-Kaur-9(11)-16-dien-19-óico
= R₁ = H, R₂ = OH (25)



ácido 12-oxo-*ent*-Kaur-9(11)-16-dien-19-óico (26)

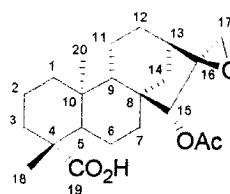


ácido *ent*-Kaur-15-en-19-óico
= R₁ = Me, R₂ = CO₂H (27)

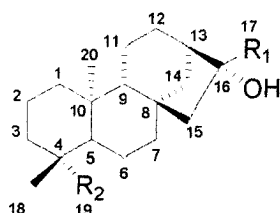
ácido 17-hidroxi-*ent*-Kaur-15-en-19-óico
= R₁ = CH₂OH, R₂ = CO₂H (28)

ácido 17-oxo-*ent*-Kaur-15-en-19-óico
= R₁ = CHO, R₂ = CO₂H (29)

(-)-kaur-15-en-19-al
= R₁ = Me, R₂ = CHO (30)



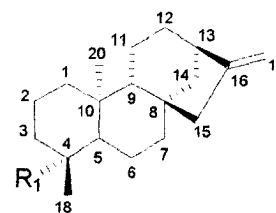
ácido 15α-acetoxi-16,17-epoxi-*ent*-Kauran-19-óico (31)



16α-hidroxi-*ent*-kaurane
= R₁ = R₂ = Me (32)

ácido 16α-hidroxi-*ent*-Kauran-19-óico
= R₁ = Me, R₂ = CO₂H (33)

16α-hidroxi-*ent*-kauran-19-al
= R₁ = Me, R₂ = CHO (34)



19-nor-*ent*-kaur-16-ene
= R = H (35)

ruilopeziol = R=OH (36)

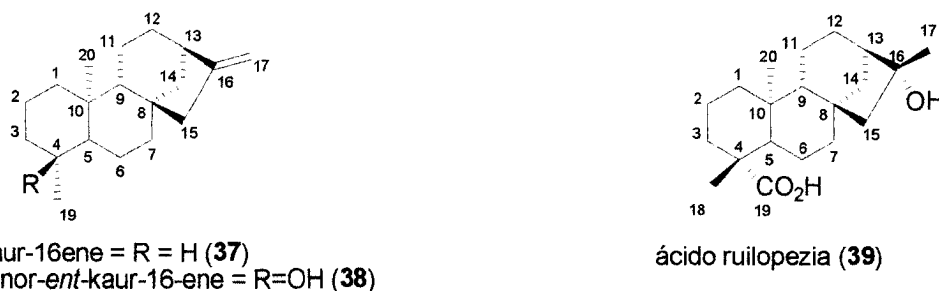
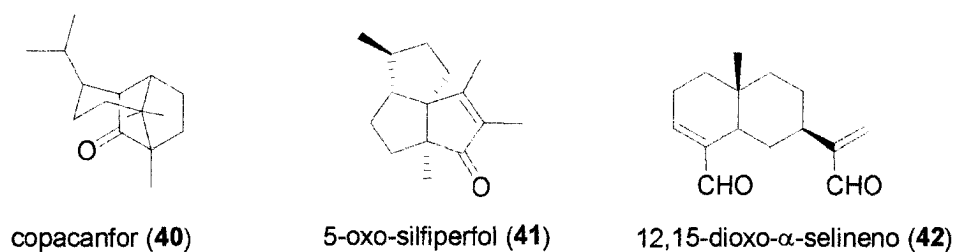


Figura 10: Diterpenos

Sesquiterpenos

Algunos sesquiterpenos nuevos han sido aislados de la *Espeletopsis guacharaca* (Díaz) Cuatrec., entre estos se pueden mencionar el copacanfór (40) y el 5-oxo-silfiperfol-8-eno (41) y de la especie *Libanothamus oculatus* (Blake) Cuatrec., se aisló el 12,15-dioxo- α -selineno (42). Se han encontrado otros sesquiterpenos como el espatulenol (43) obtenido de la *Coespeletia marcana* Cuatrec.; curcumeno (44) aislado de la *Ruilopezia jahnii* Cuatrec.; óxido de cariofileno (45), de la especie *Ruilopezia lindenii* Cuatrec. (Bohlmann *et al.*, 1980c; Bohlmann *et al.*, 1980a)



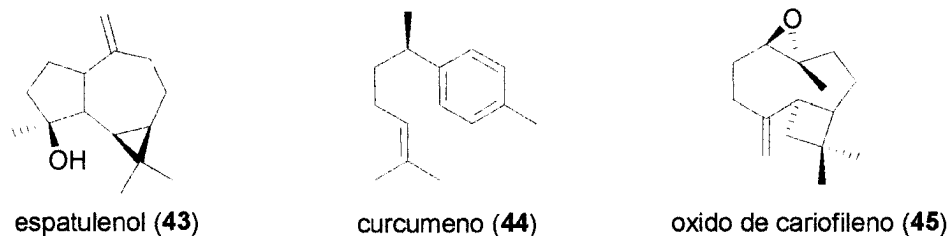


Figura 11: Sesquiterpenos

Lactonas sesquiterpénicas

Las lactonas sesquiterpénicas no están presentes en esta subtribu, pero a partir de dos especies de *Espeletias* colombianas, *Espeletia killipii* Cuatrec. y *Espeletia tujana* Cuatrec., se aisló una melampolida, la polimatina B (46) (Torrenegra y Téllez, 1995).

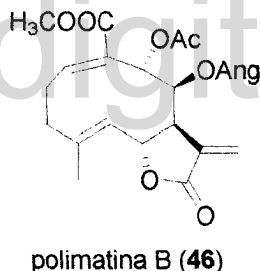


Figura 12: Lactonas sesquiterpénicas

Triterpenos

En la sub-tribu Espeletiinae se han encontrado muy pocos triterpenos, ejemplo de estos son el acetato de lupeol (47) aislado de la *Ruilopezia lindenii* Cuatrec., y la amirona (48) obtenida de la *Coespeletia moritziana* Cuatrec. También se han citado triterpenos ciclopropánicos como el 3 β -[2-metil-butanoato] de cicloartano (49) aislado de la *Espeletia argentea* Humb. & Bonpl. (Tellez *et al.*, 1998), y el 3 β -[2-metil-butanoato] de cicloeucaleno (50) encontrado en la *Espeletia barclayana* Cuatrec. (Tellez *et al.*, 2000).

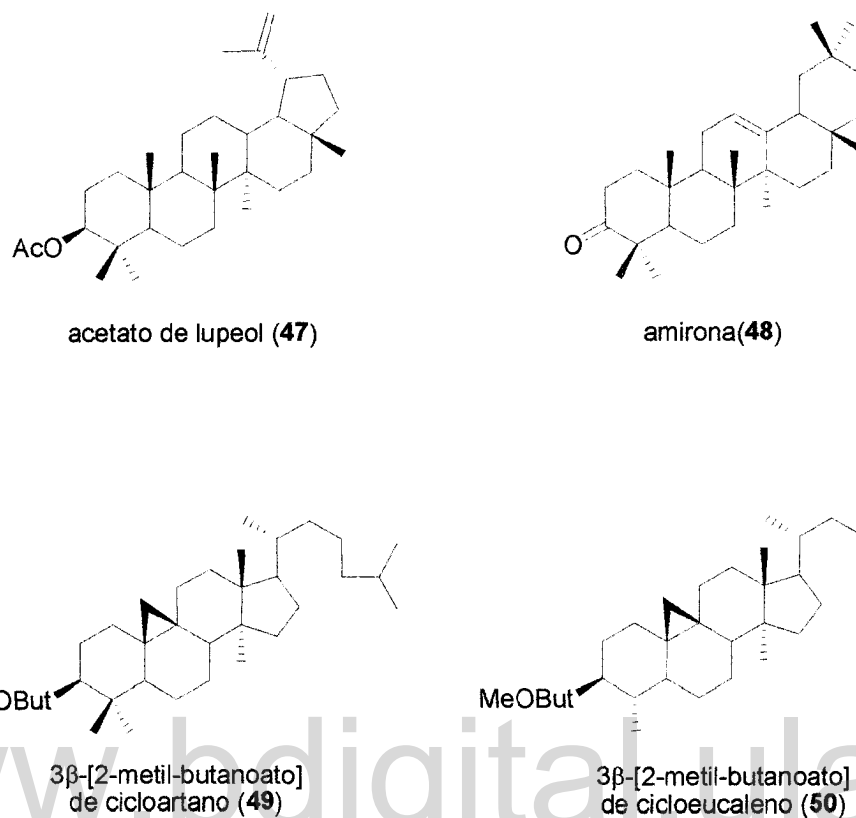


Figura 13: Triterpenos

Flavonoides

De la *Espeletia schultzii* Wedd., se reportó la presencia de algunos flavonoides (De Los Rios *et al.*, 1999). Del frailejón *Espeletia barclayana*, se detectó la presencia de quercetina (51) y 3-metoxiquercetina (52), flavonoides que pueden tener interés desde el punto de vista quimiotaxonómico (Gutiérrez *et al.*, 1998).

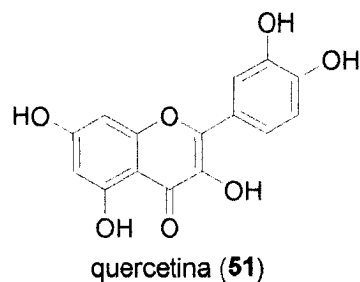
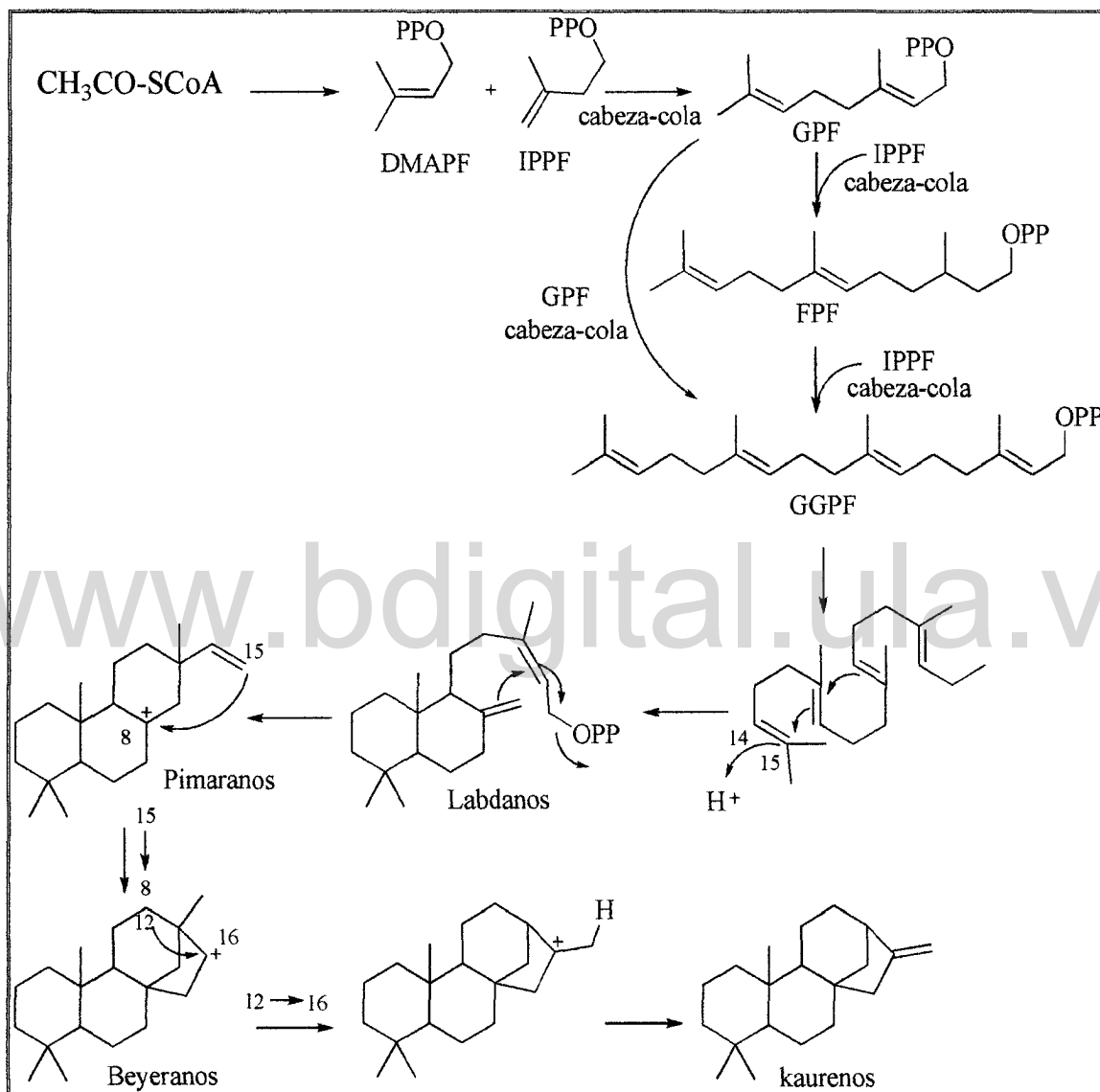


Figura 14: Flavonoides

I.4.- BIOGÉNESIS DE LOS ENT-KAURENOS.



Esquema 1: Biogénesis de los ent-kaurens

(Tomado y modificado de Marcano y Hasegawa, 2002; Peña, 2012)

Los terpenos son biosintetizados a partir de metabolitos primarios, en la ruta del ácido mevalónico, en donde tres moléculas de acetil- CoA se condensan paso a paso para formar ácido mevalónico. Este intermediario clave de seis átomos de carbono es pirofosforilado, descarboxilado y deshidratado para formar isopentenil difosfato. El isopentenil pirofosfato y su isómero el dimetilalil difosfato de cinco carbonos, son los precursores activados en la biosíntesis de terpenos, que se combinan para formar moléculas mayores.

En primer lugar el isopentenil pirofosfato y el dimetilalil difosfato reaccionan para formar el geranil difosfato, el precursor de diez carbonos de casi todos los monoterpenos. El geranil difosfato puede unirse a otra molécula de isopentenil difosfato y formar el farnesil difosfato, compuesto de quince carbonos, el precursor de casi todos los sesquiterpenos. La adición de otra molécula de isopentenil pirofosfato genera un compuesto de veinte carbonos, el geranil geranil difosfato, precursor de los diterpenos. Finalmente el farnesil difosfato y el geranil geranil difosfato pueden dimerizar para formar triterpenos y tetraterpenos respectivamente. (Marcano y Hasegawa, 2002; Ibáñez, 2004).

Los isoprenoides, tal como el *ent*-kaurano, se forman por la ciclación del geranil geranil difosfato (GGPP), con el ataque electrofílico sobre el doble enlace entre el C-14 y C-15, siendo la especie atacante casi siempre un protón, por lo cual muchas estructuras no están oxigenadas en la posición 3 del esqueleto. Una primera ciclación del GGPP conduce al ion labdanilo, luego ocurre una ciclación que conduce a la formación de los diterpenos derivados del pimarano y rimurano, finalmente ocurre una transferencia del metilo en posición del C-13 al C-16 para así dar paso a la formación de los *ent*-kauranos (Banthorpe *et al.*, 1991; Marcano y Hasegawa, 2002; Peña 2012).

I.5.- ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL ÁCIDO ENT-KAURÉNICO

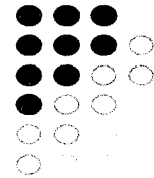
Son numerosas las pruebas biológicas y farmacológicas que se han realizado a los diterpenos de la serie del *ent*-kaurano, con el único fin de obtener sustancias naturales potencialmente activas. Uno de los inconvenientes encontrados en muchos de estos trabajos es su poca solubilidad en medios acuosos, lo que ha motivado innumerables modificaciones químicas (Ghisalberti, 1997; Hueso-Falcón *et al.*, 2011, 2010; Xu *et al.*, 2008; Batista *et al.*, 2007; Bruno *et al.*, 2001; Campo *et al.*, 1997; Vieira *et al.*, 2002).

El ácido kaurénico, ha demostrado poseer actividad antibacteriana sobre: *Mycobacterium smegmatis*, *Streptococcus ssp.*, *Bacillus cereus* (Velikova *et al.*, 2000; Zgoda-Pols *et al.*, 2002; Wilkens *et al.*, 2002), *Bacillus subtilis* (Slimestad *et al.*, 1995) y *xanthomonas* (Mithscher *et al.*, 1983). Kilic y colaboradores en 2003, reportan la actividad antibacteriana de 24 diterpenos de la serie de *ent*-kaureno, los cuales fueron ensayados frente a *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*. De acuerdo con los resultados obtenidos cada uno de los compuestos ensayados presentó actividad moderada.

Existe un reporte realizado por Fatope y colaboradores en 1996 en donde muestra la actividad citotóxica de este ácido frente a línea celular establecida de cáncer de mama (MFC-7). Henry y colaboradores en el 2006, aislaron cuatro *ent*-kaurenos y se les determinó actividad citotóxica frente a varias líneas celulares, tales como 22Rv1, LNCaP (cáncer de próstata), HT29, HCT116, SW480, SW620 (cáncer de colon) y MCF-7 (cáncer de mamas), con concentraciones máximas inhibitorias al 50 % que van desde 6 a 50 µg/mL.

Otros trabajos en donde se ha reportado la actividad citotóxica de derivados del *ent*-kaureno son los de Sun *et al.*, 1994; Fujita *et al.*, 1988; Kondoh *et al.*, 2004; Ruiz *et al.*, 2008; Suzuki *et al.*, 2004 y Hueso-Falcón *et al.*, 2010.

Hipótesis



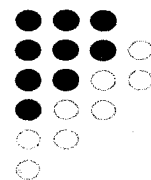
www.bdigital.ula.ve

HIPÓTESIS

Los ácidos kaurénicos son una clase de diterpenos tetracíclicos de la serie de los *ent*-kauranos, los cuales se han destacado por su amplia actividad biológica y farmacológica. En vista de que las especies del género *Espeletia*, hasta ahora estudiadas, biosintetizan diterpenos de la serie *ent*-kauranos, es probable que los componentes aislados de *Coespeletia moritziana* y sus derivados semisintéticos presenten actividad citotóxica frente a líneas celulares tumorales humanas así como actividad antimicrobiana.

www.bdigital.ula.ve

Objetivos



www.bdigital.ula.ve

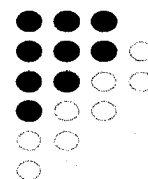
OBJETIVO GENERAL

Realizar el estudio fitoquímico de *Coespeletia moritziana* y aislar sus componentes mayoritarios para determinar su actividad biológica sobre la viabilidad de líneas celulares tumorales establecidas de cáncer a partir de carcinoma epitelial de cuello de útero humano (HeLa), carcinoma de pulmón humano (A-549), y de cáncer de mama (MCF-7) y la línea celular no tumoral de riñón de mono verde africano (Vero), así como su actividad antimicrobiana.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ▼ Recolectar e Identificar la planta *Coespeletia moritziana* del género *Coespeletia* (Espeletinaeae) que crece en el pico el águila, del estado Mérida, en la región nororiental de la sierra de la culata, vía Piñango a una altitud de 4.126 m.s.n.m.
- ▼ Secar y moler el material vegetal para extraer los compuestos con una mezcla de solventes orgánicos a temperatura ambiente.
- ▼ Purificar los compuestos extraídos de los diferentes extractos de *Coespeletia moritziana*, utilizando las técnicas de cromatografía en columna, cromatografía en capa fina, recristalización.
- ▼ Caracterizar cada uno de los compuestos obtenidos utilizando las técnicas instrumentales de elucidación, como la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectrometría de masas (EM).
- ▼ Determinar la viabilidad celular de los compuestos puros sobre células mononucleares humanas de sangre periférica (CMSP)
- ▼ Evaluar la actividad citotóxica de los compuestos puros aislados frente a diferentes líneas celulares de cáncer.
- ▼ Evaluar la actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Capítulo I



Recolección y Extracción de los
ent-kauranos presentes en
Coespeletia moritziana

I.1.- PARTE EXPERIMENTAL

En esta tesis, toda la parte química de los compuestos (extracción, separación, purificación y obtención de derivados), fue realizada en el laboratorio de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes, bajo la tutoría del Dr. Alfredo Usubillaga y cotutela de la Dra. María Eugenia Lucena de Ustariz.

Técnicas generales aplicadas

- ▼ Cromatografía en columna: se utilizó gel de sílice 60-200 mesh, de la casa Scharlau. Las columnas se desarrollaron utilizando solventes solos o mezclas de solventes de polaridad creciente hexano-éter dietílico, hexano-acetato de etilo.
- ▼ Cromatografía en capa fina: Para la cromatografía en capa fina analítica se utilizaron placas de gel sílice 60 sobre soporte de aluminio de la casa Merck, WF 254 (0,25 mm de espesor). Las placas se desarrollaron con los sistemas eluyentes adecuados y se revelaron rociándolas con reactivo de ácido fosfomolibdico y ácido sulfúrico, después de calentadas en corriente de aire a unos 100 °C aproximadamente, por algunos minutos hasta poder visualizar las manchas de color azul oscuro y rojo respectivamente.
- ▼ Punto de fusión: fue determinado en un aparato digital Electrothermal con capacidad de 350 °C. Los valores no han sido corregidos.
- ▼ Espectros de infrarrojo: Se realizaron en un espectrofotómetro infrarrojo-FT Perkin Elmer. Modelo FT-1725X, en pastillas de KBr, o film sobre celdas de NaCl.
- ▼ Espectros de RMN-¹H y de RMN-¹³C: Se tomaron en un equipo de resonancia magnética nuclear Bruker-Avance DRX 400, a 400 y 100 MHz, respectivamente. Se utilizaron solventes deuterados (CDCl₃, C₅ND₆). Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear, Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes.
- ▼ Espectros Bidimensionales: Los compuestos se caracterizaron en dos dimensiones para obtener correlaciones de tipo: COSY, HMQC y HMBC.

En algunos casos se realizaron otros espectros bidimensionales HSQC y NOESY.

- ▼ Cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (CG-Masas): La pureza del producto se comprobó en un cromatógrafo HP6890 acoplado a un detector de masas HP 5973, equipado con un inyector automático HP-ALS y una columna capilar de sílice fundida HP-5MS de fenil (5%)-metil (95%)-polisiloxano de 30 m de largo, 0,25 mm de diámetro interno y un espesor de película de 0,25 μm . La energía de ionización utilizada fue de 70 eV.

Los reactivos y solventes usados para la síntesis de los derivados kaurénicos, se adquirieron de los laboratorios MERCK, ACROS y ALDRICH.

I.2.- MATERIALES Y METODOS

I.2.1.- OBTENCIÓN DEL MATERIAL BOTÁNICO

En septiembre del año 2007 se recolectaron 17,2 kilogramos de hojas y tallos florales de *Coespeletia moritziana* (figura #15) en el pico el Aguila, del Estado Mérida en la región nororiental de la Sierra de la Culata, hacia la vía de Piñango a una altitud de 4.126 m.s.n.m. Esta recolección la realizó el Prof. Alexis Peña y la planta fue identificada por el Ingeniero Juan Carmona del herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Un voucher fue depositado bajo el número AU 28. Las hojas se secaron y molieron obteniéndose 4,9 kilogramos de material vegetal seco y molido.

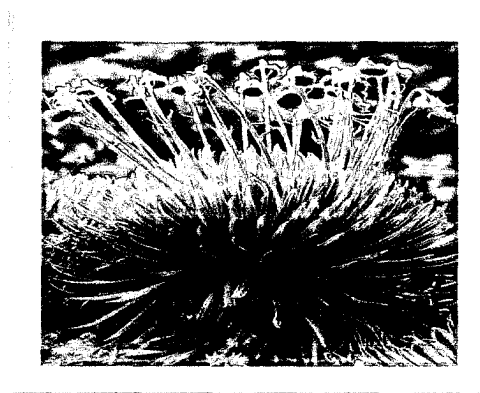
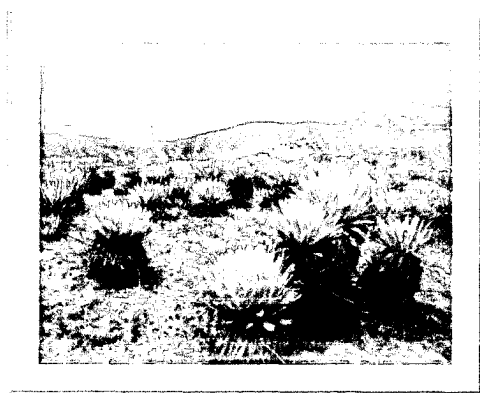
I.2.2.- OBTENCIÓN DE LOS COMPUESTOS QUÍMICOS PRESENTES EN LA ESPECIE *COESPELETIA MORITZIANA*

Los compuestos fueron extraídos de la hoja de *Coespeletia moritziana*. Este material se extrajo con una mezcla de hexano-éter dietílico a temperatura ambiente. La evaporación del solvente produjo 450 g de residuo sólido que se trató durante 48 horas con éter dietílico. Mediante este tratamiento se disolvió la mayor parte del residuo sólido obtenido mediante extracción del material vegetal,

pero quedó un sólido blanco insoluble (15,5 g) que se filtró y se apartó para posterior estudio.

Figura 15: Páramo de la culata

Coespeletia moritziana



Fuente: <http://www.flickrriver.com/photos>

El extracto etéreo se agitó con una solución 0,5 molar de hidróxido de sodio. A la fase acuosa, que contenía los ácidos kaurénicos en forma de sales sódicas, se agregó ácido clorhídrico hasta alcanzar un pH 3,0, formándose un precipitado blanco constituido por los ácidos orgánicos libres (180 g), que se filtró y se sometió a cromatografía flash sobre sílica gel. La columna (Columna A) se eluyó con hexano y mezclas de hexano/acetato de etilo, tomándose fracciones de 100 ml. Las distintas fracciones se observaron por cromatografía sobre capa fina y se reunieron de acuerdo a su perfil cromatográfico.

Las fracciones 15-140, eluidas con hexano y hexano/Acetato de etilo al 5% y al 10% rindieron una mezcla de dos sustancias (27,4 g) que se sometieron a separación en una nueva columna (Columna B) obteniéndose 14,8 gr de ácido kaurénico puro (I) con punto de fusión 178°C, idéntico al obtenido por Visbal y colaboradores en 2004 de la *Espeletia semiglobulata*. Se continuó eluyendo la columna B lográndose aislar 5,4 g de ácido kaur-9(11)-16-dieno-19-oico (II) también llamado ácido grandiflorénico, con punto de fusión de 155-157°C, idéntico

al aislado de la *Coespeletia timotensis* (Pérez 1972). Se continuó eluyendo la columna A con mezclas cada vez más polares de hexano/acetato de etilo, se obtuvo de las fracciones 141-200 una mezcla (7,2 g) que se trató sobre una nueva columna (columna C). Elución de esta columna produjo 1,8 g de ácido 15 α -acetoxi-kaur-16-en19-oico (IV), punto de fusión 172-174°C, idéntico al mismo producto aislado de la *Espeletia schultzei* (Brieskorn y Pöhlmann 1968).

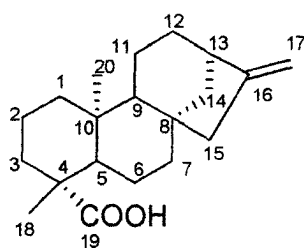


Figura 16: ácido kaurénico (I)

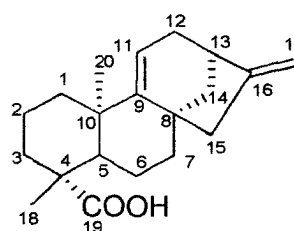


Figura 17: ácido grandiflorénico (II)

Se continuó eluyendo la columna A y se obtuvo de las fracciones 201- 230 ácido 15 α -hidroxi-kaur-16-en19-oico (III), punto de fusión 224-226°C, también llamado ácido grandiflorólico, originalmente aislado por Piozzi y colaboradores. (Piozzi *et al.*, 1968).

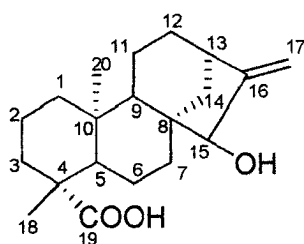


Figura 18: ácido 15 α -hidroxi-kaur-16-en19-oico (III)

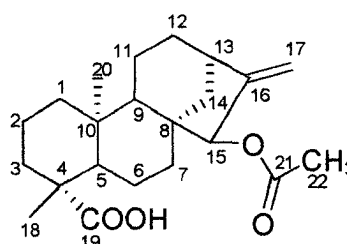


Figura 19: ácido 15 α -acetoxi-kaur-16-en19-oico (IV)

Finalmente, se obtuvo de las fracciones 231-260, eluyendo la Columna A con una mezcla de hexano/Acetato de etilo al 30%, 420 mg de un compuesto con punto de fusión de 278-282°C, que fue identificado como el ácido 16 α -hidroxi-

kauran-19-oico (VI) idéntico al mismo producto aislado de la *Ruilopezia margarita*. (Usubillaga y Nakano 1979).

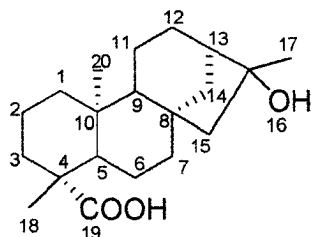


Figura 20: ácido 16 α -hidroxi-kauran-19-oico (VI)

La sustancia sólida insoluble en éter dietílico se examinó en capa fina y se observó que consistía prácticamente de ácido 15 α -senecioxi-kaur-16-en-19-oico, que se recrystalizó en hexano para obtener 13,2 g de esta sustancia que se sometió a hidrólisis en reflujo con KOH en solución de dimetilsulfóxido, lo que permitió recuperar 9,1 g de 15 α -hidroxi-kaur-16-en-19-oico, sustancia que tiene importancia porque permite obtener por oxidación el ácido 15-oxo-kaur-16-en-19-oico, producto que posee demostrada capacidad para producir apoptosis en las células epiteliales del cáncer de próstata.

La fase etérea del extracto original de *Coespeletia moritziana* que había sido sometido a agitación con hidróxido de sodio se concentró obteniéndose 270 g de fracción neutra. Inspección mediante cromatografía en capa fina (TLC) indicó que contenía kaurenol, kaurenal y ceras. Se tomó 20 gramos de esta mezcla y se sometió a cromatografía sobre columna de silicagel. Elución con hexano permitió aislar una mezcla de kaurenol (VII) y kaurenal (kaur-16-en-19-al), que fue sometida a nueva cromatografía y se logró aislar 2.8 g de kaurenol puro (VII), punto de fusión 140-141°C. La pureza del producto se comprobó en cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (CG-Masas) sobre una columna HP-5MS, observándose un solo pico a un tiempo de 3,95 minutos, que muestra un ión molecular a m/z 288 y un patrón de fraccionamiento idéntico al producto puro aislado de la fracción neutra de *Espeletia schultzii*.

El *ent*-kaurenol fue reportado por primera vez como producto sintético, obtenido en la reacción de reducción con hidruro de litio y aluminio (LiAlH_4) del éster metílico del ácido *ent*-kaur-16-en-19-óico (Galt y Hanson, 1964; 1966; Cavel y MacMillan, 1967); igualmente fue obtenido mediante la reacción de Wittig, a partir del *ent*-16-oxo-17-norkauran-19-ol (Henrick y Jefferies, 1964; Mori y Matsui, 1967).

Más tarde este diterpeno tetracíclico fue descrito como producto natural, en investigaciones realizadas sobre la biosíntesis de las giberelinas, habiendo sido solo detectado por técnicas cromatográficas como un producto intermedio en la biotransformación del *ent*-kaurano en ácido *ent*-kaur-16-en-19-óico (Graebe *et al.*, 1965; Dennis y West, 1967). A principios de la década del setenta fue aislado junto con otros compuestos de *Espeletia grandiflora* HBK. (Piozzi *et al.*, 1971; 1972). En un trabajo posterior fue descrito también como un nuevo producto natural, presente en *Anona squamosa* L. (Bohlmann & Rao, 1973).

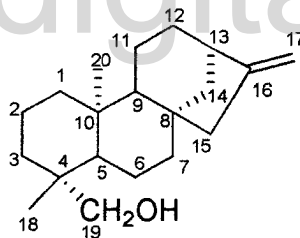


Figura 21: kaurenol (VII)

Un gramo (1,0 g) de kaurenol se disolvió en 10 mL de piridina y se agregó 10 mL de anhídrido acético. Se sometió la mezcla a reflujo durante una hora. Luego de haberse enfriado la mezcla de reacción se añadió 100 mL de agua helada y se extrajo con diclorometano. La fase orgánica se lavó varias veces con agua y se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se llevó luego a sequedad y se destiló varias veces con tolueno para eliminar la piridina. Finalmente se purificó sobre una columna de silicagel y se eluyó con hexano. Se recuperó 820 mg de acetato de kaurenol (VIII) con punto de fusión de 114-115°C.

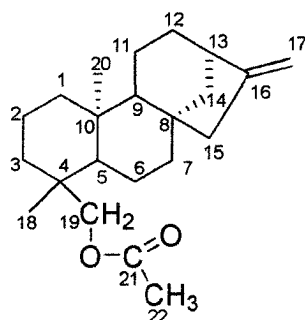


Figura 22: Acetato de kaurenol (VIII)

Se tomó 200 mg de ácido kaurénico se disolvió en metanol y se sometió a hidrogenación catalítica con paladio sobre carbón. Se agitó la mezcla hasta que no se observó más absorción de hidrógeno. Se filtró la solución y se dejó recristalizar el producto. Se obtuvo 190 mg de ácido kauránico (V).

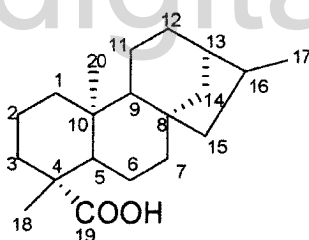


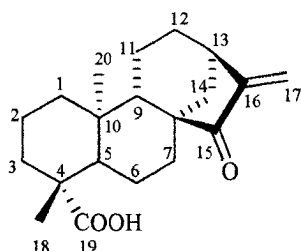
Figura 23: Ácido kauránico (V)

Reacción de oxidación con el reactivo de Sarett

A partir del ácido 15 α -hidroxi-ent-kaur-16-en-19-oico obtener al ácido 15-oxo-ent-kaur-16-en-19-oico:

El reactivo de Sarett fue preparado adicionando a 3 mL de piridina, 0,3 g de CrO₃, con agitación constante hasta observar la formación de un precipitado anaranjado, posteriormente se adicionó el ácido 15 α -hidroxi-ent-kaur-16-en-19-oico (120 mg) y se dejó en agitación por 24 horas. Se extrajo en un embudo de separación con una mezcla de hexano: acetato de etilo 20 %. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, posteriormente se filtró y se llevó a seco en el rotavapor,

quedando un residuo de 112 mg, este fue sometido a purificación sobre columna de gel de sílice (eluyente: Hexano-acetato de etilo 10% v/v). Se obtuvo 87 mg del compuesto, el cual se corresponde a un sólido blanco cuyos datos concuerdan con los reportados para el ácido 15-oxo-*ent*-kaur-16-en-19-oico (Cannon *et al.*, 1966; Hasan *et al.*, 1982; Tomado de Peña 2012).



Formula Molecular: $C_{20}H_{28}O_3$

Masa Molecular: 316,5 g/mol

Punto de Fusión: 194-197°C

Figura 24: ácido 15-oxo-*ent*-kaur-16-en-19-oico

Obtención del ácido 15, 16-epoxi-17-acetoxi-kauran 19-oico (IX)

Esta sustancia se obtuvo como un subproducto de la hidroxilación alílica del ácido kaurénico con dióxido de selenio y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), según la técnica de Aparicio y colaboradores 2007.

El dióxido de selenio (SeO_2) se ha utilizado como agente oxidante del carbono metilénico alílico al doble enlace exocíclico (C-15) del ácido *ent*-kaurénico, sin embargo, hay discrepancia sobre las condiciones en que se realiza la reacción, realizándolo en medio de dioxano y peróxido de hidrógeno con agitación constante a temperatura ambiente por cuatro horas (Aparicio *et al.*, 2007). Fraga, y colaboradores en el 2008 realizaron la reacción con SeO_2 utilizando como disolvente dioxano/agua por un tiempo de 5 horas a temperatura ambiente y con agitación constante. Posteriormente, Hueso y colaboradores en el 2010, realizaron la oxidación con SeO_2 en atmósfera inerte utilizando como solvente diclorometano a temperatura ambiente por un tiempo de 24 horas.

En busca de tratar optimizar el método, se pesaron 3,0 gramos de ácido kaurénico y se disolvió en dioxano con SeO_2 (1,53 g) y 10 mL de H_2O_2 (30%) a temperatura ambiente y bajo agitación durante 4 horas. Luego se agregó agua y el

producto de reacción se agitó con éter dietílico. La fase etérea se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se llevó a sequedad.

El producto de reacción se sometió a cromatografía flash sobre una columna de silicagel. Se empezó a eluir la columna con hexano y se obtuvo 0,2 g de ácido kaurénico que no había reaccionado. Se continuó eluyendo con mezclas de hexano/acetato de etilo y se obtuvo 1,7 g de ácido 15 α -hidroxi-kaur-16-en-19-oico (III). Se continuó eluyendo con mezclas que contenían mayor porcentaje de acetato de etilo y se obtuvo una mezcla (0,8 g) de varias sustancias que en TLC mostraban tener una mayor polaridad que el producto (III). Como no fue posible separar estas sustancias en una nueva columna se sometió la mezcla a acetilación con anhídrido acético-piridina. El producto acetilado se sometió nuevamente a cromatografía flash lográndose aislar 155 mg de un producto puro. Este producto fue sometido a análisis por resonancia magnética nuclear uni- y bidimensional y se elucidó su estructura como ácido 15,16-epoxi-17-acetoxi-kauran 19-oico (IX), punto de fusión de 188°C el cual no ha sido reportado anteriormente como subproducto de ninguna reacción. (Cannon *et al.*, 1966; Camarda *et al.*, 1996; Henrick y Jefferies, 1964; Piozzi, 1966; Piozzi *et al.*, 1968; Matsuo *et al.*, 1977; Chatterjee *et al.*, 1972; Hanson, 1966; Hanson y White, 1972; Pinto *et al.*, 1981; Vieira *et al.*, 2002; Doriguetto *et al.*, 2002; Batista *et al.*, 2007; Aparicio *et al.*, 2007 Hueso-Falcon *et al.*, 2010; Carrillo 2011).

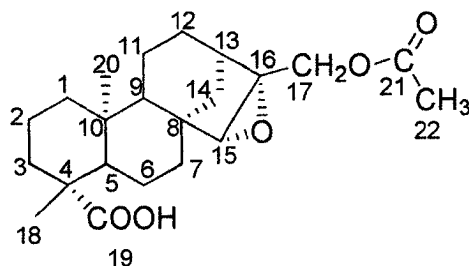
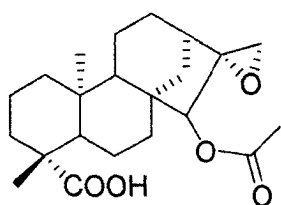
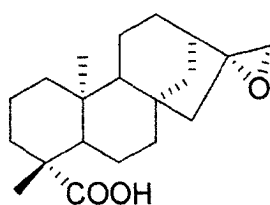


Figura 25: ácido 15,16-epoxi-17-acetoxi-kauran 19-oico (IX)

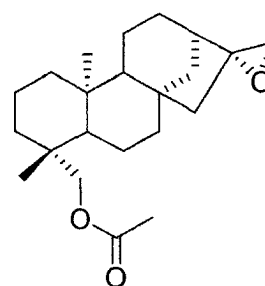
Figura 26: Algunos epóxidos obtenidos en trabajos anteriores (Monsalve 2004; Baptista 2006; Aparicio *et al.*, 2007 Hueso-Falcon *et al.*, 2010; Carrillo 2011, Peña 2012).



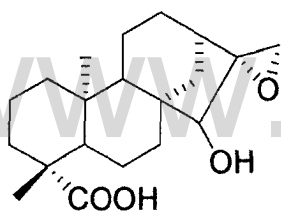
ácido 15α acetoxi-16,17
epoxi-(-)-kauran-19-oico



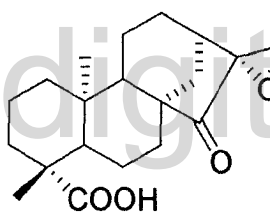
ácido 16,17 epoxi-(-)-
kauran-19-oico



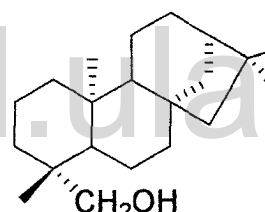
Ent-19α acetoxi-16,17
epoxi



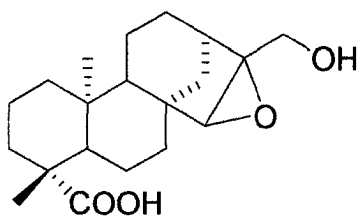
ácido 15α hidroxio-16,17
epoxi-(-)-kauran-19-oico



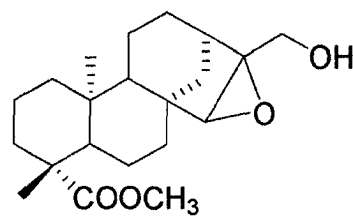
ácido 15 ceto-16,17
epoxi-(-)-kauran-19-oico



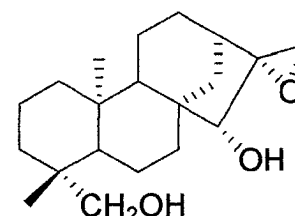
Ent-16,17-epoxi-19α
hidroxio kaurano



ácido 15α 16α epoxi 17 α
hidroxio-ent-kauran-19-oico



Ester metílico del ácido
15 α 16α epoxi 17 α
hidroxio-ent-kauran-19-
oico



Ent- 16,17 epoxi- 15α,
19α dihidroxikaurano

Obtención del éster 2,3,4,6-tetra-acetil- α -D-piranosilo del ácido 15-oxo-kaur-16-en-19-oico (X).

Los glicósidos son muy comunes en toda la naturaleza y muchas moléculas biológicamente importantes contienen enlaces glicosídicos. Éstos están involucrados en muchos procesos biológicos vitales y se ha encontrado que la mayoría de los compuestos que presentan actividad biológica son glicósidos, teniendo como ejemplo los glicoalcaloides presentes en las plantas pertenecientes al género *Solanum*, como la α -solamargina, entre otros, que han mostrado citotoxicidad contra células de cáncer en humanos (tomada y modificada de Monsalve 2004). Son estables en agua neutra. No están en equilibrio con una forma de cadena abierta ni presentan mutarrotación. Sin embargo, pueden convertirse de nuevo en el monosacárido libre por hidrólisis.

Hoy en día, debido a la gran importancia biológica que presentan estos derivados del núcleo *ent*-kaurano, muchos autores, han querido obtener compuestos que posean una mayor actividad que las mismas sustancias originales, llevando a cabo un gran número de reacciones que involucran la formación de derivados glicosídicos del *ent*-kaurano, sin embargo, se pueden diferenciar dos vías generales. Una en la cual se forman éteres glicosídicos y la otra donde se forman esteres glicosídicos, los primeros se refieren a un acoplamiento entre un donador generalmente glucosa protegida y activada en su posición anomérica y un receptor que por lo general es una aglicona cuya función activa es un grupo hidroxilo o alcohol que en el caso del *ent*-kaurano se han encontrado en posición C-19 y C-17 (García *et al.*, 2007). La segunda vía corresponde de manera similar, un donador que pertenece a la glucosa protegida con su anomérico activo y un receptor como la aglicona, en este caso, en forma de sal esterificada de plata sobre C-19 (Aparicio, 2008; Visbal *et al.*, 2004; Peña, 2012).

Este producto se obtuvo utilizando la técnica de Visbal y col. (Visbal *et al.*, 2004). Se tituló 1,0 g de ácido 15-oxo-kaur-16-en-19-oico (0,316 mmol) con NaOH en solución metanólica utilizando dos gotas de ninhidrina como indicador. A esta solución se agregó 400 mg de nitrato de plata (3,5 mmol).

Se agitó unos minutos en la oscuridad y se filtró rápidamente la sal de plata formada. Esta sal de plata se mantuvo en la estufa a 60°C durante una noche y luego se filtró al vacío durante una hora para eliminar las trazas de humedad. Se colocó la sal de plata del ácido 15-oxo-kaur-16-en-19-oico en una fiola de 125 mL y se le agregó 50 mL de benceno seco (tratado con alambre de sodio). Luego se añadió 1.43 g de 2, 3, 4, 6-tetraacetil-bromo-glucosa disuelta en benceno seco y se sometió a agitación a temperatura ambiente en la oscuridad durante 24 horas. Al cabo de este tiempo se filtró el bromuro de plata formado y se llevó el filtrado a sequedad obteniéndose 1,8 gramos de producto que fue sometido a cromatografía flash sobre silicagel.

La columna se eluyó con hexano y luego con mezclas de polaridad creciente de hexano/acetato de etilo. Se logró obtener 756 mg del ester (X), cuya estructura se elucidó mediante experimentos uni- y bidimensionales de resonancia magnética nuclear.

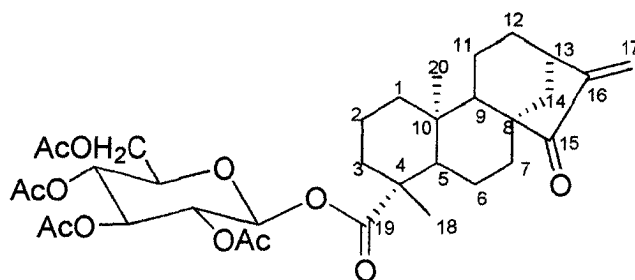


Figura 27: Éster 2, 3, 4, 6-tetra-acetil- α -D-piranosilo del ácido 15-oxo-kaur-16-en-19-oico (X).

I.3.- RESULTADOS Y DISCUSION:

Caracterización de los productos naturales aislados de *Coespeletia moritziana*

Los productos naturales elucidados son:

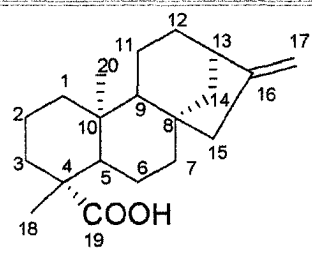
- ▼ Acido kaurénico (I)
- ▼ Acido grandiflorénico (II)
- ▼ Acido 15 α -hidroxi-kaur-16-en-19-oico (III)
- ▼ Acido 15 α -acetoxi-kaur-16-en-19-oico (IV)
- ▼ Acido 16 α -hidroxi-kauran-19-oico (VI)

Los obtenidos por hemisíntesis:

- ▼ Acido kauran-19-oico (V)
- ▼ Kaurenol (VII)
- ▼ Acetato de kaurenol (VIII)
- ▼ Acido 15, 16-epoxi-17 acetoxi-kauran-19-oico (IX)
- ▼ Ester 2, 3, 4, 6- tetra acetil α -D-piranosilo del ácido 15-oxo-kaur-16-en-19-oico (X)

I.3.1.- Acido kaurénico

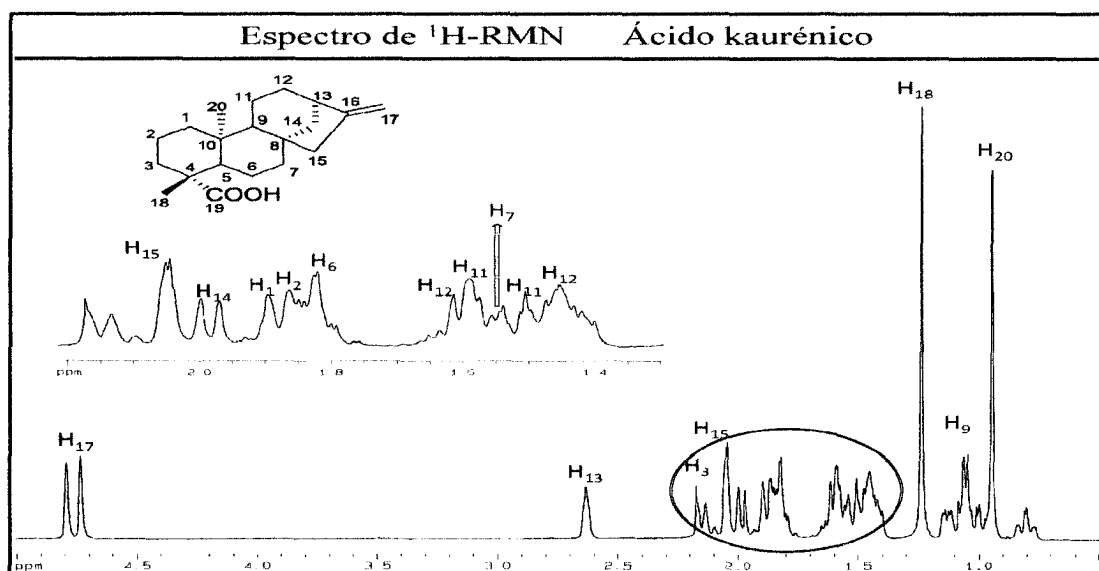
Tabla 3: Características físicas del ácido Kaurénico.

Producto	Acido kaurénico Ácido <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oico
Estructura	
Formula Molecular	$C_{20}H_{30}O_2$
Peso Molecular	302.46 g/mol
Solubilidad	Cloroformo y acetato de etilo
Punto Fusión	175-178°C
Características físicas	Sólido traslúcido e inodoro

En el espectro RMN- 1H , se distinguen dos zonas claramente diferenciadas. La primera de estas se encuentra ubicada entre los 4,5 ppm, lo que indica la presencia de los protones del doble enlace exocíclico Δ 16-17.

La segunda zona, que se encuentra a campo más alto (1,0 y 3,0 ppm) agrupa aquellos hidrógenos pertenecientes a grupos metilos, metilenos y metinos. El protón mas diferenciado dentro de este grupo es el H-13 que aparece a 2,63 ppm debido a que es un metino alílico y cabeza puente de un biciclo.

Los protones H-18 y H-20 son singuletes de 3 hidrógenos cada uno. El resto de las señales, cuyas integrales muestran un total de 23 hidrógenos, entre 1,00 y 2,40 ppm son hidrógenos alifáticos.



Espectro de RMN- ^1H del ácido kaurénico

Tabla 4: Desplazamientos químicos (δ) en el espectro de RMN- ^1H del ácido kaurénico

H	H-13	H-15	H17a	H17b	H-18	H-20
δ	2,63	2,04	4,73 – 4,79		1,24	0,95
m	s	d	s		s	s

El RMN- ^{13}C , del núcleo del ácido kaurénico presenta un total de 20 carbonos, de los cuales 15 están ubicados a campo alto entre 10 y 60 ppm y tres a campo bajo que por su desplazamiento, a 184,7 (C-19), 156,0 (C-16) y 103,2 ppm (C-17), muestra que existen carbonos Sp^2 de un ácido, así como de un alqueno, que estaría conformado por los carbonos C-16 y C-17 respectivamente.

La superposición del espectro DEPT-135 sobre el ^{13}C , permite diferenciar las señales de metinos, metilenos y metilos, mientras que los carbonos cuaternarios no muestran señal para este experimento; de esta manera se puede apreciar la presencia de 3 CH, 10 CH_2 , 2 CH_3 y 5 carbonos.

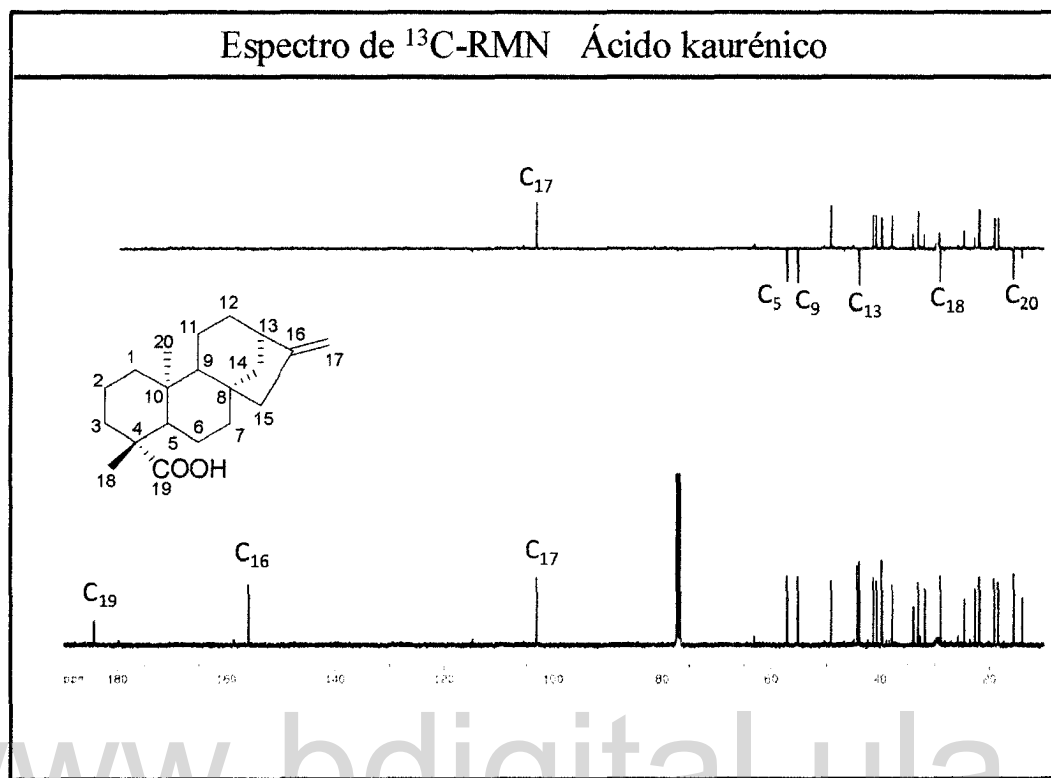
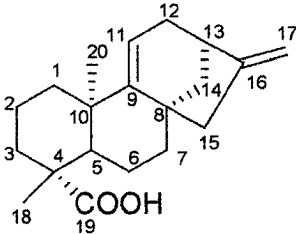


Tabla 5: Desplazamientos químicos (δ) en el espectro de RMN ^{13}C del ácido kaurénico

C	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10
δ	40,7	19,1	37,7	43,2	57,0	21,8	41,3	44,2	55,1	39,7
Tipo	>CH ₂	>CH ₂	>CH ₂	>C<	>CH	>CH ₂	>CH ₂	>C<	>CH	>C<
C	C-11	C-12	C-13	C-14	C-15	C-16	C-17	C-18	C-19	C-20
δ	18,4	33,1	43,8	39,7	48,9	155,8	103,0	29,0	184,9	15,6
Tipo	>CH ₂	>CH ₂	>CH	>CH ₂	>CH ₂	=C<	=CH ₂	-CH ₃	-COOH	-CH ₃

I.3.2.- Acido Grandiflorénico

Tabla 6: Características físicas del ácido grandiflorénico.

Producto	Acido Grandiflorénico Ácido <i>ent</i>-kaur-9(11), 16-dien-19-oico
Estructura	
Formula Molecular	$C_{20}H_{28}O_2$
Peso Molecular	300 g/mol
Solubilidad	Cloroformo
Punto Fusión	155-157°C
Características físicas	Sólido traslúcido e inodoro

www.bdigital.ula.ve

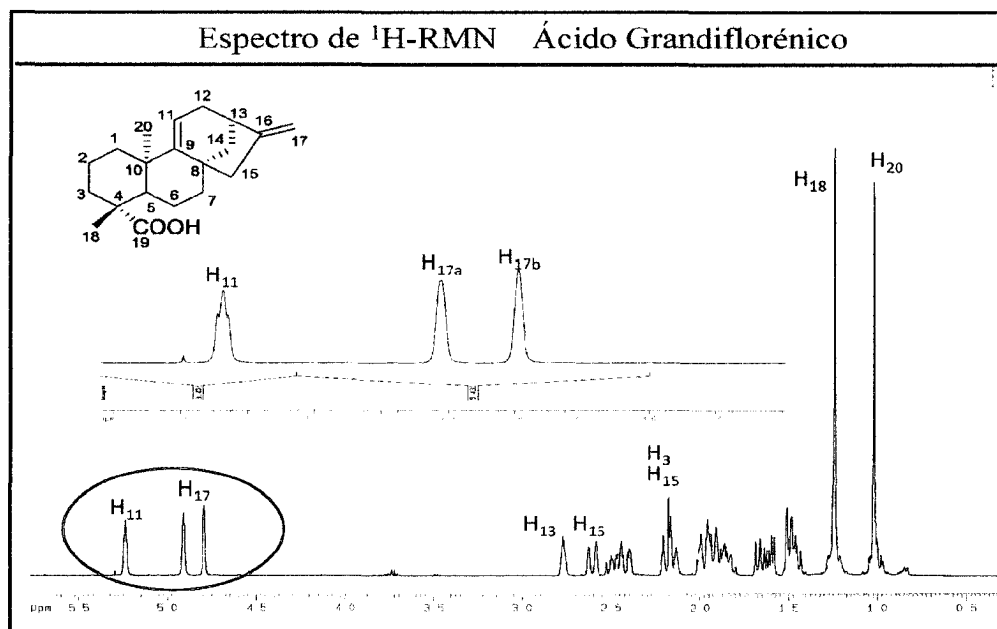
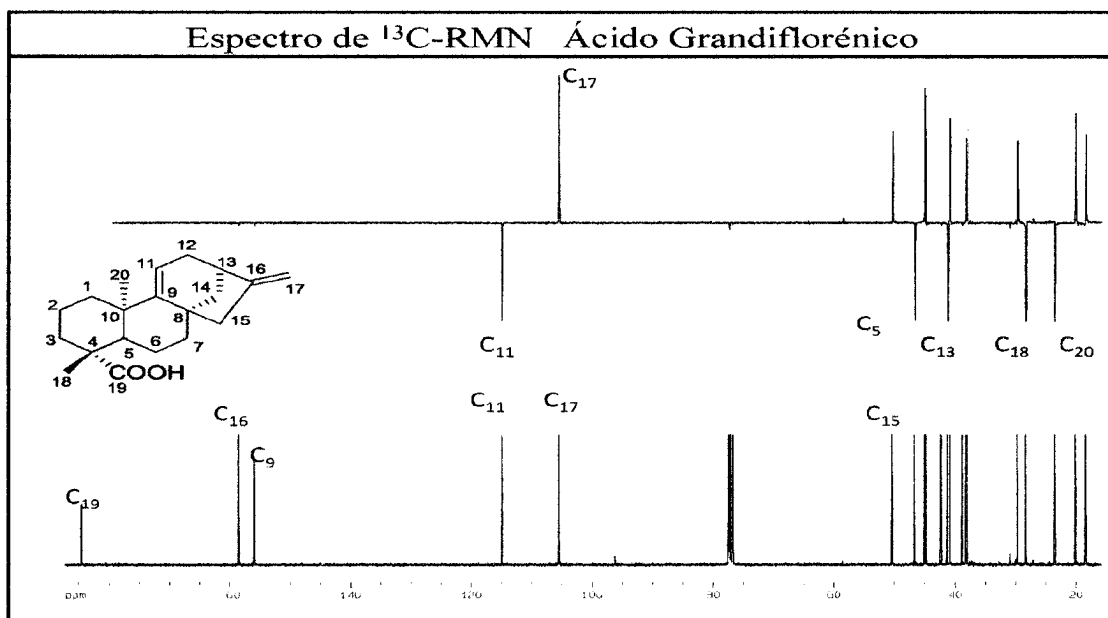
Espectro de RMN- 1H del ácido grandiflorénico

Tabla 7: Desplazamientos químicos (δ) en el espectro de RMN- ^1H del ácido grandiflorénico

H	H-11	H-13	H-15	H17a	H17b	H-18	H-20
δ	5,23	2,76	2,60	4,79 – 4,91		1,24	1,02
m	<i>t</i>	<i>s</i>	<i>d</i>	<i>s</i>		<i>s</i>	<i>s</i>

En el espectro de ^1H -RMN para el ácido grandiflorénico, se distinguen los singuletes característicos de un metilo angular (H-20) y de un solo metilo terciario (H-18), también se observa la señal de un singulete ancho de un hidrógeno alílico que corresponde al (H-13), la cual siempre es característica para los kaurenos al igual que el par de singuletes típicos de los hidrógenos del doble enlace exocíclico (H-17).

La señal para el otro carbono olefínico, fue detectada en el ^1H -RMN como un triplete débilmente acoplado que corresponde al hidrógeno del doble enlace Δ 9(11).



Espectro de RMN- ^{13}C del ácido grandiflorencio

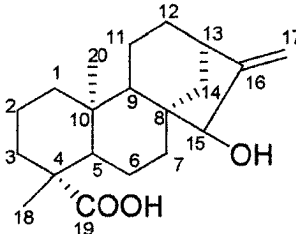
En el espectro de ^{13}C -RMN del ácido grandiflorénico, se observan los picos de los carbonos del doble enlace exocíclico (C-16) y (C-17), los del doble enlace trisustituído (C-9 y C-11), los de los metilos dos metilos terciarios (C-18 y C-20), y los del carbono carboxílico (C-19).

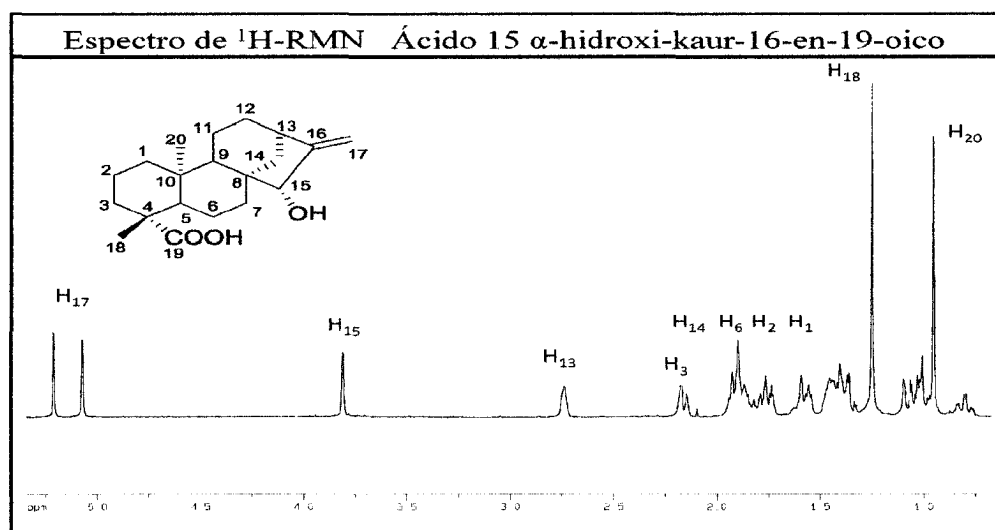
Tabla 8: Desplazamientos químicos (δ) en el espectro de RMN ^{13}C del ácido grandiflorénico

C	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10
δ	40,7	19,1	37,7	43,2	57,0	21,8	41,3	44,2	155,1	39,7
Tipo	$>\text{CH}_2$	$>\text{CH}_2$	$>\text{CH}_2$	$>\text{C}<$	$>\text{CH}$	$>\text{CH}_2$	$>\text{CH}_2$	$>\text{C}<$	$=\text{C}<$	$>\text{C}<$
C	C-11	C-12	C-13	C-14	C-15	C-16	C-17	C-18	C-19	C-20
δ	114,9	33,1	43,8	39,7	48,9	155,8	103,0	29,0	184,9	15,6
Tipo	$=\text{C}-\text{H}$	$>\text{CH}_2$	$>\text{CH}$	$>\text{CH}_2$	$>\text{CH}_2$	$=\text{C}<$	$>\text{CH}_2$	$-\text{CH}_3$	$-\text{COOH}$	$-\text{CH}_3$

I.3.3.- Acido 15 α -hidroxi-kaur-16-en-19-oico

Tabla 9: Características físicas del Acido 15 α -hidroxi-kaur-16-en-19-oico (ácido grandiflorólico)

Producto	Acido 15α-hidroxi-kaur-16-en-19-oico ácido grandiflorólico
Estructura	
Formula Molecular	$\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_3$
Peso Molecular	318,45 g/mol
Solubilidad	Metanol
Punto Fusión	227-228°C
Características físicas	Sólido cristalino blanco e inodoro

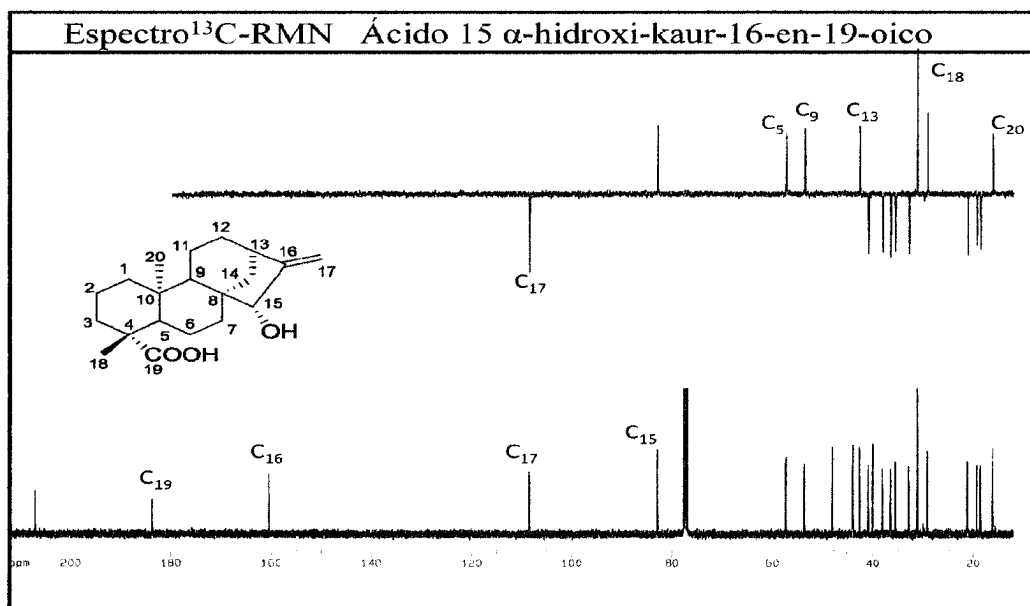


Espectro de RMN ^1H del ácido 15 α -hidroxi-kaur-16-en-19-oico.

El espectro de ^1H -RMN del ácido 15 α -hidroxi-kaur-16-en-19-oico (ácido grandiflorólico), demostró la existencia del doble enlace metilénico (H₁₇), al igual que la presencia de un hidroxilo secundario, que son características de un oximetino en H-15. Todas estas señales una vez caracterizadas con sus respectivos grupos funcionales puso de manifiesto el esqueleto del kaureno.

Tabla 10: Desplazamientos químicos (δ) en el espectro de RMN- ^1H del ácido 15 α -hidroxi-kaur-16-en-19-oico.

H	H-13	H-15	H17a	H17b	H-18	H-20
δ	2,72	3,79	5,06 – 5,19		1,24	0,94
m	s	s	s		s	s

Espectro de RMN ^{13}C del ácido 15 α -hidroxi-kaur-16-en-19-oico

www.bdigital.ula.ve

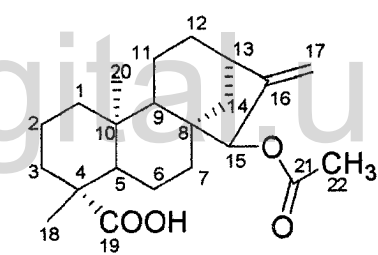
Tabla 11: desplazamientos químicos (δ) en el espectro de RMN ^{13}C del ácido 15 α -hidroxi-kaur-16-en-19-oico

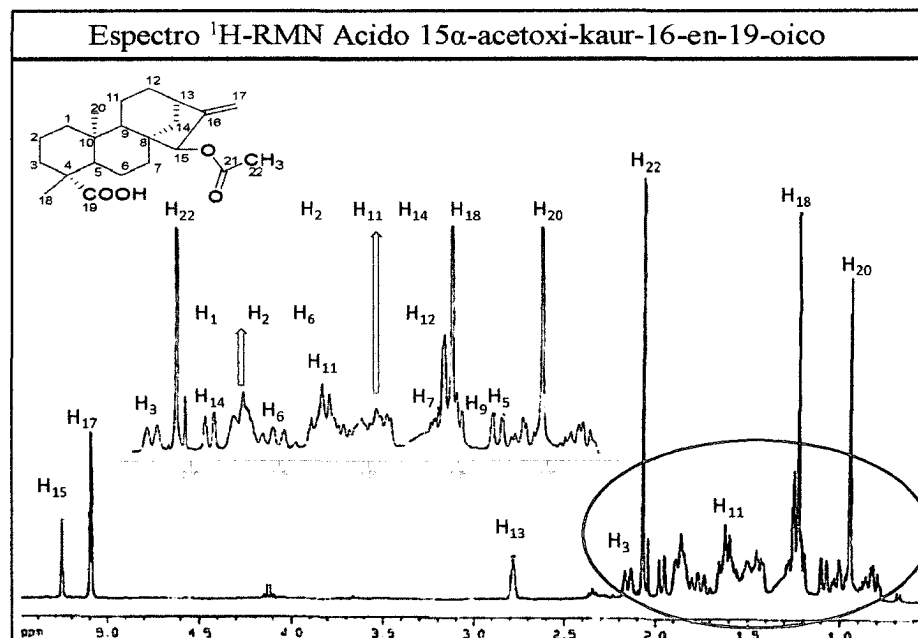
C	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10
δ	40,6	19,0	37,8	43,6	57,0	20,9	35,1	47,7	53,3	39,8
Tipo	>CH ₂	>CH ₂	>CH ₂	>C<	>CH	>CH ₂	>CH ₂	>C<	>CH	>C<
C	C-11	C-12	C-13	C-14	C-15	C-16	C-17	C-18	C-19	C-20
δ	18,2	32,5	42,2	36,2	82,8	160,3	108,7	28,9	183,2	15,8
Tipo	>CH ₂	>CH ₂	>CH	>CH ₂	CH-OH	=C<	=CH ₂	CH ₃	-COOH	CH ₃

Para el espectro de ^{13}C -RMN del ácido 15 α -hidroxi-kaur-16-en-19-oico, se observa a δ : 183,2 la señal del carbono carbonílico del grupo ácido. También se puede apreciar la señal correspondiente a los carbonos olefinicos (C-16 δ : 160,3 y C-17 δ : 108,7). A campo más alto se observan las señales características del núcleo *ent*-kaureno de los carbonos metínicos (C-5, C-9 y C-13) y de los metilos de los carbonos C-18 y C-20.

I.3.4.- Acido 15 α -acetoxi-kaur-16-en-19-oico

Tabla 12: Características físicas del Acido 15 α -acetoxi-kaur-16-en-19-oico

Producto	Acido 15 α -acetoxi-kaur-16-en-19-oico
Estructura	
Formula Molecular	$\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_4$
Peso Molecular	360.49g/mol
Solubilidad	Cloroformo y acetato de etilo
Punto Fusión	175-178°C
Características físicas	Sólido traslúcido e inodoro

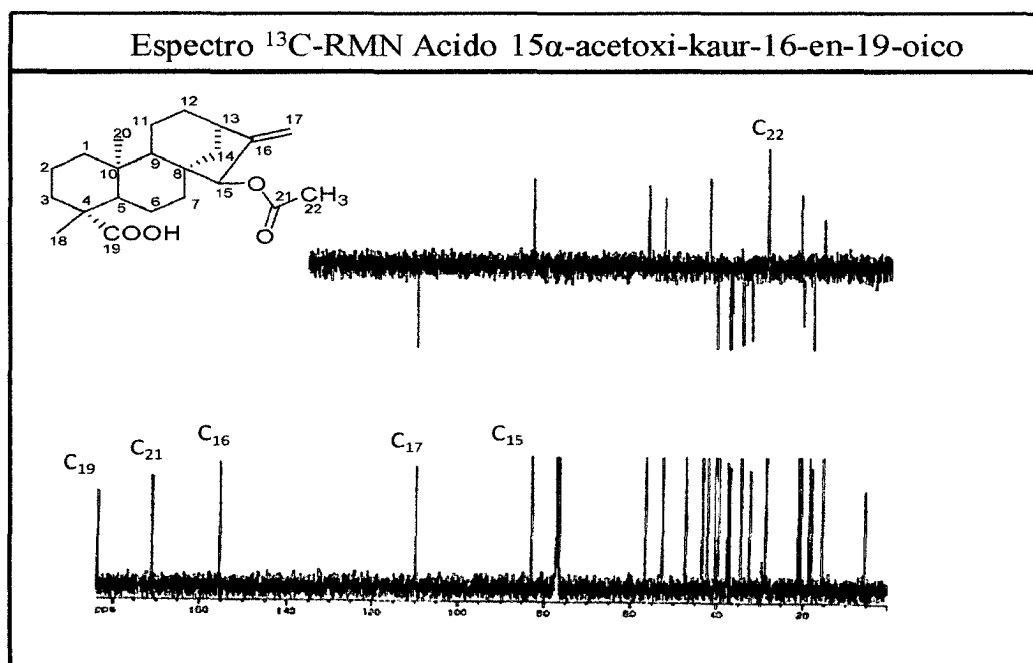


Espectro de RMN ^1H del ácido 15 α -acetoxi-kaur-16-en-19-oico.

Tabla 13: Desplazamientos químicos (δ) en el espectro de RMN- ^1H del ácido 15 α -acetoxi-kaur-16-en-19-oico.

H	H-13	H-15	H-17	H-18	H-20	H-22
δ	2,78	5,25	5,09	1,22	0,95	2,07
m	s	s	s	s	s	s

En el espectro ^1H -RMN del ácido 15 α -acetoxi-kaur-16-en-19-oico, se observa la aparición de una nueva señal en δ : 2,07 de un singulete que representa al metilo de un grupo acetilo (H-22), también se observa el desplazamiento hacia campos más bajos del singulete correspondiente al protón en H-15 unido al grupo acetilo. En este espectro observamos que los dos singuletes correspondientes a los hidrógenos olefinicos de H-17a y H-17b comunes en estos compuestos, aparecen formando un único singulete debido al apantallamiento que sufre el hidrogeno que se encuentra al lado del grupo acetilo.



Espectro de RMN ^{13}C del ácido 15 α -acetoxi-kaur-16-en-19-oico

Tabla 14: desplazamientos químicos (δ) en el espectro de RMN ^{13}C del ácido 15 α -acetoxi-kaur-16-en-19-oico.

C	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	C-11
δ	40,5	18,9	37,6	43,6	56,7	20,7	34,7	47,4	52,8	39,8	18,3
Tipo	>CH ₂	>CH ₂	>CH ₂	>C<	>CH	>CH ₂	>CH ₂	>C<	>CH	>C<	>CH ₂
C	C-12	C-13	C-14	C-15	C-16	C-17	C-18	C-19	C-20	C-21	C-22
δ	32,6	42,4	37,1	83,0	155,4	110,0	28,9	183,7	15,8	171,1	21,3
Tipo	>CH ₂	>CH	>CH ₂	CH-O	=C<	=CH ₂	-CH ₃	COOH	-CH ₃	-COO	CH ₃

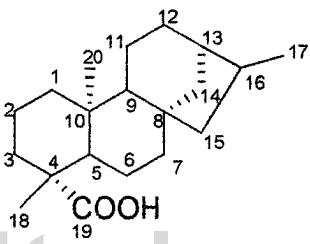
En el espectro ^{13}C -RMN observamos la aparición de dos nuevas señales correspondientes a los carbonos del nuevo grupo acetilo ubicado en la molécula en el C-21 y C-22. También observamos la señal a δ : 155,41 del carbono cuaternario C-16, la señal del carbono metilénico en C-17 a 110 ppm.

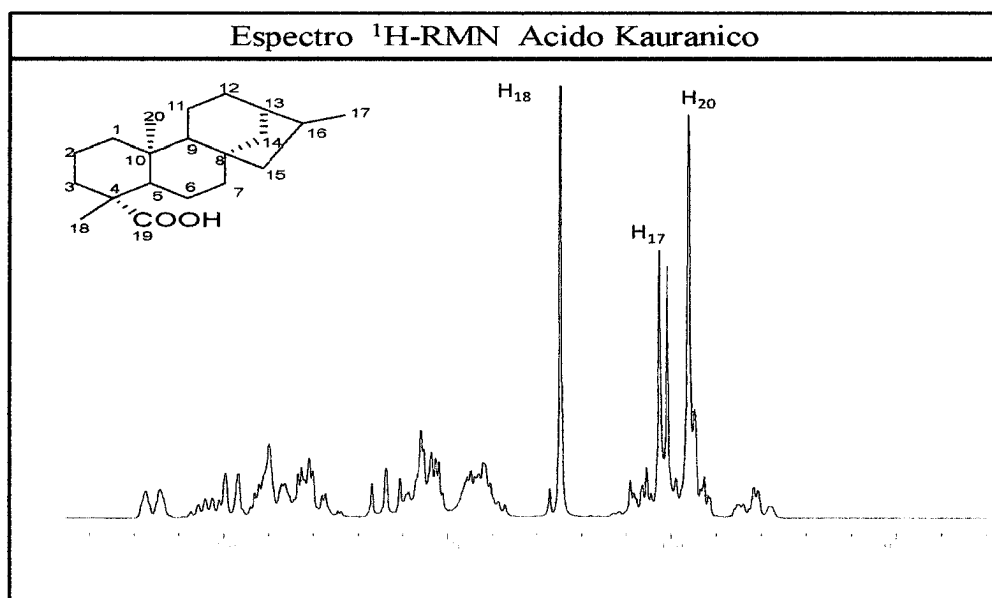
La señal correspondiente a C-15 se observa desplazada a campo más bajo (δ : 83) en comparación con el desplazamiento encontrado para el núcleo del

kaureno (δ : 48,9), dicho desplazamiento es debido a la presencia del carbonil del grupo ester unido directamente al C-15.

I.3.5.- Acido-kauran-19-oico (kauránico)

Tabla 15: Características físicas del ácido kauran-19-oico (ácido kauránico)

Producto	Acido kauran-19-oico
Estructura	
Formula Molecular	$C_{20}H_{32}O_2$
Peso Molecular	304,47 g/mol
Solubilidad	Cloroformo
Punto Fusión	188°C
Características físicas	Sólido translúcido e inodoro

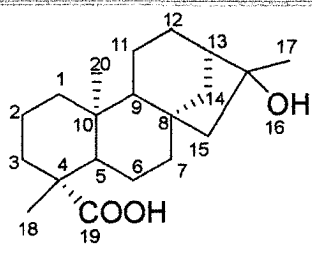


Espectro de RMN ^1H del ácido kauránicoTabla 16: Desplazamientos químicos (δ) en el espectro de RMN- ^1H del ácido kauránico

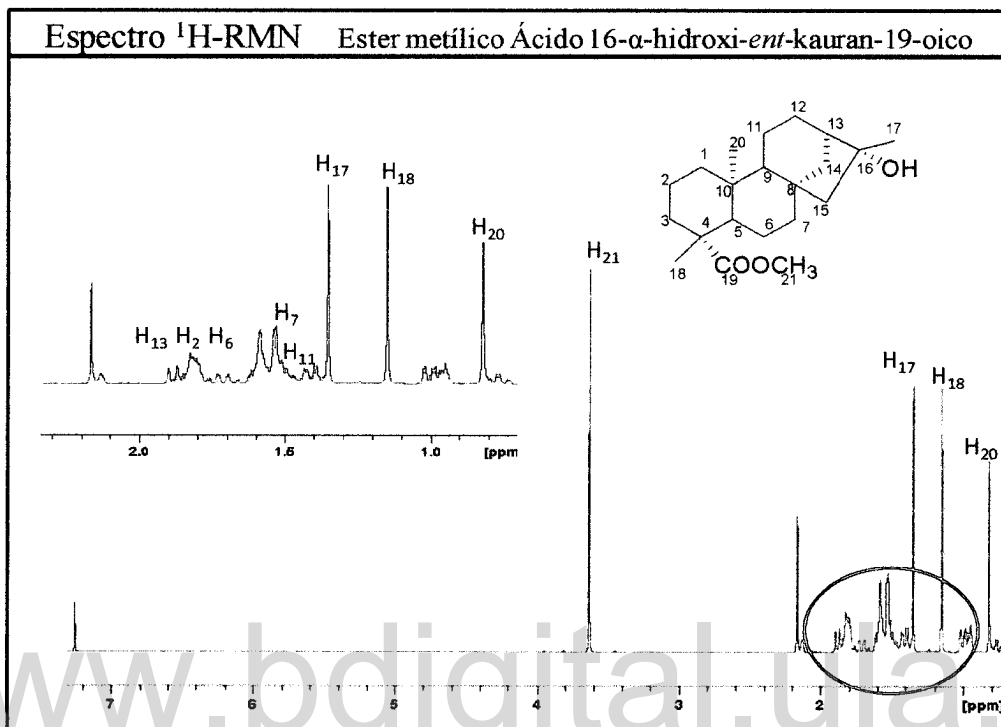
H	H-17	H-18	H-20
δ	1,02	1,25	0,96
m	s	s	s

En el espectro podemos observar la aparición de las tres señales más significativas de este ácido kauránico. A campo más alto (δ : 0,95) se observa la señal correspondiente a los hidrógenos del metilo en C-20, a campo más bajo (δ : 1,05) se observa un doblete perteneciente a los hidrógenos del metilo en posición C-17 finalmente se aprecia un singulete (δ : 1,25) del metilo restante en C-10.

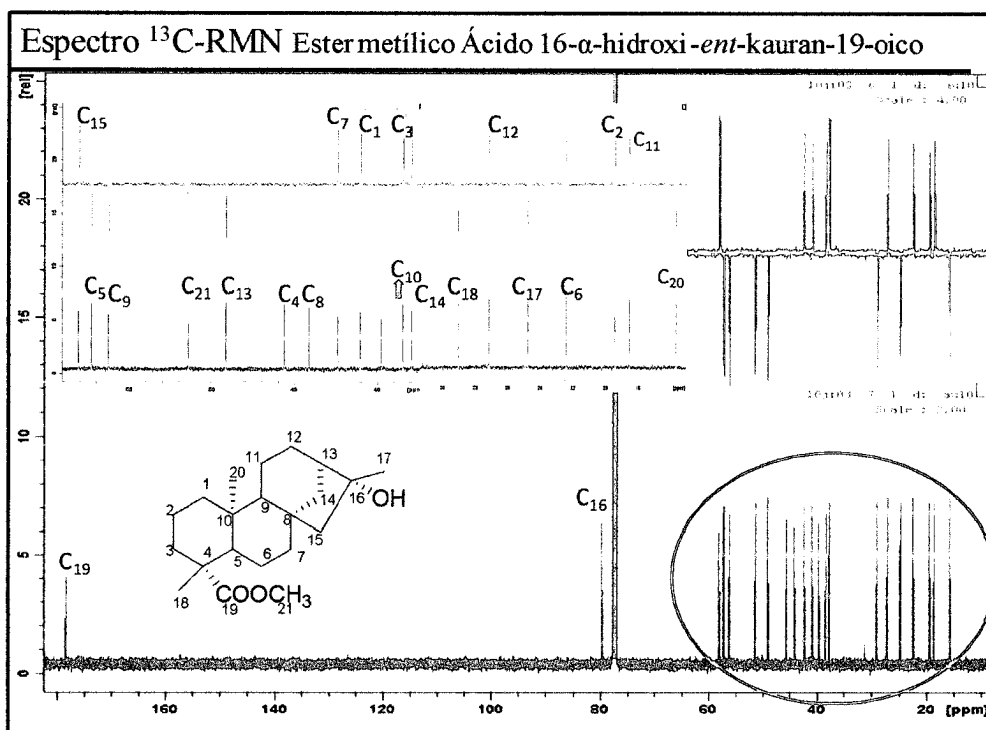
I.3.6.- Acido 16 α -hidroxi-kauran-19-oicoTabla 17: Características físicas del ácido 16 α -hidroxi-*ent*-kauran -19-oico.

Producto	Acido 16 α -hidroxi-kauran-19-oico
Estructura	
Formula Molecular	$\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_3$
Peso Molecular	320,47 g/mol
Solubilidad	Metanol
Punto Fusión	278-282°C

Características físicas | Sólido traslúcido e inodoro



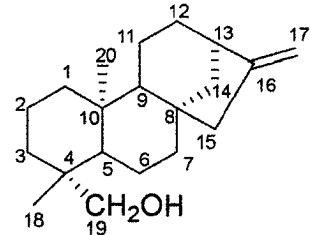
Espectro de RMN ^1H Ester metílico del ácido 16 α -hidroxi-kauran-19-oico

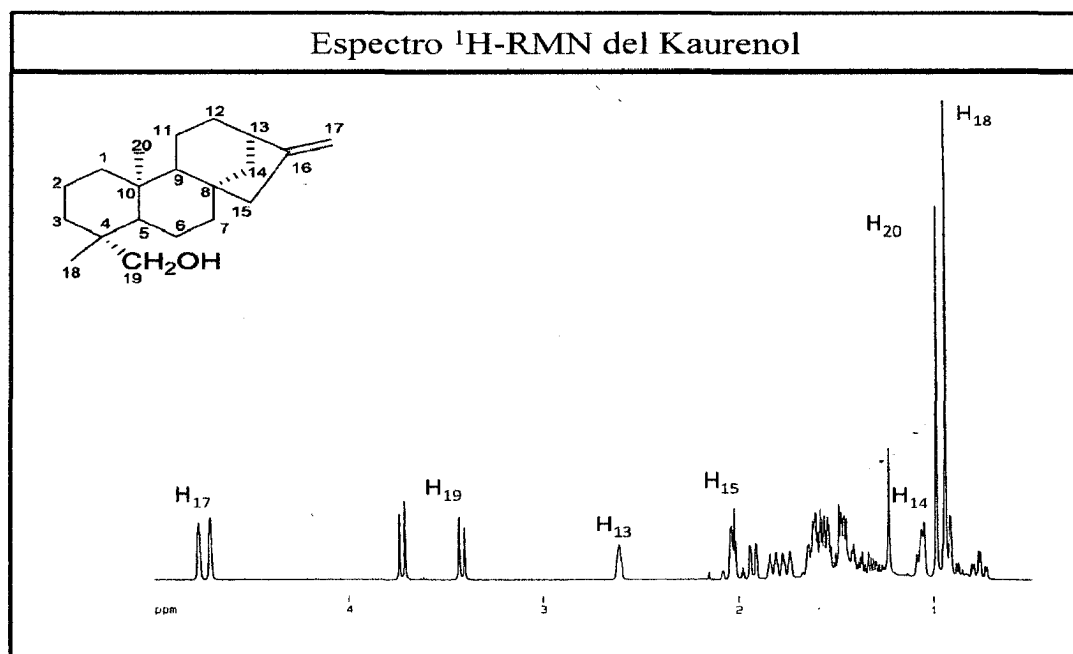


Espectro de RMN ^{13}C Ester metílico del ácido 16 α -hidroxi-kauran-19-oico

I.3.7.- kaurenol

Tabla 18: Características físicas del Acido *ent*-kaur-16-en-19-ol (kaurenol)

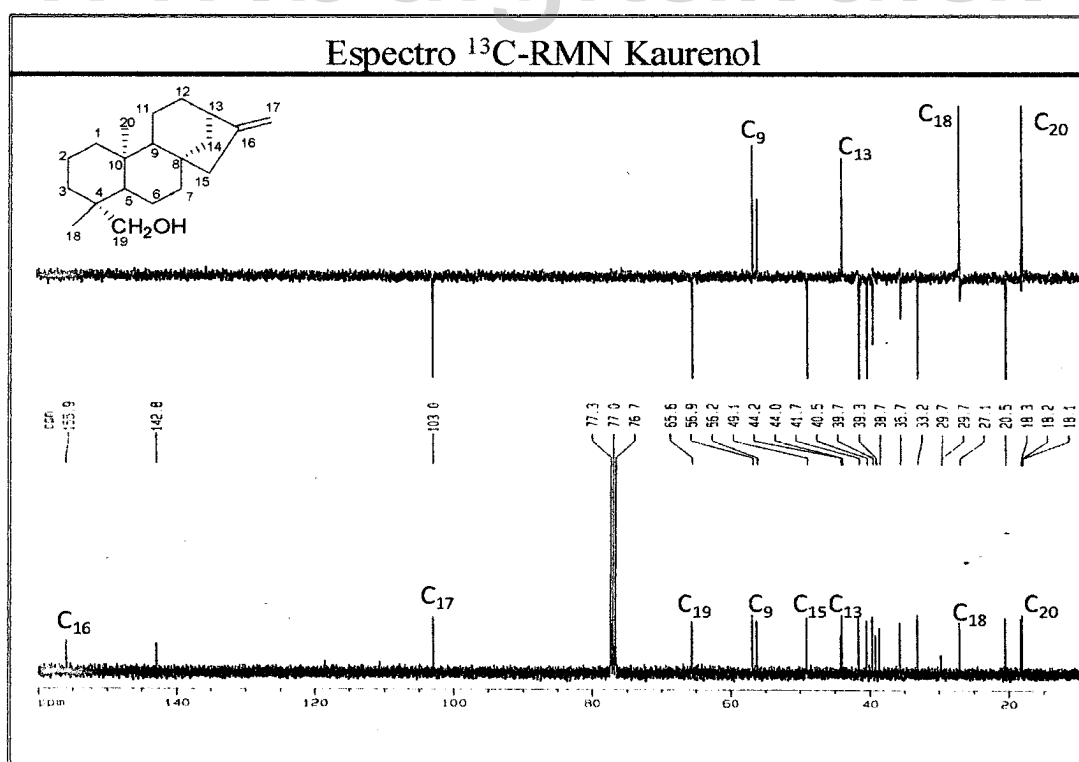
Producto	Kaurenol <i>Ent</i> -kaur-16-en-19-ol
Estructura	
Formula Molecular	$\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}$
Peso Molecular	288,47 g/mol
Solubilidad	Cloroformo
Punto Fusión	140-141°C
Características físicas	Sólido traslúcido e inodoro

Espectro de RMN ^1H del kaurenol

Se observan a bajo campo señales correspondientes a los hidrógenos geminales del doble enlace exocíclico δ 4,79 y 4,73 (H-17a, H-17b, 2H, s), y a mediano campo se observan señales a δ 3,74 y 3,44 (H-19a, H-19b, 2H, 2d, característica del *ent*-kaur-16-en-19-ol. A mediano campo se observa una señal característica del núcleo del *ent*-kaureno como es el hidrógeno a δ 2,63 (H-13, 1H, m) y a alto campo los metilos a δ 1,01 y 0,96 (H-18 y H-20, 3H, s).

Tabla19: Desplazamientos químicos (δ) en el espectro de RMN- ^1H del kaurenol

H	H-1	H-3	H-13	H-15	H-17	H-18	H-19	H-20
δ	0,76	0,89 - 1,74	2,63	2,06	H _a : 4,73 - H _b : 4,79	0,96	3,44 - 3,74	1,01
m	dt	td	m	m	s	s	2d	s



Espectro de RMN ^{13}C del kaurenol

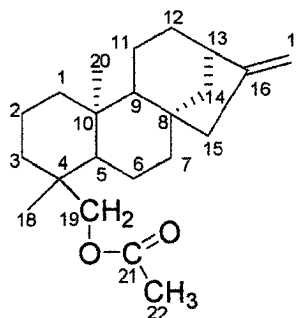
Tabla 20: Desplazamientos químicos (δ) en el espectro de RMN ^{13}C del kaurenol

C	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10
δ	40,5	18,3	35,7	38,7	56,9	20,5	41,7	44,2	56,2	39,3
Tipo	>CH ₂	>CH ₂	>CH ₂	>C<	>CH	>CH ₂	>CH ₂	>C<	>CH	>C<
C	C-11	C-12	C-13	C-14	C-15	C-16	C-17	C-18	C-19	C-20
δ	18,2	33,2	44,0	39,7	49,1	155,9	103,0	27,1	65,6	18,1
Tipo	>CH ₂	>CH ₂	>CH	>CH ₂	-CH-O	=C<	=CH ₂	CH ₃	CH ₂ -OH	CH ₃

En el espectro de RMN ^{13}C , se destacan los carbonos C-16 y C-17 que forman el doble enlace metilénico terminal a δ : 155,9 y 103,0 ppp respectivamente, también los carbonos que poseen los grupos metilos C-18 a 27,1ppm y C-20 a 18,1 ppm. Por último podemos distinguir el pico del C-19 a 65,6 ppm que se encuentra unido al hidroxilo. (Tomado y modificado de Baptista, 2006).

I.3.8.- Acetato de kaurenol

Tabla 21: Características físicas del acetato de kaurenol

Producto	Acetato de kaurenol
Estructura	
Formula Molecular	C ₂₂ H ₃₄ O ₂
Peso Molecular	330,50 g/mol
Solubilidad	Cloroformo
Punto Fusión	114-115°C
Características físicas	Sólido traslúcido e inodoro

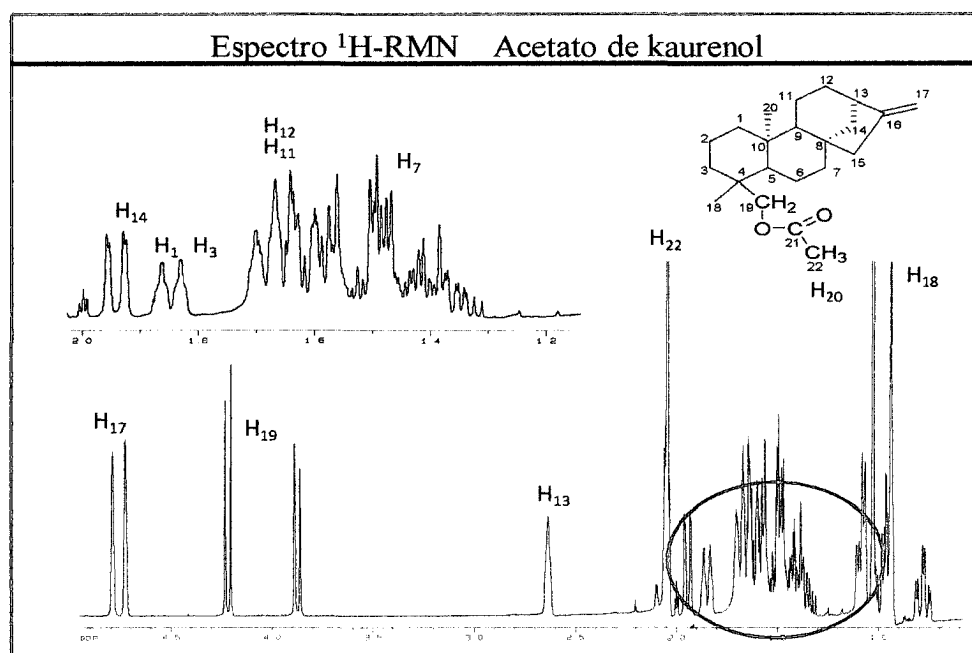
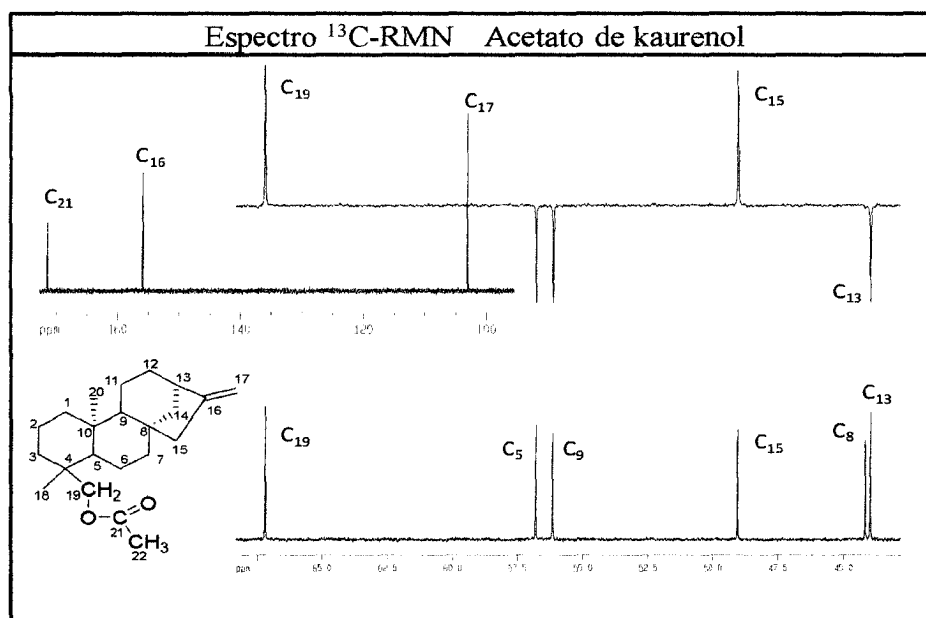
Espectro de RMN ^1H del acetato de kaurenol

Tabla 22: Desplazamientos químicos (δ) en el espectro de RMN- ^1H del acetato de kaurenol

H	H-13	H17a H17b	H-18	H-19	H-20	H-22
δ	2,63	4,73 – 4,78	0,94	3,9 – 4,2	1,03	2,04
m	s	s	s	d	s	s

Las señales de RMN- ^1H son similares a los de los espectros anteriores, presentándose las señales de los hidrógenos característico del núcleo del kaurenol, a excepción que además se observa la aparición a campo bajo de un nuevo singulete a δ : 2,04 atribuible a los protones del acetato (COOCH_3) en H-19 acompañado de los hidrógenos geminales de un doble enlace exocíclico δ 4,79 y 4,74 (H-17a, H-17b).



Espectro de RMN ^{13}C del acetato de kaurenol

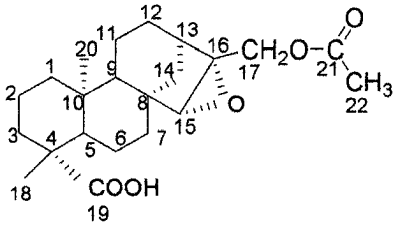
Tabla 23: Desplazamientos químicos (δ) en el espectro de RMN ^{13}C del acetato de kaurenol

C	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	C-11
δ	40,3	18,2	36,3	37,1	56,8	20,4	41,5	44,1	56,2	39,2	18,2
Tipo	$>\text{CH}_2$	$>\text{CH}_2$	$>\text{CH}_2$	$>\text{C}<$	$>\text{CH}$	$>\text{CH}_2$	$>\text{CH}_2$	$>\text{C}<$	$>\text{CH}$	$>\text{C}<$	$>\text{CH}_2$
C	C-12	C-13	C-14	C-15	C-16	C-17	C-18	C-19	C-20	C-21	C-22
δ	33,1	43,9	39,6	49,0	155,8	103,0	27,6	67,2	18,2	171,4	21,0
Tipo	$>\text{CH}_2$	$>\text{CH}$	$>\text{CH}_2$	$>\text{CH}_2$	$=\text{C}<$	$=\text{CH}_2$	$-\text{CH}_3$	$-\text{CH}_2-\text{O}$	$-\text{CH}_3$	$-\text{COO}$	CH_3

En el espectro de RMN- ^{13}C están presentes 22 señales, entre las que destaca una señal a δ : 171,4 típica de un carbonilo en un grupo carboxilo ó acilo.

I.3.9.- Acido 15, 16-epoxi 17 acetoxi kauran 19 oico

Tabla 24: Características físicas del ácido 15, 16-epoxi 17 acetoxi kauran 19 oico

Producto	Acido 15, 16-epoxi 17 acetoxi kauran 19 oico
Estructura	
Formula Molecular	$C_{22}H_{32}O_5$
Peso Molecular	376,49 g/mol
Solubilidad	Cloroformo
Punto Fusión	187°C
Características físicas	Sólido traslúcido e inodoro

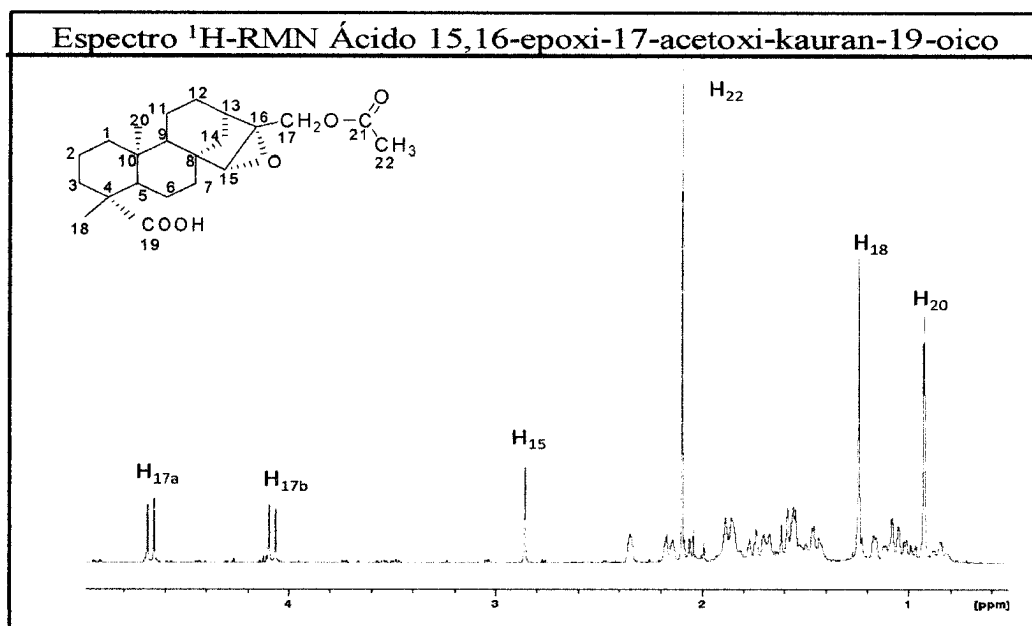
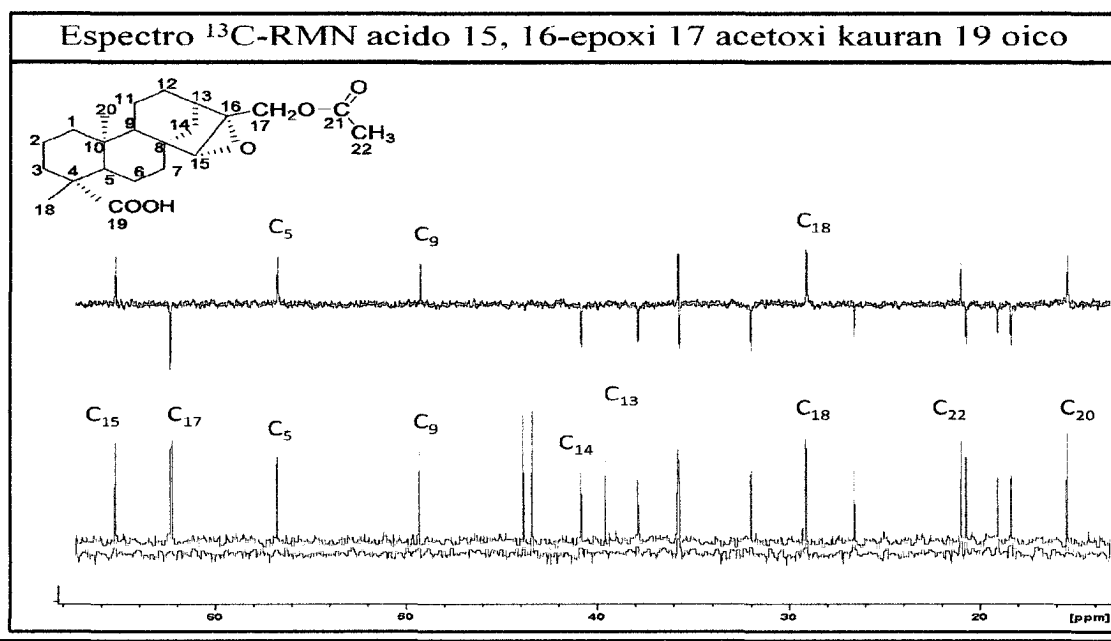
Espectro de RMN ^1H del ácido 15, 16-epoxi 17 acetoxi kauran 19 oico

Tabla 25: Desplazamientos químicos (δ) en el espectro de RMN- ^1H del ácido 15, 16-epoxi 17 acetoxi kauran 19 oico

H	H-15	H-17a	H-17b	H-18	H-20	H-22
δ	2,85	4,65 – 4,68	4,06 – 4,09	1,24	0,92	2,09
m	s	d	d	s	s	s

En RMN- ^1H se identifica el núcleo del *ent*-kaureno. A campo bajo se muestran una señal a δ 2,85 H-15, señal característica de un hidrógeno que se encuentra sobre carbono unido a un heteroátomo, a mediano campo se observan señales correspondiente a dos hidrógenos desapantallados característicos de carbonos que se encuentran formando un epóxido a δ 4,65 y 4,06 H-17^{a,b} y a campo alto se observa la presencia de un metilo a δ 2,09 H-22 característico de un grupo acetoxi, además de los metilos a δ 1,24 y 0,92 H-18 y H-20 correspondientes al núcleo del *ent*-kaurano.

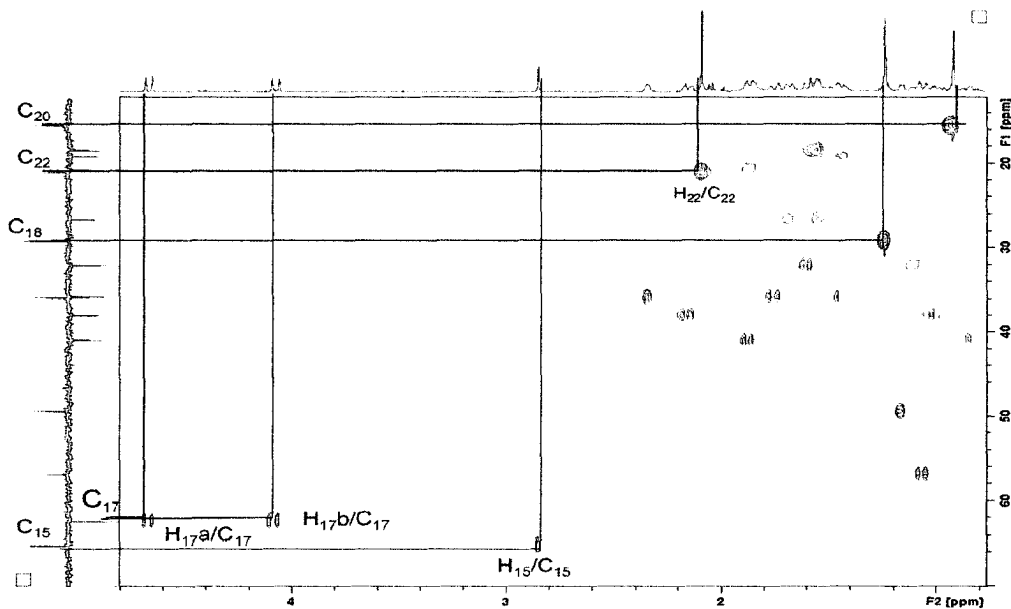


Espectro de RMN ^{13}C del ácido 15, 16-epoxi 17 acetoxi kauran 19 oico

Tabla 26: Desplazamientos químicos (δ) en el espectro de RMN ^{13}C del ácido 15, 16-epoxi-17-acetoxi kauran 19 oico

C	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	C-11
δ	40,8	19,1	32,0	43,9	56,8	20,9	35,7	43,4	49,3	39,6	18,4
Tipo	>CH ₂	>CH ₂	>CH ₂	>C<	>CH	>CH ₂	>CH ₂	>C<	>CH	>C<	>CH ₂
C	C-12	C-13	C-14	C-15	C-16	C-17	C-18	C-19	C-20	C-21	C-22
δ	26,5	35,8	37,4	65,2	62,2	62,3	29,1	183,8	15,4	171,1	207,0
Tipo	>CH ₂	>CH	>CH ₂	>CH	>C<	>CH ₂	-CH ₃	COOH	-CH ₃	C=O	CH ₃

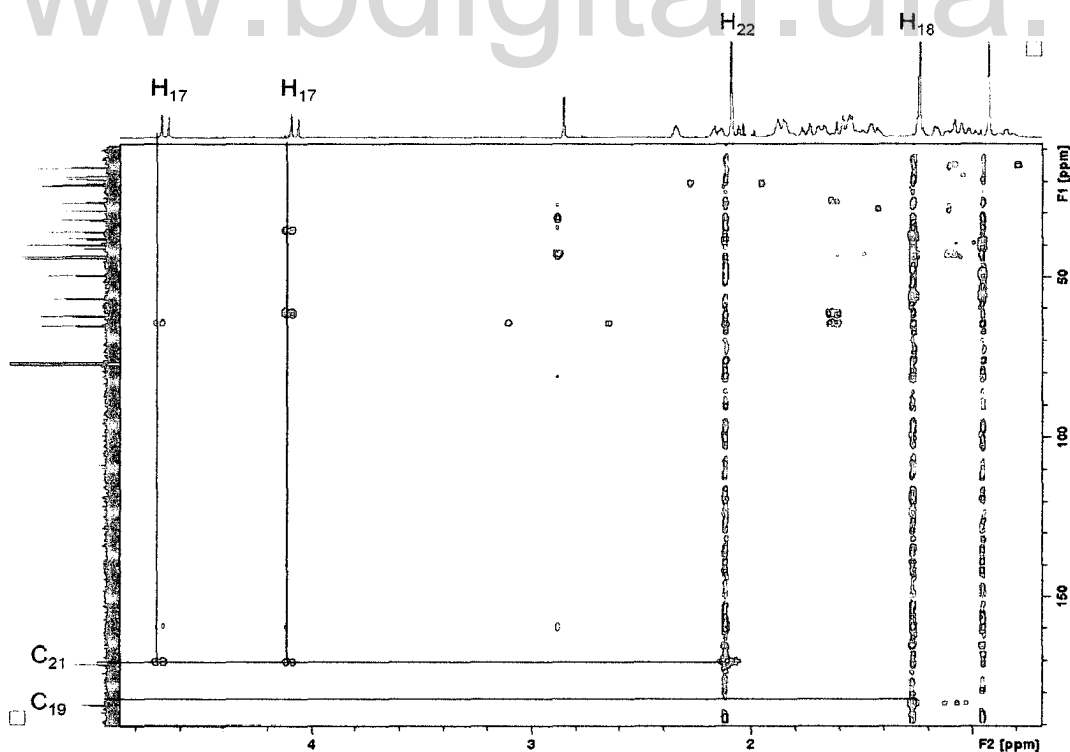
De esta misma manera, en el espectro de RMN- ^{13}C se puede diferenciar a campo bajo la presencia de dos carbonilos δ 183,8 C-19 y 171,1 C-21, además a mediano campo se observa una señal a δ 65,2 C-15, correspondiente a un carbono metínico unido a un oxígeno, también se observa la ausencia del doble enlace entre los carbonos C-16 y C-17, debido a la presencia de dos señales a δ 62,2 C-16 y 62,3 C-17 que por el desplazamiento estos carbonos se encuentran unido a oxígeno, las demás señales se corresponden con el núcleo del *ent*-kaurano, de esta manera se permite presumir la presencia del ácido.



Espectro de HMQC (CDCl_3 , 400 MHz) del ácido 15, 16-epoxi 17 acetoxi kauran

19 oico

www.bdigital.ula.ve



Espectro de HMBC (CDCl_3 , 400 MHz) del ácido 15, 16-epoxi 17 acetoxi kauran

19 oico

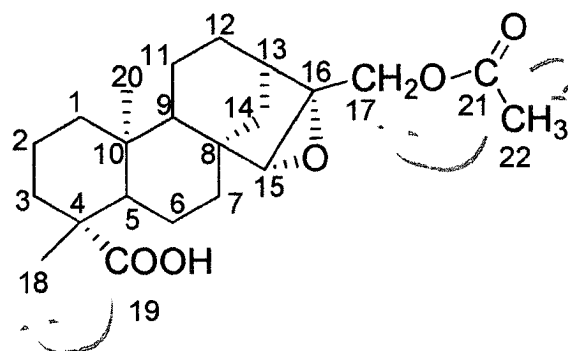


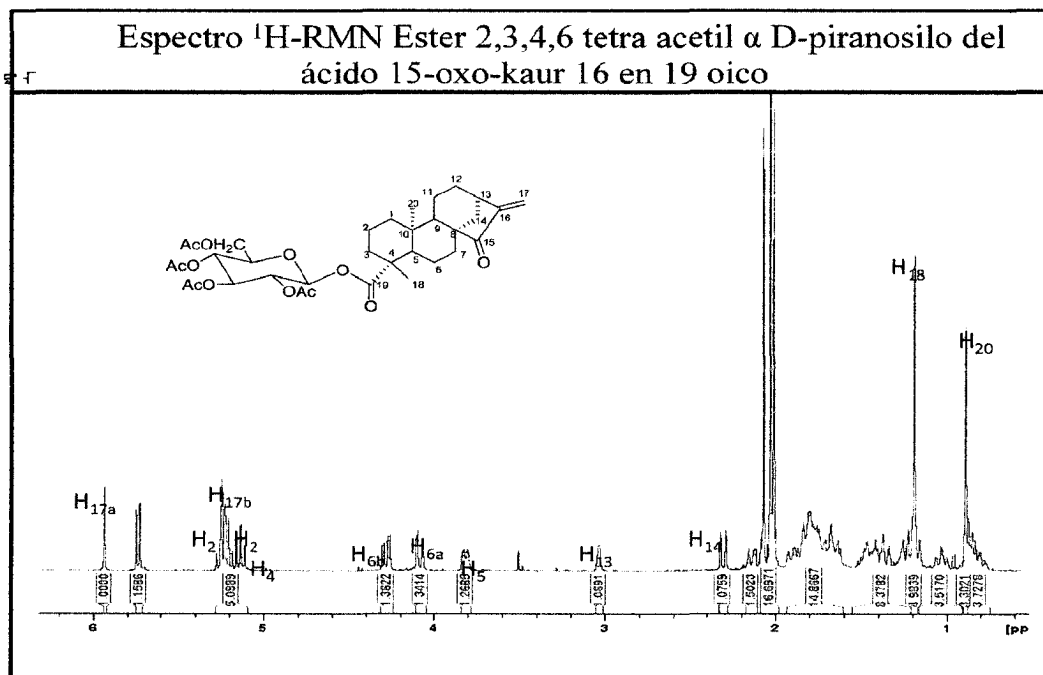
Figura 28: Correlación de los protones del ácido 15, 16-epoxi 17 acetoxi kauran 19 oico

En el espectro HMBC se observa la correlación de los protones de C-22 con el carbonilo 21, a dos enlaces y también los protones de C-17 con el carbonilo 21 a tres enlaces, lo cual corrobora la presencia del acetato sobre C-17. Aparte podemos observar la correlación de los protones del C-18 a tres enlaces con el carbonilo 19.

I.3.10.- Ester 2,3,4,6 tetra acetil α D-piranosilo del ácido 15-oxo-kaur 16 en 19 oico

Tabla 27: Ester 2,3,4,6 tetra acetil α D-piranosilo del ácido 15-oxo-kaur 16 en 19 oico

Producto	Ester 2,3,4,6 tetra acetil α D-piranosilo del ácido 15-oxo-kaur 16 en 19 oico
Estructura	
Formula Molecular	$C_{34}H_{46}O_{12}$
Peso Molecular	646,72 g/mol
Solubilidad	Metanol
Punto Fusión	98-100 °C
Características físicas	Sólido traslúcido e inodoro



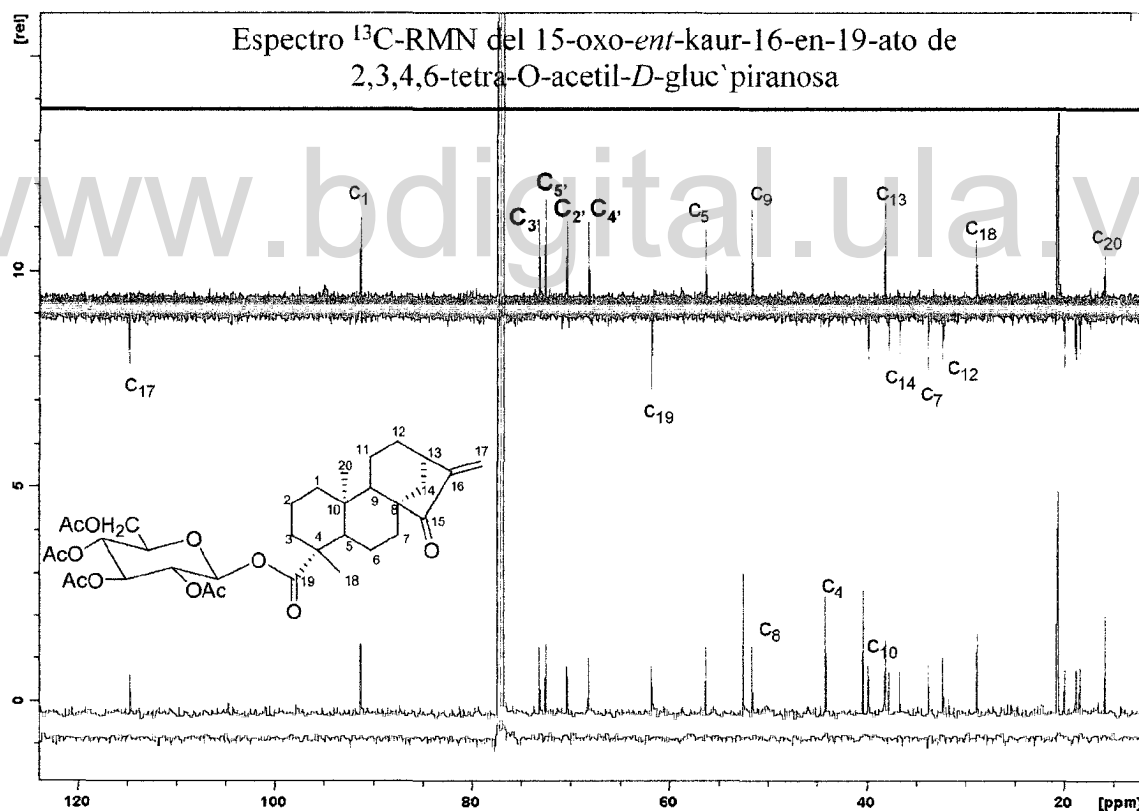
Espectro de RMN ^1H del Ester 2,3,4,6 tetra acetil α D-piranosilo del ácido 15-oxo-kaur 16 en 19 oico

Tabla 28: Desplazamientos químicos (δ) en el espectro de RMN- ^1H del Ester 2,3,4,6 tetra acetil α D-piranosilo del ácido 15-oxo-kaur 16 en 19 oico

	H-1	H-5	H-11	H-13	H17a H17b	H-18	H-20
δ	0,79 -1,65	1,16	1,67	3,04	5,93 - 5,25	H	0,98
m	m	m	t	s ancho	s ancho	s	S
H	H-1'	H-2'	H-3'	H-4'	H-5'	H-6'	CH ₃ COO-
δ	5,74	5,24	4,25	5,14	3,81	4,07- 4,24	≈2,05
m	d	t	t	t	m	dd	

En el espectro de RMN- ^1H , se puede diferenciar el desplazamiento de los hidrógenos olefinicos a δ 5,93 y 5,25 (H-17^{a,b}, 1H, s) típicos de una conjugación con un carbonilo adyacente, de la misma manera se observa un desplazamiento a bajo campo del hidrógeno sobre el C-13, a δ 3,04 (H₁₃, 1H, s ancho).

Se observa a bajo campo la señal correspondiente al hidrogeno anomérico a δ 5,74 (H₁, 1H, *d*, J=Hz), un grupo de señales ubicadas entre δ 5,10 - 5,30 que corresponden a los hidrógenos ubicados sobre los metínos de la glucosa protegida (H₃, H₂ y H₄), una señal a δ 4,05 y 4,28 (H₆, 2H, *dd*) que corresponde a los hidrógenos geminales que están sobre el metileno de la glucosa protegida y entre 4,72 y 4,78 ppm las señales correspondientes al doble enlace exocíclico del ácido *ent*-kaurénico (H-17^{a,b}, 2H, *dd*).



Espectro de RMN ¹³C del Ester 2,3,4,6 tetra acetil α D-piranosilo del ácido 15-oxo-kaur 16 en 19 oico.

Tabla 29: Desplazamientos químicos (δ) en el espectro de RMN ^{13}C del Ester 2,3,4,6 tetra acetil α D-piranosilo del ácido 15-oxo-kaur 16 en 19 oico.

C	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10
δ	39,9	19,0	37,8	44,2	56,3	20,0	33,8	52,6	51,6	40,4
Tipo	$>\text{CH}_2$	$>\text{CH}_2$	$>\text{CH}_2$	$>\text{C}<$	$>\text{CH}$	$>\text{CH}_2$	$>\text{CH}_2$	$>\text{C}<$	$=\text{C}<$	$>\text{C}<$
C	C-11	C-12	C-13	C-14	C-15	C-16	C-17	C-18	C-19	C-20
δ	18,5	32,4	38,2	36,7	210,0	149,5	114,7	28,9	175,6	16,0
Tipo	$=\text{C-H}$	$>\text{CH}_2$	$>\text{CH}$	$>\text{CH}_2$	$\text{O}=\text{C}<$	$=\text{C}<$	$>\text{CH}_2$	COO	$-\text{CH}_3$	CH_3

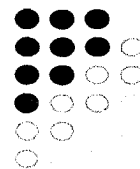
C	C-1'	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'	C-6'	$\text{CH}_3\text{COO}-$	$\text{CH}_3\text{COO}-$
δ	91,3	70,4	73,2	68,3	72,6	61,8	$\approx 20,8$	$\approx 170,0$
Tipo	$>\text{CH}$	$>\text{CH}$	$>\text{CH}$	$>\text{CH}$	$>\text{CH}$	$>\text{CH}_2$	CH_3	$\text{O}=\text{C}<$

Igualmente en el espectro RMN- ^{13}C se observa la señal correspondiente a un carbono carbonílico a δ 217,1 (C₁₅ identificado en HMBC) y desplazamiento a bajo campo del C₁₃ δ 38,2 lo cual permite identificar el grupo carbonilo. Igualmente en el espectro se observa la señal correspondiente al carbono anomérico a δ 91,1 (C₁), las señales correspondientes a los grupos carbonilo de los acetatos se observan entre δ 169,1 y 170,5 y las señales de los metilos de los grupos acetato aparecen a δ 20,7 y 20,5. Estos datos permiten identificar el compuesto como el 15-oxo-*ent*-kaur-16-en-19-ato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-glucopiranososa.

Tabla 30: Desplazamientos químicos de ^{13}C de los compuestos ácido kaurénico (I), ácido grandiflorénico (II), ácido 15 α -hidroxi-kaur-16-en-19-oico (III), ácido 15 α -acetoxi-kaur-16-en-19 oico (IV), ácido 16 α hidroxi kauran 19 oico (VI), kaurenol (VII), acetato de kaurenol (VIII), ácido 15, 16 epoxi-17-acetoxi-kauran-19 oico (IX), Ester 2,3,4,6 tetra acetil α -D-piranosilo del ácido 15-oxo-kaur-16-en-19 oico (X) obtenidos y modificados de *Coespeletia moritziana*.

	I	II	III	IV	VI	VII	VIII	IX	X
1	40,7	40,7	40,6	40,5	41,3	40,5	40,3	40,8	39,9
2	19,1	19,1	19,0	18,9	18,3	18,3	18,2	19,1	19,0
3	37,7	37,7	37,8	37,6	37,4	35,7	36,3	32,0	37,8
4	43,2	43,2	43,6	43,6	42,5	38,7	37,1	43,9	44,2
5	57,0	57,0	57,0	56,7	55,7	56,9	56,8	56,8	56,3
6	21,8	21,8	20,9	20,7	21,6	20,5	20,4	20,9	20,0
7	41,3	41,3	35,1	34,7	39,6	41,7	41,5	35,7	33,8
8	44,2	44,2	47,7	47,4	44,2	44,2	44,1	43,4	52,6
9	55,1	155,1	53,3	52,8	55,0	56,2	56,2	49,3	51,6
10	39,7	39,7	39,8	39,8	38,6	39,3	39,2	39,6	40,4
11	18,4	114,9	18,2	18,3	18,0	18,2	18,2	18,4	18,5
12	33,1	33,1	32,5	32,6	25,9	33,2	33,1	26,5	32,4
13	43,8	43,8	42,2	42,4	47,2	44,0	43,9	35,8	38,2
14	39,7	39,7	36,2	37,1	37,2	39,7	39,6	37,4	36,7
15	48,9	48,9	82,8	83,0	56,8	49,1	49,0	65,2	210,0
16	155,8	158,5	160,3	155,4	76,7	155,9	155,8	62,2	149,5
17	103,0	103,0	108,7	110,0	24,6	103,0	103,0	62,3	114,7
18	29,0	29,0	28,9	28,9	28,9	27,1	27,6	29,1	28,9
19	184,9	184,9	183,2	183,7	179,3	65,6	67,2	183,8	175,6
20	15,6	15,6	15,8	15,8	15,5	18,1	18,2	15,4	16,0
21				171,1			171,4	171,1	
22				21,3			21,0	207,0	

Capítulo II



www.bdigital.ula.ve

*Actividad citotóxica sobre
células tumorales y células
no tumorales*

II.- ACTIVIDAD CITOTOXICA SOBRE CÉLULAS TUMORALES Y CÉLULAS NO TUMORALES

II.1.- INTRODUCCION

La búsqueda de nuevos agentes terapéuticos sintéticos y de origen natural para combatir una serie de enfermedades como cáncer y SIDA se ha convertido en una preocupación que deriva en un esfuerzo emprendido por instituciones universitarias y compañías farmacéuticas a nivel mundial. Las plantas son una fuente importante en la búsqueda de fármacos para el tratamiento de una serie de enfermedades. Por ello es necesario desarrollar ventajas competitivas en la industrialización de productos naturales a través de alianzas entre universidades, empresas, gobiernos e instituciones nacionales y extranjeras, y emprender esfuerzos para lograr avances en la Investigación y Desarrollo, a fin de cubrir nuevas demandas en el mercado nacional e internacional con especies promisorias, generando productos o procedimientos que cumplan con los requisitos de: a) novedad, b) nivel inventivo y c) aplicabilidad industrial (Torres, 2004).

Los métodos de cultivos de células y tejidos *in vitro*, se emplean cada vez con mayor frecuencia en el estudio de compuestos, teniendo en cuenta el código de ética animal y con la finalidad de evaluar mecanismos de acción, aunque su valor es limitado (Freshney, 2000; Morgan y Darling; 1995).

Desde que se identificó el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) como el agente causal del SIDA (Barre-Sinoussi *et al*, 1983; Gallo *et al*, 1984), la búsqueda de tratamientos efectivos en la prevención y desarrollo de esta enfermedad ha sido el principal objeto de estudio. Los productos naturales también han contribuido al descubrimiento de agentes anti VIH-1 (Colegate y Molyneux, 2000), mediante sondeos o screenings masivos biodirigidos. Como resultado de dichos estudios, a la fecha se ha logrado identificar más de 60 productos naturales anti VIH (Vlietnick, 1998) que no sólo proporcionan entidades químicas potencialmente

útiles en el tratamiento del SIDA, sino que además constituyen moldes para el diseño de nuevos fármacos.

Las estrategias científicas para la evaluación *in vitro* de productos naturales con actividad biológica han cambiado con el paso de los años; un desarrollo reciente es la investigación altamente automatizada de las pruebas biológicas basadas en métodos colorimétricos que cuantifican la proliferación de los cultivos celulares (Mosmann, 1983; Denizot, 1986). Estas técnicas consideradas rápidas y económicas para la evaluación antitumoral (Carmichael *et al.*, 1987) y antiviral (Weislow *et al.*, 1989) de una gran cantidad de extractos de productos naturales; permiten fácilmente dirigir el aislamiento y purificación de los principios activos (Cordell, 1995). Diversos procesos moleculares en el ciclo viral han sido identificados como blanco de acción de posibles fármacos como: las enzimas transcriptasa reversa (TR), proteasa (PR) e integrasa (IN) (Huang, 1997), así como proteínas involucradas en la adhesión y fusión del virus (Blair *et al.*, 2000). La TR es una enzima esencial en la replicación del VIH, ya que transcribe el material genético del virus constituido por una cadena sencilla de RNA en una cadena doble de DNA (Turner, 1999).

El Cáncer se define como un conjunto de enfermedades en que las células dañadas genéticamente proliferan de forma autónoma. Estas células no pueden responder a los mecanismos reguladores normales para asegurar la cooperación intercelular que se requiere en los organismos multicelulares. Por consiguiente, continúan proliferando y de esta forma robando a las células normales los nutrientes y finalmente invadiendo los tejidos sanos de los alrededores. Dependiendo del daño originado, las células anormales pueden formar tumores benignos o malignos. Los tumores benignos que son de crecimiento lento y limitado a una localización específica no se consideran cancerosos y en pocas ocasiones producen la muerte. Por el contrario, los malignos suelen ser fatales debido a que pueden experimentar metástasis (las células cancerosas emigran a través de la sangre o vasos linfáticos a lugares distintos del cuerpo). Al surgir los

nuevos tumores malignos, interfieren con las funciones normales y cuando los procesos que mantienen la vida fallan, los pacientes mueren.

El descubrimiento de nuevos agentes con actividad anticáncer se ha convertido en una de las metas de la investigación científica moderna; la molécula ideal para este fin debe eliminar ó incapacitar una variedad importante de subpoblaciones celulares de un tumor sin afectar en lo posible las del tejido normal (Huang, 2001).

Los científicos han desarrollado metodologías para aislar células y obtener poblaciones celulares homogéneas, que luego pueden ser incluso mantenidas y multiplicadas *in vitro* ("en vidrio" = en recipientes especiales, en el laboratorio). Los cultivos celulares son esenciales en la investigación científica, ya que permiten estudiar los procesos que ocurren en las células, y en diversas aplicaciones de la biotecnología, como la producción de moléculas de interés industrial, ingeniería de tejidos, entre otras.

La mayoría de las células animales y vegetales aisladas pueden vivir, multiplicarse, e incluso presentar ciertas propiedades diferenciales, si se las cultiva en placas de plástico y con medios adecuados. Así, las células pueden ser observadas continuamente bajo el microscopio o analizadas bioquímicamente, para estudiar los efectos del agregado o remoción de moléculas específicas, como hormonas o factores de crecimiento.

Estas células que se han adaptado a vivir en cultivo, pueden dividirse en dos tipos principales: las adherentes (células en monocapa) que se fijan al material plástico de un frasco o una placa, y las que provienen de cultivos primarios con requerimiento de anclaje a superficies, tienen la propiedad de crecer de manera estacionaria o en suspensión después de un período de adaptación.

Células mononucleares

El primer paso de numerosos análisis inmunológicos y de viabilidad celular es el aislamiento de la fracción "mononuclear", es decir, linfocitos y monocitos, de sangre periférica.

El método de aislamiento más utilizado se fundamenta en las diferentes densidades que presentan cada uno de los tipos celulares de la sangre.

Para conseguir la separación, la muestra de sangre se deposita sobre un líquido de densidad 1.077 g/ml, denominado Lymphopreparado o Isolymp, y se centrifuga para acelerar la separación. El Lymphopreparado está compuesto por ficoll y metrizoato sódico. El ficoll aglutina los eritrocitos, de manera que aumenta su velocidad de sedimentación. El metrizoato sódico es el compuesto que da la densidad adecuada. El objetivo de este procedimiento es aislar la fracción linfomonocitaria de una muestra de sangre anticoagulada.

CÉLULAS EPITELIALES

Células VERO

El linaje Vero fue aislado de las células epiteliales de riñón de mono africano verde (*Chlorocebus sp.*; anteriormente llamado *Cercopithecus aethiops*, este grupo de monos ha sido dividido en varias especies). La línea celular fue desarrollada el 27 de Marzo de 1962, por Yasumura y Kawakita en la Universidad Chiba en Chiba, Japón.

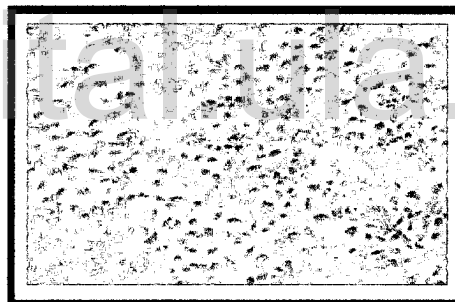


Figura 29: de células Vero en cultivo

Células HeLa

Las células HeLa constituyen una línea de células epiteliales humanas procedentes de un carcinoma cervical, y las primeras células humanas de las cuales se estableció una línea celular permanente. En 1951 se practicó una operación quirúrgica a la paciente Henrietta Lacks (de ahí el nombre), una mujer afroamericana de 31 años, en la cual se extrajeron células de un carcinoma en el útero con la intención de evaluar su malignidad. (Sharrer T, 2006).

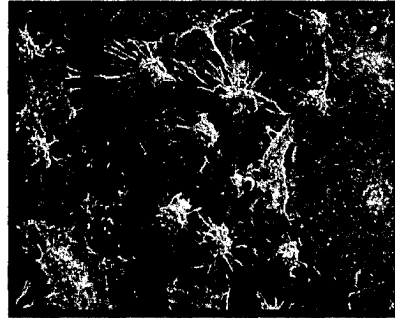


Figura 30: Células HeLa, obtenidas del cuerpo de Henrietta Lacks

Células A-549

Línea celular originada a partir de tejido carcinomatoso de pulmón proveniente de un hombre adulto.

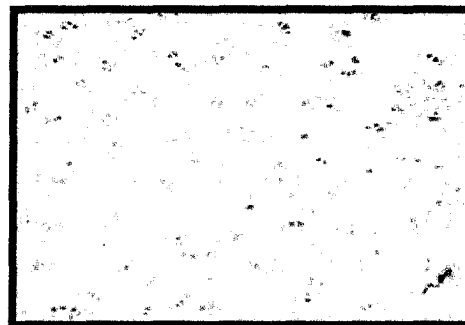


Figura 31: Imagen de células A-549
Línea celular continúa tipo epitelial

Células MCF-7

Es una línea de célula de cáncer de mama aislada en 1970 de una mujer caucásica de 69 años. MCF-7 es la sigla de la Fundación de Cáncer de Michigan.

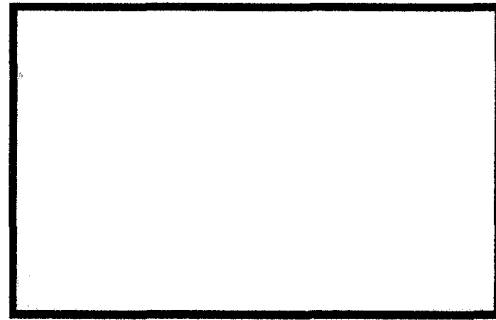


Figura 32: Imagen de células MCF-7

www.bdigital.ula.ve

II.2.- MATERIALES Y METODOS

II.2.1.- Soluciones de trabajo

▼ Rojo Fenol 1%

COMPONENTE	CANTIDAD
Rojo Fenol	1,0 g
NaOH 0,1 N	32,5 mL
Agua destilada hasta	100 mL

La solución se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos y se almacenó a 4 °C.

▼ Tampón fosfato salino (PBS) 10X

COMPONENTE	CANTIDAD
NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄ × 12H ₂ O	28,96 g
KH ₂ PO ₄	2 g
Agua destilada hasta	1000 mL

La solución se esterilizó por filtración a través de filtros Millipore de 0,45 µm de diámetro de poro y se almacenó a 4°C.

▼ Tampón fosfato salino (PBS) 1X

COMPONENTE	CANTIDAD
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ × 12H ₂ O	2,9 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Agua destilada hasta	1000 mL

La solución se esterilizó por filtración a través de filtros Millipore de 0,45 µm de diámetro de poro y se almacenó a 4°C.

▼ Tripsina 0,25%

COMPONENTE	CANTIDAD
Tripsina	2,50 g
Glucosa × 1H ₂ O	1,10 g
Rojo Fenol 1%	1,50 mL
PBS 10X	100 mL
Agua destilada hasta	1000 mL

La solución se ajustó a pH 7,4 con NaOH (0,1N), se esterilizó por filtración a través de filtros Millipore de 0,45 μm de diámetro de poro y se almacenó a -20°C .

▼ **EDTA 0,02%**

COMPONENTE		CANTIDAD
EDTA		0,2 g
PBS 10X		100 mL
Rojo Fenol 1%		1,5 mL
Agua destilada	hasta	1000 mL

La solución se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos y se almacenó a -20°C .

II.3.- ENSAYO CITOTÓXICO CON CELULAS MONONUCLEARES

II.3.1.1.- Aislamiento de las células mononucleares (CMSP).

Las células mononucleares humanas de sangre periférica (CMSP) fueron obtenidas de sangre periférica de un donante sano, por venopunción en el antebrazo. La alícuota fue diluida v/v con una solución buffer fosfato salina (PBS) y sometida a separación lenta para la obtención de los linfocitos (ficoll-hypaque) (Milteniyi *et al*, 1990; Hansel *et al*, 1991), centrifugadas a 2000 rpm durante 30 min a 18°C . Transcurrido este tiempo se extrajo la capa media de la separación resultante, la cual contenía las CMSP. Las células fueron lavadas 3 veces con PBS y centrifugadas (1300 rpm por 10 min a 18°C). Después del último lavado se resuspendieron en 5 ml de medio de cultivo MEM (Medio Esencial Mínimo) suplementado con 5% de suero bovino fetal (SFB) y antibióticos (penicilina-estreptomicina, Sigma).

Las células fueron resuspendidas en medio hasta lograr una concentración final de 2×10^6 cel/mL y 100 μL de esta suspensión celular fue colocada en cada pozo de una placa de poliestireno de 96 pozos de fondo plano e incubadas durante 48 horas a 37°C , en atmósfera húmeda con 5% CO_2 , con las concentraciones de 0.05, 0.5, 5, y 50 $\mu\text{g/mL}$ por compuestos.

Finalizado el período de incubación se determinó la viabilidad celular por el método de exclusión con el colorante trypan blue (Freshney, 1987, Coligan *et al*, 1995). El azul tripán es un colorante vital, soluble en agua, altamente tóxico, que se introduce en el interior de las células que presentan ruptura o daño en la membrana plasmática. Las células que aparecen en el microscopio, de color azul, son consideradas no viables. Sin embargo, las células vivas son capaces de excluir activamente este colorante, y, por tanto, mantienen su color original translúcido o blanco (Rosales, 2008).

Se tomaron 100 μ L de cultivo celular, el cual se colocó en un tubo de tipo eppendorf de 1,5 mL con un volumen equivalente (100 μ L) de solución de azul tripán al 0,4% (Sigma-Aldrich) y se incubaron durante aproximadamente unos 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se tomó una muestra de 10 μ L de la mezcla y se colocó sobre una cámara de Neubauer, se procedió al recuento de las células vivas (blancas) y muertas (azules) utilizando un microscopio invertido.

Para el cálculo del porcentaje de células vivas se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de células vivas}}{\text{N}^{\circ} \text{ de células vivas} + \text{N}^{\circ} \text{ células muertas}} \times 100$$

El volumen celular en el cual se han contado las células resulta de multiplicar la profundidad de la cámara por el factor de dilución, la superficie de los cuadrados y el número de cuadrados contados. Se comparó con el grupo control negativo (100 μ L de medio y 100 μ L de suspensión celular) y un blanco, (200 μ L medio solamente). Cada ensayo fue realizado por triplicado.

III.3.1.- Preparación de las muestras de derivados del *ent*-kaureno:

Para el ensayo se preparó una solución madre de 40000 ppm de cada uno de los kaurenos ácido kaurénico (I), ácido grandiflorénico (II), ácido 15 α -hidroxi-kaur-16-en-19 oico (III), ácido 15 α -acetoxi-kaur-16-en-19 oico (IV), ácido 16 α -hidroxi kauran-19 oico (VI), kaurenol (VII), acetato de kaureno (VIII), ácido 15, 16-epoxi-17

acetoxi-kauran 19 oico (IX), Ester 2,3,4,6 tetra acetil α -D-piranosilo del ácido 15 oxo- kaur-16-en-19 oico (X), las soluciones madres fueron esterilizadas en filtros millipore de 0.22 μ m y colocados en tubos falcón estériles a partir de las cuales se realizaron las diluciones correspondientes para los ensayos.

II.4.- ENSAYO CITOTÓXICO CON LINEAS CELULARES ESTABLECIDAS

Las células empleadas para llevar a cabo estos experimentos procedieron de líneas celulares establecidas a partir de carcinoma epitelial de cuello de útero humano (HeLa), carcinoma de pulmón humano (A-549), y de cáncer de mama (MCF-7) y la línea celular no tumoral de riñón de mono verde africano (Vero). Todas las células se cultivaron en monocapa en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Media) suplementado con un 10% de suero bovino fetal (D-10%) inactivado a 56 °C durante 30 minutos, 4 mM de L-glutamina, 0,2 mg/mL de antimicótico (ácido p-hidroxi benzoico butil éster) y una mezcla de antibióticos (100 UI/mL de penicilina y 100 μ g/mL de estreptomycin). Los cultivos celulares se incubaron en todos los casos en condiciones estables de temperatura (37 °C), con una humedad relativa del 98% y una presión parcial de CO₂ del 5%.

Cuando los cultivos en monocapa alcanzaron una confluencia del 80-90%, con una densidad que no debía ser mayor de 10⁶ células/mL, se lavaron con EDTA, se incubaron con una solución de tripsina (al 0,05% en EDTA) durante 3 minutos y se levantaron con ayuda de una pipeta Pasteur. Luego de mezclarlas con DMEM para inactivar la tripsina, se centrifugaron a 300g en una centrifuga de mesa (Labofuga 200, Heraeus) durante 5 minutos y se resuspendieron en el volumen de medio adecuado para sembrarlas diluidas en nuevas placas. Todas las líneas se duplican aproximadamente cada 24 horas y fueron transferidas dos veces por semana.

La conservación de las líneas celulares se llevó a cabo en nitrógeno líquido y en presencia del agente crioprotector DMSO al 7% en suero bovino fetal o en DMEM con una concentración de suero del 20%. El DMSO, disminuye el choque osmótico

causante del daño celular en el proceso de congelación, debido a su propiedad de difundir rápidamente dentro y fuera de las células (Lovelock, Bishop, 1959).

El proceso de congelación fue gradual, de manera que se mantuvieron dos horas a -20 °C, un día a -70 °C, para seguidamente ser introducidas en tanques de nitrógeno líquido.

La descongelación de los criotubos se realizó en un baño a 37 °C, vertiendo el contenido lentamente, para evitar cambios bruscos en las condiciones osmóticas, sobre un volumen de medio con suero. Se centrifugó a 300 giros y el pellet obtenido se resuspendió en 1 mL de medio para ser subcultivadas en el medio habitual.

Análisis de la viabilidad celular sobre líneas celulares establecidas

El efecto de los kaurenos sobre la proliferación celular se determinó por el método colorimétrico de Mosman (Mosman, 1983), que está basado en la capacidad que poseen las células vivas de reducir el MTT (reducción del Bromuro de 3 (4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico) en un derivado de formazán insoluble, por medio de la succinato deshidrogenasa existente en la mitocondria.

Los ensayos se realizaron sobre células proliferantes, para lo cual placas de 96 pozos de fondo plano fueron sembradas con las células adherentes (1×10^4 células/pozo) en medio DMEM (medio de cultivo de Dubelco) con suero al 5% e incubadas 24 horas. Seguidamente, el medio fue succionado y sobre 2×10^4 células/pozo se depositaron 200 μ L de los productos a ensayar a concentraciones de 40, 20, 10, 5, 1 y 0,1 μ M, disueltos en el mismo medio.

Como control negativo, se utilizaron pozos carentes de los compuestos a ensayar y con DMSO a una concentración equivalente a la máxima utilizada en los cultivos problema, sin que nunca se superara el 0,8% (v/v). Pozo que contenían sólo medio de cultivo fueron utilizados como blanco control. La actinomicina D[®] y mercaptopurina[®], fueron usados como controles positivos.

Tras 48 horas de incubación se determinó la tasa de supervivencia celular, para lo cual, se añadió 20 μ L de solución de MTT en cada pozo, se incubó durante 3

horas y después de eliminar el medio por aspiración, 150 μL de DMSO fue añadido para disolver los cristales de formazán formados por las células vivas.

La densidad óptica del color desarrollado se midió en un espectrofotómetro ELISA (Infinite M200, Tecan) a una longitud de onda de 550 nm y los resultados fueron expresados como CI_{50} (concentración requerida para reducir el número de células viables al 50%) en μL . Todos los ensayos fueron realizados por duplicado (Tomado de Araujo 2011).

Se realizaron ensayos sobre las células en fase inicial de crecimiento. Para ello, 200 μL de los compuestos diluidos en medio a la concentración de 80 μM , que correspondía al doble de la necesaria para iniciar el ensayo, se depositaron en los pozos correspondientes y en los restantes se añadieron 100 μL de medio para realizar diluciones sucesivas a mitades. Las placas fueron inoculadas con 2×10^4 células/pozo para todas las líneas celulares. Después de incubadas las células por un tiempo de 48 horas, se determinó la viabilidad celular, descrita anteriormente.

II.5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El uso de agentes químicos citotóxicos que destruyan las células cancerosas ha constituido la gran esperanza en el tratamiento del cáncer desde hace varias décadas. Los agentes quimioterápicos aceptables deben actuar con una cierta especificidad que permita una ventana terapéutica, es decir una situación en que la dosis empleada suponga más beneficio que efectos secundarios tóxicos. Así, el ensayo inicial más común de la actividad anticancerígena de un compuesto o extracto es su capacidad para inhibir el crecimiento de células tumorales en cultivo (Muñoz, 1997).

II.5.1.- ENSAYO CITOTÓXICO CON CELULAS MONONUCLEARES

Las células mononucleares, presentes en la sangre, son muy susceptibles al efecto de una gran variedad de estímulos como las radiaciones, bacterias y compuestos. En vista a esta característica, se seleccionó este sistema para evaluar el efecto tóxico de los kaurenos y sus derivados determinando las IC_{50} obtenidas en estudio por el método de exclusión con el colorante trypan blue (Coligan *et al.*, 1995), a una concentración máxima de 170 μM .

En la **tabla 31** se observan los valores de IC_{50} (dosis a la que el cultivo tratado mata o deja viva el 50% de las células estudiadas) obtenidos de los compuestos a las diferentes concentraciones estudiadas.

Tabla 31: Actividad citotóxica (IC_{50}) de los kaurenos frente a células mononucleares de sangre periférica humanas (CMSP)

Compuestos		CMSP
		IC_{50} (μM)
I	ácido kaurénico	>170
II	ácido grandiflorénico	62,5
III	ácido 15 α -hidroxi-kaur 16 en 19 oico	75,08
IV	ácido 15 α -acetoxi-kaur 16 en 19 oico	44,94
V	ácido kauránico	7,61
VI	ácido 16 α hidroxi kauran 19 oico	93,68
VII	kaurenol	24,02
VIII	acetato de kaurenol	>170
IX	ácido 15, 16 epoxi 17 acetoxi-kauran 19 oico	33,78
X	Ester 2,3,4,6 tetra acetil α -D-piranosilo del ácido 15 oxo- kaur 16 en 19 oico	61,85

Se compararon los IC_{50} obtenidos de los kaurenos y se pudo observar que para el ácido kaurénico su IC_{50} está por encima de la concentración máxima estudiada, característica presentada también para el acetato de kaurenol, es importante destacar que estos compuestos poseen muy baja toxicidad sobre células mononucleares, lo que motivó a ensayarlas sobre células tumorales establecidas. En cambio, las IC_{50} encontradas en el ácido kauránico (7,61) indica que es muy tóxico, afectando las células mononucleares, razón por la cual no se le realizó estudios de citotoxicidad sobre las líneas celulares cancerígenas. Haciendo referencia en el concepto de estructura privilegiada y de la relevancia de los productos naturales como cabeza de serie para generar nuevas moléculas bioactivas contra el cáncer, un fármaco anticancerígeno satisfactorio debe matar o incapacitar las células cancerígenas sin causar excesivo daño a las células normales.

Por otro lado se observa que el IC_{50} del ácido 16 α hidroxi kauran 19 oico está por encima de la mitad de la concentración máxima estudiada. (93,68) mientras que el

resto de los kaurenos sus IC₅₀ se encuentran por debajo de la mitad de la concentración estudiadas presentando una leve toxicidad sobre las células mononucleares.

Analizando los resultados obtenidos en este trabajo, se debe tomar en cuenta los IC₅₀ obtenidos, ya que se podría considerar de qué se tratan de células mononucleares que fueron obtenidas de un paciente sano y no de células comerciales que han sido manipuladas y que han disminuido o aumentado su grado de similitud entre el tejido tumoral y la línea celular.

No existe una referencia bibliográfica que establezca un patrón en la selección de las concentraciones a estudiar. Sin embargo, se tomó, para este ensayo con células mononucleares un valor máximo de 170 µM, para compuestos puros, y que ha sido utilizado en el Laboratorio de Investigaciones en Cultivos Celulares de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes, en donde se llevó a cabo este ensayo por los investigadores Doctora Grecia Mendez de Corao y el Doctor José Cova.

II.5.2.- ENSAYO CITOTÓXICO CON CELULAS ESTABLECIDAS DE CARCINOMA

La citotoxicidad del ácido kaurénico y sus derivados fue evaluada frente a las líneas celulares establecidas de carcinoma epitelial de cuello de útero humano (HeLa), carcinoma de pulmón humano (A-549), cáncer de mama (MCF-7), y una línea celular no tumoral de riñón de mono verde africano (Vero) en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad de La Laguna- España, por la Doctora María Eugenia Lucena de Ustariz a cargo de la Doctora Laila Moujir Moujir y la Doctora Liliana Araujo.

Son muchos los trabajos en donde se han reportado la actividad citotóxica de derivados del *ent*-kaureno, como Fujita *et al.*, 1988; Sun *et al.*, 1994; Kondoh *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2004; Ruiz *et al.*, 2008 y Hueso-Falcón *et al.*, 2010. (Tomado y modificado de la Tesis Doctoral de Carrillo, 2011).

De las hojas de *Laetia thamnina*, una flacourtiaceae, Henry y sus colaboradores en el 2006, lograron aislar ácido kaurénico, ácido *ent*-3- β -hidroxi-kaur-16-eno, ácido *ent*-kaur-16-en-3 α -19-diol y ácido *ent*-17-hidroxi-kaur-15-en-19-oico, para luego probar su actividad citotóxica frente a varias líneas celulares, tales como: 22Rv1, LNCap (Cáncer de próstata), HT29, HCT116, SW620, SW480 (Cáncer de colon) y la MCF-7 (Cáncer de mama) logrando determinar que todos estos compuestos presentaron cierta actividad citotóxica a concentraciones máximas inhibitorias al 50% (IC₅₀) que van desde 6 a 50 μ g/mL. Sin embargo, en este grupo de *ent*-kaurenos, dos compuestos fueron altamente activos contra la línea celular de Cáncer de próstata LNCaP, el ácido *ent*-3- β -hidroxi-kaur-16-eno con una IC₅₀ de 12,83 μ g/mL y el ácido *ent*-17-hidroxi-kaur-15-en-19-oico con una IC₅₀ de 17,63 μ g/mL

Morales y colaboradores en el 2005, reportaron que el ácido *ent*-16 β -17-dihidroxi-kaurano aislado de la corteza del *Croton malambo* (Euphorbiaceae) posee actividad citotóxica sobre la línea celular tumoral MCF-7(Cáncer de mama), con IC₅₀ de 12.5 μ g/mL.

Como puede observarse en la **Tabla 32**, el compuesto ácido 15-oxo-*ent*-kaur-16-en-19-oico presentó una IC₅₀ \leq 9 μ M frente a las tres líneas celulares cancerosas estudiadas pero también sobre la célula no tumoral Vero. Hueso-Falcón y colaboradores en el 2011, reportan a este compuesto pero con su ácido carboxílico metilado, como no tóxico en células no tumorales.

El ácido kaurenico resultó ser activo frente a las líneas celulares HeLa (23,03 μ M), A-549 (20,63 μ M) y Vero (23,13 μ M) pero no frente a la célula MCF-7 (>40 μ M), corroborando lo encontrado por Morales y colaboradores en el 2005. Otro compuesto interesante resultó ser el ácido grandiflorénico que mostró una moderada actividad frente a las cuatro líneas celulares. Con respecto al derivado glucosídico, sólo se observó una leve actividad contra las HeLa (30,2 μ M) y A-549

(34,3 μM). El Kaurenol mostró una actividad moderada (CI_{50} de 28,17 μM) frente a la línea celular A-549.

Tabla 32: Actividad citotóxica (CI_{50} , μM) de 8 diterpenoides frente a líneas celulares tumorales y células Vero incorporadas en fase inicial de crecimiento y cultivadas durante 48 horas.

	HeLa	MCF-7	A-549	Vero
Acido kaurénico	23,03	>40	20,63	23,13
Acido grandiflorénico	21,47	36,7	35,3	33,69
15 α hidroxikaurénico	>40	>40	>40	NE
15 α acetoxikaurénico	>40	>40	>40	NE
16, 17 epoxikaurénico	>40	>40	>40	NE
Acido 15-oxo-<i>ent</i>-kaur-16-en-19-oico	4,65	2,13	8,90	6,23
Ester glucosídico del ácido kaurénico	30,2	>40	34,3	NE
kaurenol	>40	38	28,17	>40
Actinomicina D (control positivo)	$1,1 \times 10^{-3}$	$7,2 \times 10^{-3}$	$2,4 \times 10^{-3}$	$7,1 \times 10^{-2}$
Mercaptopurina (control positivo)	2,9	47,0	1,4	67,6

NE: no ensayados. Los datos representan la media de tres determinaciones

Todos estos resultados, llevan a deducir que el núcleo de los *ent*-kaurenos con sus sustituyentes claves como lo es el grupo ácido en C-19 y la posición del doble enlace entre los C-16 y C-17, son piezas importantes para el mejoramiento de su actividad citotóxica, un sustituyente como el hidroxilo en la posición C15, no favorece la actividad del compuesto, sin embargo un grupo ceto en dicha posición aumenta la actividad citotóxica.

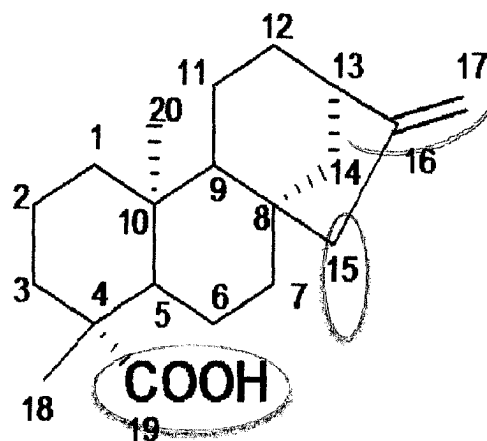


Figura 33: Relación estructura actividad citotóxica

Tabla 33: Correlación de los IC_{50} y el Índice de selectividad (IS) de los compuestos frente a las líneas celulares tumorales y las células Vero y CMPS en la fase inicial de crecimiento

Compuestos	Vero (μM)	MFC-7 (μM)			A-549 (μM)			HeLa (μM)		
	IC_{50}	IC_{50}	IS_{CMPS}	IS_{vero}	IC_{50}	IS_{CMPS}	IS_{vero}	IC_{50}	IS_{CMPS}	IS_{vero}
I	23,13	>40	NC	NC	20,63	13,28	1,121	23,03	11,89	1,00
II	33,69	36,7	0,026	0,917	35,3	0,027	0,954	21,47	0,04	1,569
III	NE	>40	NC	NC	>40	NC	NC	>40	NC	NC
IV	NE	>40	NC	NC	>40	NC	NC	>40	NC	NC
VII	>40	38	0,632	NC	28,17	0,852	1,41	>40	NC	NC
IX	NE	>40	NC	NC	>40	NC	NC	>40	NC	NC
X	NE	>40	NC	NC	34,3	1,803	NC	30,2	2,048	NC
XI	6,23	2,13	NC	2,92	8,90	NC	0,70	4,65	NC	0,75

Ácido kaurénico (I), ácido grandiflorónico(II), ácido 15 α -hidroxi-kaur 16 en 19 oico (III), ácido 15 α -acetoxi-kaur 16 en 19 oico (IV), kaurenol (VII), ácido 15, 16 epoxi 17 acetoxi-kauran 19 oico (IX), Ester 2, 3, 4,6 tetra acetil α -D-piranosilo del ácido 15 oxo- kaur 16 en 19 oico (X), ácido 15 oxo kaurénico (XI). NE: no estudiadas. NC= no calculada.

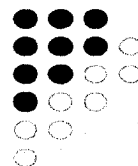
La Tabla 33 muestra la correlación de los IC_{50} y índice de selectividad (IS) de los compuestos obtenidos frente a líneas celulares tumorales (MCF-7, HeLa, A-549) y

no tumorales (Vero, CMSP). Se puede observar que el ácido kaurénico tiene un IS en células mononucleares de sangre periférica de 13,28 μM y 11,89 μM sobre las células tumorales A-549 y HeLa respectivamente. Sin embargo, cuando se calcula el IS para ambas líneas celulares tumorales pero utilizando a las células Vero, se pudo observar que disminuye prácticamente 10 veces el IS (A-549 1,12 μM y HeLa 1,0 μM). Esta diferencia significativa de valores puede deberse a que estas células Vero son células manipuladas, en cambio las CMSP son células nuevas extraídas de un paciente sano y directamente utilizadas sin previa manipulación.

Por otro lado, el ácido grandiflorénico y el ácido 15-oxo kaurénico presentaron un IS superior a 1 para las células HeLa 1,57 μM y para las MCF-7 de 2,92 respectivamente sobre las células no tumorales Vero.

Otro compuesto que presentó un IS sobre células mononucleares de sangre periférica interesante fue el ester 2, 3, 4,6 tetra acetil α -D-piranosilo del ácido 15 oxo- kaur 16 en 19 oico, con 1,80 μM para las células tumoral A-549 y de 2,048 μM sobre HeLa.

Capítulo III



www.bdigital.ula.ve

*Actividad Antibacteriana de
Los ent-kauranos*

III.- ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

III.1.- INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas el auge por las plantas medicinales se ha incrementado notablemente a nivel mundial. Por este motivo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) incentiva la obtención de los medicamentos a partir de los recursos naturales (Jevons, 1961).

Distintos tipos de extractos y aceites han sido utilizados a lo largo de la historia en forma empírica y constituyen la base de numerosas terapias homeopáticas, debido a las propiedades biológicas de sus compuestos que confieren una defensa antimicrobial, y la capacidad que presentan para corregir una patología en el organismo.

Los microorganismos son seres vivos de dimensiones microscópicas con propiedades estructurales y funcionales. Fueron observados por primera vez en 1676 por el biólogo Anton Van Leeuwenhoek, que empezó a describir las primeras formas de las bacterias. Por su similitud morfológica se formaron cuatro grupos: a) Los Cocos, que son de forma esférica, b) Los Bacilos, con una figura de pequeños bastones, c) Los Espirilos en forma de tirabuzón, con un eje helicoidal y d) Los Vibrios, ligeramente curvados y generalmente de gran movilidad. Una vez conocida la forma de las bacterias, se empezó a observar que se agrupan de forma muy particular, y así, se formaron otros grupos, como son: a) los estreptococos en forma de cadenas, b) los diplococos en pares, c) las tétradas en grupos de cuatro, d) las sarcinas en forma de cubos y e) los estafilococos en forma de racimos. Cuando se descubrió que las bacterias se teñían con colorantes surgió otro criterio de agrupación, su afinidad tintorial. Así, la tinción de Gram formó dos grandes grupos bacterianos: los Gram positivos, que se tiñen de color violeta y los Gram negativos, que se tiñen de color rojo. Otro criterio de clasificación surgió cuando se descubrió la forma de respiración de las bacterias, se las agrupó en: a) las bacterias aerobias estrictas, aquellas que requieren del oxígeno como último aceptor de electrones, b) las anaerobias estrictas, que utilizan sales inorgánicas en lugar del oxígeno para transferir electrones y que

además la presencia de oxígeno es nociva, ya que forman compuestos tóxicos para la bacteria; c) las aerobias y anaerobias facultativas, que pueden respirar en presencia y ausencia de oxígeno, ya que cuentan con sistemas enzimáticos que pueden activarse en cualquiera de estas situaciones. 100 años después el biólogo danés Otto Müller organizó las bacterias en géneros y especies, siguiendo los métodos de clasificación de Carlos Linneo. En 1840, el anatomopatólogo alemán Friedrich Henle propuso unos criterios para demostrar que los microorganismos eran responsables de la aparición de enfermedades en el ser humano, siendo confirmados estos criterios por Robert Koch y Louis Pasteur en los años 1870 y 1880 (Murray *et al*, 2006; Cabello, 2007).

El mundo descubierto por Leeuwenhoek era complejo y estaba formado por protozoos y bacterias de todas las formas y tamaños. Sin embargo, la complejidad de la microbiología médica actual se acerca al límite de la imaginación. Así en la actualidad se sabe que existen miles de diferentes tipos de microorganismos que viven en el interior, la superficie, o alrededor del ser humano, asimismo, pueden contarse los centenares que son capaces de provocar en él enfermedades graves (Murray *et al*, 2006).

Los ambientes capaces de albergar vida microbiana reflejan el amplio espectro de la evolución de estos organismos. Se han encontrado especies que viven a temperaturas comprendidas entre el punto de congelación y el punto de ebullición del agua, en agua salada y en agua dulce, en presencia y en ausencia de aire. Algunos han desarrollado ciclos de vida que incluyen una fase de latencia en respuesta a la falta de nutrientes (Murray *et al*, 2006; Cabello, 2007).

Los microorganismos se hallan capacitados para acometer una extensa gama de reacciones metabólicas y adaptarse a muchos ambientes diferentes (Madigan *et al*, 2003). Por su poco peso pueden ser transportados por las corrientes de aire y estar en todas partes, pero las características del ambiente determinan cuáles especies pueden multiplicarse.

En este sentido, en los últimos años ha vuelto a centrarse la atención de un número creciente de investigadores, en la búsqueda de productos naturales a fin de evaluar sus actividades biológicas y ensayar las posibilidades de su aplicación clínica con una u otra finalidad. En esta línea de trabajos destacan los estudios relacionados con los productos naturales aislados de extractos de plantas superiores que prometen ser una importante fuente de sustancias bioactivas. Se estima que en la Tierra existen entre 250.000 y 500.000 especies vegetales y que sólo han sido investigadas menos del cinco por ciento para buscar en ellas principios farmacológicamente activos, de los cuales muy pocos han sido aislados, purificados y estudiados a fin de determinar su estructura química.

A la luz de estos hechos, nos pareció interesante evaluar la actividad antimicrobiana de algunos de los productos aislados de *Coespeletia moritziana*, perteneciente a la familia Asteraceae que ha sido objeto de investigaciones científicas utilizando modelos *in vitro*, y proporcionando evidencia experimental de un amplio espectro de propiedades farmacológicas y terapéuticas, entre las que se destacan: actividad insecticida, citotóxica, antiinflamatoria, relajante muscular y actividad antibacteriana contra una gran variedad de microorganismos como *Mycobacterium smegmatis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Echerichia coli*, entre otros.

Los microorganismos Gram positivos, de interés para el presente estudio son:

Género *Staphylococcus*:

Estos microorganismos se caracterizan por presentar una disposición típica en forma de racimos de uvas, de ahí su nombre que procede del griego Staphyle "racimo de uvas". La especie más importante es *Staphylococcus aureus*, denominado así por sus colonias amarillas (aureus = oro, dorado).

Algunas características de los estafilococos explican su patogenicidad, que puede asumir varias formas. Crecen relativamente bien en condiciones de presión osmótica elevada y humedad reducida, lo que explica en parte que puedan

desarrollarse y sobrevivir en las secreciones nasales y en la piel. Esto también explica por qué puede crecer en ciertos alimentos (como el jamón y otras carnes curadas) o en alimentos poco húmedos que tienden a inhibir el crecimiento de otros microorganismos.

Morfológicamente son cocos Gram positivos, poseen un diámetro entre 0.5 y 1 μm y son anaerobios facultativos, son inmóviles, capaces de crecer en un medio con elevadas concentraciones de sal y a temperatura desde 18 hasta 40°C (Murray *et al*, 2006).

En la actualidad el género comprende 35 especies y 17 sub especies.

Estas bacterias están presentes en el ser humano colonizando la piel y las mucosas; también las bacterias de este género conforman un grupo de patógenos en el ser humano originando un amplio espectro de enfermedades sistémicas que puede poner en peligro la vida, como: enfermedades cutáneas, síndrome de shock tóxico, síndrome de piel escaldada, bacteriemia, endocarditis, infecciones del tracto urinario, infecciones oportunistas (Murray *et al*, 2006; Cabello, 2007).



Figura 34: Bacterias del Género *Staphylococcus*

Género *Enterococcus*:

Los cocos Gram positivos que se disponen en parejas o en cadenas cortas, son organismos facultativos aerobios, ya que prefieren usar oxígeno (Fischetti *et al*, 2000) aunque sobrevive bien en su ausencia, su temperatura óptima de crecimiento es de 35°C. Son muy exigentes desde el punto de vista nutricional, ya que requieren de vitamina D, bases de ácidos nucleícos y una fuente de carbono como la glucosa.

Los miembros de este género eran clasificados como *Streptococcus Grupo D* hasta 1984 cuando los análisis de ADN genómicos indicaron que un género separado era más apropiado (Schleifer *et al*, 1984).

Los *Enterococcus* están adaptados a zonas del cuerpo que poseen un contenido elevado de nutrientes pero baja cantidad de oxígeno, como el tracto gastrointestinal, la vagina y la cavidad oral. También se encuentran en gran cantidad en las heces humanas. Al ser microbios relativamente resistentes, persisten como contaminantes en el ámbito hospitalario, en las manos y en la ropa de cama (Murray *et al*, 2006; Cabello, 2007). En los últimos años se han convertido en una causa principal de infecciones intrahospitalarias, en especial por su gran resistencia a la mayoría de los antibióticos.

Dos especies *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, determinan gran parte de las infecciones de las heridas quirúrgicas y muchas infecciones urinarias. En el ámbito médico con frecuencia invaden el torrente sanguíneo a través de elementos invasivos como los catéteres permanentes. (Pelletier, 1996).

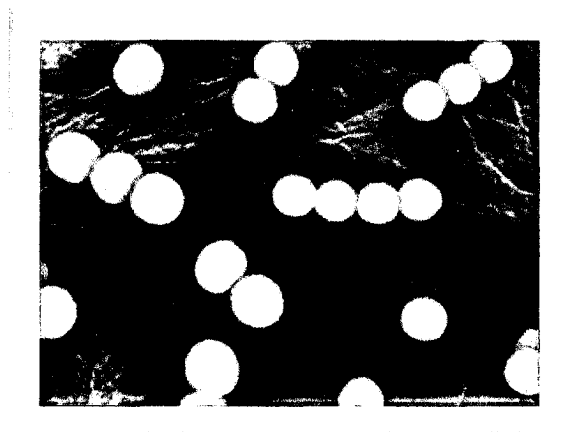


Figura 35: Género *Enterococcus*

Género *Bacillus*:

Es un género de bacterias Gram positivos en forma de bastón del tipo aerobios estrictos o anaerobios facultativos. En condiciones estresantes forman una endospora de situación central, que deforma la estructura de la célula. Dicha forma esporulada es resistente a las altas temperaturas y a los desinfectantes químicos corrientes. Viven en el suelo, agua del mar, ríos, y en alimentos los cuales contaminan con su presencia. Generalmente son móviles; algunas especies de interés sanitario (*B. anthracis*, causante del carbunco) son inmóviles. Hay especies productoras de antibióticos (Murray *et al*, 2006; Cabello, 2007).

Estas especies pueden producir enfermedades como gastroenteritis, infecciones oculares, septicemia relacionada con catéteres e infecciones oportunistas (Murray *et al*, 2006).

El gran grupo de bacilos Gram negativos no exigentes incluye diferentes familias y géneros muchos de ellos muy frecuentes en patología médica.

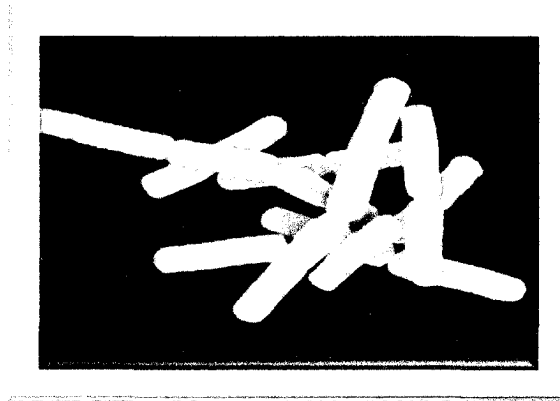


Figura 36: Género *Bacillus*

Género *Escherichia*:

El Género *Escherichia* se compone de 5 especies, de las cuales *E. coli* es quizás el organismo procariota más estudiado por el ser humano. Se trata de una bacteria Gram negativa que se encuentra en las materias fecales del hombre y de muchas especies animales. Su nicho ecológico natural es el intestino delgado y grueso, forma parte de la flora nativa intestinal y se encuentra en calidad de saprobio sin causar daño (Murray *et al*, 2006).

Fue descrita por primera vez en 1885 por Theodore von Escherich, bacteriólogo alemán, quien la denominó *Bacterium coli*. Posteriormente la taxonomía le adjudicó el nombre de *Escherichia coli*, en honor a su descubridor (Murray *et al*, 2006; Cabello, 2007).

Ésta y otras bacterias son necesarias para el funcionamiento correcto del proceso digestivo, además de producir las vitaminas B y K, es la más frecuente y la más relevante desde el punto de vista clínico.

La *Escherichia coli* puede causar infecciones intestinales y extra intestinales generalmente graves, tales como infecciones del aparato excretor, cistitis, meningitis, peritonitis, mastitis, septicemia y neumonía (Murray *et al*, 2006; Cabello, 2007).



Figura 37: Género *Escherichia*

Género *Pseudomonas*:

Son bacilos Gram negativos no fermentadores de la glucosa, móviles, rectos o ligeramente curvados. Este género se compone actualmente de unas 10 especies obtenidas a partir de muestras clínicas, así como numerosas especies que se encuentran en la naturaleza, *Pseudomonas aeruginosa* es la especie más frecuente y causante de un grave problema de salud pública ya que es causante de infecciones nosocomiales, al encontrarse también en ambientes hospitalarios, como suelos, lavamanos, entre otros. Además es una cepa resistente a muchos antibióticos y son capaces de mutar a cepas aún más resistentes durante el tratamiento (Murray *et al*, 2006; Cabello, 2007).

Esta especie produce enfermedades en las vías respiratorias inferiores desde traqueobronquitis hasta neumonía necrosante grave, infecciones cutáneas, oculares, auditivas, afectan el aparato urinario, y producen bacteriemia (presencia de bacterias en la sangre).



Figura 38: Género *Pseudomonas*

Género *Candida*

Las candidiasis constituyen un grupo de infecciones causadas por un hongo oportunista que puede tener expresión cutánea, gastrointestinal, sistema respiratorio y genitales del género *Candida*, de los cuales *Candida albicans* es la más frecuente. Se puede transmitir por ropas, objetos y también por contacto sexual (véase infección de transmisión sexual). Estos hongos están siempre presentes en la piel y en la mucosa del tracto digestivo, genitourinario y respiratorio de la mayoría de las personas, pero se encuentran controlados por otros microorganismos no patógenos. Cuando se produce un desequilibrio, el aumento desmedido de la población de hongos produce esta u otras micosis. La candidiasis afecta habitualmente las zonas húmedas y cálidas de la piel y las mucosas, como las axilas, la boca, uñas, el glande y la vagina. Representa un 25 por ciento de las micosis cutáneas.

La candidiasis es la más frecuente causa de vaginitis; se estima que una de cada cuatro mujeres experimenta esta enfermedad durante su vida.



Figura 39: Género *Candida*

III.2.- MATERIALES Y MÉTODOS

La determinación de la actividad antimicrobiana fue realizada en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad de La Laguna-España, por la Doctora María Eugenia Lucena de Ustáriz a cargo de la Doctora Laila Moujir Moujir y la Doctora Liliana Araujo.

Microorganismos

Para la realización del presente trabajo 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 y la levadura *Candida albicans* CECT 1039.

III.2.1.- Medios de cultivo

A continuación se describen los medios de cultivos utilizados:

▼ Caldo nutritivo, CN (Oxoid)

COMPONENTE	CANTIDAD (g/L)
Lab-Lemco powder	1
Extracto de levadura	2
Peptona	5
Cloruro sódico	5

Este medio fue esterilizado en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

▼ Infusión cerebro corazón, BHI (Scharlau)

COMPONENTE	CANTIDAD (g/L)
Extracto de cerebro	12,5
Extracto de corazón	5
Peptona	10
Dextrosa	2
Cloruro sódico	5
Fosfato sódico	2,5

Este medio fue esterilizado en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

▼ Medio líquido Sabouraud (Cultimed)

COMPONENTE	CANTIDAD (g/L)
Glucosa	40
Peptona de carne	5
Peptona de caseína	5

Este medio fue esterilizado en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

▼ Medio extracto de levadura-peptona (YP)

COMPONENTE	CANTIDAD (g/L)
Peptona de carne (Scharlau)	10
Extracto de levadura (Scharlau)	10

Este medio fue esterilizado en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

▼ Medio extracto de levadura-peptona-dextrosa (YPD)

COMPONENTE	CANTIDAD (g/L)
Peptona de carne (Scharlau)	10
Extracto de levadura (Scharlau)	10
Glucosa (Panreac)	10

El extracto de levadura y el caldo peptonado fueron esterilizados en autoclave a 121 °C durante 20 minutos, mientras que la glucosa lo fue por filtración a través de filtros Millipore de 0,45 µm de diámetro de poro.

III.2.2.- Mantenimiento y conservación de microorganismos

Las bacterias fueron mantenidas en agar nutritivo, a excepción de *E. faecalis* que por sus exigencias metabólicas lo fue en agar cerebro corazón y la levadura *Candida albicans* en agar Sabouraud. Las placas fueron conservadas a 4 °C, llevándose a cabo resiembras periódicas.

La conservación de las cepas durante largos periodos de tiempo se realizó por congelación (-80 °C), empleando una suspensión celular con glicerol al 15% (v/v).

III.2.3.- Preparación de los inóculos microbianos

A partir de cultivos en medio sólido, se prepararon pre-inóculos en 20 mL de medio YP que fueron incubados a 37 °C durante 18 horas en agitación orbital.

Estos cultivos fueron diluidos en suero fisiológico o en medio de cultivo, para ser utilizados como inóculos para llevar a cabo los ensayos a la densidad celular deseada.

III.3.- Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

La concentración inhibitoria mínima (CIM) fue determinada por el método de microdilución en caldo, según la metodología descrita por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010). Se utilizaron placas de 96 pozos, ensayando a los diterpenos a diferentes concentraciones (2.5, 5, 10, 20 y 40 µg/mL). Se estableció este nivel ya que abundan los reportes de componentes antibacterianos con CIM mayores a los 100 µg/mL, las cuales son en realidad poco activos al igual que aquellos que poseen CIM de 10 µg/mL y lo ideal sería que tuvieran una CMI igual o menor de 2 µg/mL que son considerados de gran interés para la industria farmacéutica.

Se depositaron 200 µL de cada producto en medio de cultivo (caldo nutritivo o BHI en el caso de las bacterias y Sabouraud para la levadura) a 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. Estas placas fueron inoculadas con 100 µL de la suspensión del microorganismo a ensayar, realizada

a partir de pre-inóculos preparados, de modo que quedara a una densidad celular de $1-5 \times 10^5$ ufc/mL. Se incluyeron los siguientes controles: control de crecimiento (caldo+microorganismo), control negativo con DMSO (caldo +microorganismo+ DMSO) para verificar que el solvente utilizado no afectara el desarrollo de los microorganismos, Control de esterilidad del medio de cultivo y como control positivo ciprofloxacina 256 µg/ml para *P. aeruginosa*, Kanamicina 256 µg/ml para las demás bacterias y fluconazol 64 µg/ml para *C. albicans*.

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) para efectuar un recuento de microorganismos viables en placas de agar nutritivo ó BHI (bacterias), y Sabouraud (levadura) con el fin de establecer la CIM, que es la concentración más baja del compuesto ensayado capaz de inhibir el desarrollo microbiano. Cada ensayo fue realizado por duplicado.

III.4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La **tabla 34** muestra los resultados obtenidos de la evaluación de la actividad antimicrobiana de 7 diterpenoides (ácido kaurénico, ácido grandiflorénico, 15 α -acetoxi-kaurénico, ester glucosídico de ácido kaurénico, Acido-16,17-epoxi-17-acetoxi kauran-19 oico y kaurenol) frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas y la levadura *C. albicans*. El ácido kaurénico fue activo solo contra *B. subtilis* a una CIM de 10 µg/mL, este resultado se correlaciona con los reportado en la literatura, es decir, actividad contra otras especies del género *Bacillus* (Davino *et al.*, 1989; Velikova *et al.*, 2000; Zgoda-Pols *et al.*, 2002; wilkens *et al.*, 2002). En relación a la actividad de este compuesto contra *S. aureus*, los resultados obtenidos en este estudio difieren de lo señalado por diversos investigadores (Peña, 2008; Wilkens *et al.*, 2002; Zgoda-Pols *et al.*, 2002; De los Rios *et al.*, 1999; Gutierrez *et al.*, 1998; Ghisalberti *et al.*, 1997; Slimestad *et al.*, 1995), quienes señalan inhibición del desarrollo de este microorganismo a concentraciones mayores a las probadas en este estudio (700-1600 µg/mL).

Por otra parte, el ácido grandiflorénico fue activo contra las bacterias Gram positivas ensayadas, con valores de CIM que oscilaron entre 5 y 20 $\mu\text{g/mL}$ (*B. subtilis* CMI 5 $\mu\text{g/mL}$, *E. faecalis* CMI 10 $\mu\text{g/mL}$ y *S. aureus* 20 $\mu\text{g/mL}$). Estos resultados son similares a los reportados por Gutiérrez *et al.* 1998, quienes señalan una CIM de 100 $\mu\text{g/mL}$ frente a *S. aureus* y 23.3 $\mu\text{g/mL}$ 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. En este sentido, Ramírez y Castaño 2009 refieren que el método de microdilución en caldo es más sensible.

El ácido 15 α -acetoxi-kaurénico inhibió el desarrollo de *B. subtilis* con una CIM 40 $\mu\text{g/mL}$, compuesto al cual ya se le ha descrito actividad antibacteriana (Davino *et al* 1989).

Tabla 34: Concentración inhibitoria mínima (CIM) expresada en $\mu\text{g/mL}$ del ácido kaurénico y sus derivados frente a diferentes microorganismos.

	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>E. faecalis</i> CECT 735	<i>B. subtilis</i> CECT 39	<i>E. coli</i> CECT 99	<i>P. aeruginosa</i> AK 958	<i>C. albicans</i> CECT 1039
Ácido kaurénico	-	-	10	-	-	-
Ácido grandiflorénico	20	10	5	-	-	-
15 α -acetoxi kaurénico	-	-	40	-	-	-
Ester glucosídico del ácido kaurénico	-	-	-	-	-	-
kaurenol	-	-	40	-	-	-
Ácido 16,17 epoxi 17 acetoxi kauran 19 oico	-	-	-	-	-	-

La sustitución del ácido carboxílico en el carbono 19 por un alcohol primario en el núcleo del kaureno dando como derivado el kaurenol, disminuyó la actividad contra *B. subtilis*, evidenciado por el aumento de la CIM contra esta bacteria de 10 a 40 $\mu\text{g/mL}$. La actividad del ácido kaurénico y sus derivados, el ácido grandiflorénico y el ácido 15 α -acetoxi-kaur-16-en-19-oico, nos lleva a suponer que

el ácido carboxilo presente en la posición C-19 y el doble enlace en la posición C-16 y C-17, son puntos importantes para dicha actividad.

La mayoría de los estudios muestran actividad del ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico sólo contra bacterias Gram positivas (Kubo *et al.*, 1974, Rodríguez- Linde *et al.*, 1994; Ghisalberti., 1997; Yamaguchi *et al.*, 1977; Lin *et al.*, 2004), actividad que podría tener relación directa con la composición de la pared celular de este grupo bacteriano.

Tal como lo comenta Ghisalberti., 1997 y Peña *et al.*, 2009, que sustituciones en la posición C-19 como los glucósidos, así como los sulfóxidos y los derivados pirazolidinicos entre los C-16 y C-17, afectan negativamente la actividad antibacteriana.

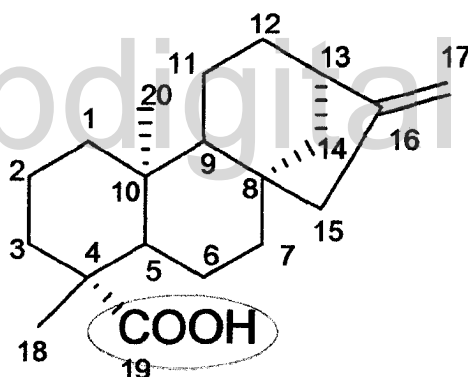
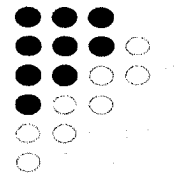


Figura 40: Relación estructura actividad antibacteriana.

Conclusiones



www.bdigital.ula.ve

CONCLUSIONES

1. De la hoja de *Coespeletia moritziana*, se lograron aislar e identificar 7 compuestos derivados del *ent*-kaureno, el ácido kaurénico, ácido grandiflorénico, ácido 15 α -hidroxi-kaur-16-en-19-oico, ácido 15 α -acetoxi-kaur-16-en-19-oico, ácido kauran-19-oico, ácido 16 α -hidroxi-kauran-19-oico y Kaurenol, resultando ser todos conocidos.
2. Se obtuvo el acetato de kaurenol por la acetilación del kaurenol.
3. Otro compuesto obtenido fue el ácido 15, 16-epoxi-17 acetoxi-kauran-19-oico, como subproducto de la hidroxilación alílica del ácido kaurénico con dióxido de selenio y peróxido de hidrógeno.
4. Se logró obtener según la técnica de Visbal y colaboradores 2004, el ester 2, 3, 4, 6- tetra acetil α -D-piranosilo del ácido 15-oxo-kaur-16-en-19-oico.
5. Se determinó la actividad citotóxica de los derivados del *ent*-kaurenos, frente a 3 líneas tumorales carcinoma epitelial de cuello de útero humano (HeLa), carcinoma de pulmón humano (A-549), y de cáncer de mama (MCF-7) y la línea celular no tumoral de riñón de mono verde africano (Vero). De acuerdo con los resultados obtenidos se puede concluir lo siguiente:
 - 5.1.- El compuesto 15 oxo ent kaur 16 en 19 oico presentó una $CI_{50} \leq 9 \mu M$ frente a las tres líneas celulares cancerosas estudiadas, pero también sobre la línea no tumoral Vero.
 - 5.2.- El ácido kaurénico resultó ser activo frente a las líneas celulares HeLa, A-549 y Vero pero no frente a la célula MCF-7.
 - 5.3.- El ácido grandiflorénico mostró una baja actividad frente a las tres líneas celulares cancerosas y también sobre Vero.

5.4.- Con respecto al derivado glucosídico, sólo se observó una leve actividad contra las HeLa y A-549.

5.5.- El Kaurenol mostró una actividad moderada (CI₅₀ de 28,17 µM) frente a la línea celular A-549.

6. Se determinó la actividad citotóxica sobre células mononucleares humana de sangre periférica (CMSP), separadas por la técnica de Ficoll-Hypaque, ajustadas a 2×10^6 cel/mL e incubadas con los derivados *ent*-kaurenos en estudio a una concentración máxima de 170 µM.

6.1.- El ácido kaurénico y el acetato de kaurenol presentaron una IC₅₀ por encima de la concentración máxima estudiada, lo que indica que son compuestos que presentan una baja toxicidad frente a las CMSP.

6.2.- La IC₅₀ del ácido kauránico (7,61), es muy tóxico sobre las CMSP, razón por la cual no se le determinó actividad citotóxica frente a las líneas celulares tumorales HeLa, A-549 y la MFC-7.

6.3.- La IC₅₀ del ácido 16 α hidroxí kauran 19 oico, está por encima de la mitad de las concentraciones estudiadas, mientras que el resto de los kaurenos sus IC₅₀ se ubican por debajo de la mitad de la concentración, presentando una leve toxicidad sobre CMSP.

7. Se determinó la actividad antibacteriana del ácido kaurénico, ácido grandiflorénico, ácido 15α-acetoxi-kaur-16-en-19-oico, ácido 16,17 epoxi 17 acetoxi kauran 19 oico, Kaurenol y el Ester 2, 3, 4, 6- tetra acetil α-D- piranosilo del ácido 15-oxo-kaur-16-en-19-oico, por el método de microdilución en caldo frente a seis bacterias y una levadura: *Escherichia coli* CECT 99, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Enterococcus faecalis* CECT 735, *Bacillus subtilis* CECT 39, *Pseudomonas aeruginosa* AK 958 y *Candida albicans* CECT 1039, obteniéndose:

7.1.- El ácido kaurénico fue activo solo contra *B. subtilis* a una CIM de 10 µg/mL. Resultado que difiere de la actividad reportada de este compuesto contra otros microorganismos como *S. aureus*, debido a las bajas concentraciones utilizadas en este estudio y en otros casos a la metodología empleada para determinar la actividad antibacteriana.

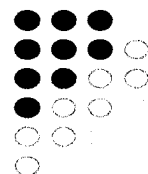
7.2.- El ácido grandiflorénico presentó actividad contra bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* (CIM 20 µg/mL), *Enterococcus faecalis* (CIM 10 µg/mL) y *Bacillus subtilis* (CIM 5 µg/mL), actividad que podría tener relación directa con la composición de la pared de este grupo bacteriano.

7.3.- El ácido 15 α -acetoxi-kaurénico arrojó una actividad sobre *Bacillus subtilis* (CIM 40 µg/mL).

7.4.- Al comparar la actividad antibacteriana del ácido kaurénico y sus derivados, pareciera que sustituciones en la posición C-19 como los glucósidos, así como los sulfóxidos y los derivados pirazolidínicos entre los C-16 y C-17, afectan negativamente dicha actividad.

8. En nuestro estudio no se encontró actividad significativa del ácido kaurénico sobre estirpes microbianas ya ensayadas en otros trabajos. Las concentraciones utilizadas superan las de este estudio, sin embargo, sería interesante analizar también los métodos en los cuales se realizaron estos ensayos.

Bibliografía



www.bdigital.ula.ve

BIBLIOGRAFÍA

1. Abdala, L.R. (2000). Flavonoids of *Tagetes stenophylla* Robinson (Asteraceae) as taxonomic markers. *Biochemical Systematics and Ecology* 28, 717.
2. Alonso, R., Gomis, H., Taddei, A., and Sajo, C. (2005). Cytostatic and cytotoxic activity of synthetic diterpene derivatives obtained from (-)-Kaur-9(11), 16-dien-19-oic acid against human cancer cell lines. *Letters in Drug Design and Discovery* 2, 255.
3. Alfonso R. (2006). Synthesis diterpene derivatives from kaura-9(11), 16-dien-19-oic acid: cytostatic and cytotoxic activity against human cancer cell lines. *Pharm. Chem. J.*, 40, 476-479.
4. Aparicio R., Bahsas A., Usubillaga A. (2007). Allylic oxidation of *ent*-Kaurenic acid, *ent*-Kaurenic acid Methyl Ester and *ent*-Kaurenol. *Avan. Quím.*, 2, 3-8.
5. Aparicio, R. (2008). Tesis Doctoral. Universidad de Los Andes, Mérida Venezuela.
6. Araujo Baptista, L., (2011). Tesis Doctoral. Actividad antimicrobiana y citotóxica de Withanolidas y derivados. Agentes inductores de apoptosis.
7. Aristeguieta, L. (1964). Flora de Venezuela, Volumen X (Compositae), 407-462. Edición Especial del Instituto Botánico, Caracas.
8. Badillo, V.M. (1997). Los géneros de las Compositae (Asteraceae) de Venezuela. Clave para su determinación. *Ernstia*. 6, 51-168.
9. Badillo, V.M. (2001). Lista actualizada de las especies de la familia Compuestas (Asteraceae) de Venezuela. *Ernstia* 11.
10. Bandara, B.M., Wimalasiri W.R., John K. Macleod. (1988). *Ent*-kauranes and oleananes from *Croton lacciferus*. *Phytochemistry*. 27(3): 869-871.
11. Banthorpe, D.V., Charlwood, B.V., Harborne, J.B., Dey, P.M. (1991). *Methods in plant biochemistry: Diterpenoids*. Academic Press.

12. Baptista J. G. (2006). Obtención de epóxidos y β -glicósidos del *ent*-Kaurenol. Trabajo de Grado de Maestría, Universidad de Los Andes (ULA), Mérida-Venezuela.
13. Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dautet, C., Axler Blin, C., Vézinet Brun, F., Rouzioux, C. (1983). *Science* 220, 868–871.
14. Baruch, Z. y A. P Smith. (1979). Morphological and Physiological Correlates of Niche Breadth in Two Species of *Espeletia* (Compositae) in the Venezuelan Andes. *Oecologia*. 38: 71-82.
15. Batista, R., García, P. A., Castro, M.A; Miguel del Corral, J.M., Feliciano, A.S., Oliveira, A. B. (2007). New Oxidized *ent*-Kaurane and *ent*-Norkaurane Derivatives from Kaurenoic Acid. *J. Braz. Soc.* 18, 622-627.
16. Batista, R., Humberto, J. L., Chiari, E., De Oliveira, A. B. (2007). Synthesis and trypanocidal activity of *ent*-kaurane glycosides. *Bioorg. Med. Chem.*, 15, 381-91.
17. Blair W. S, Lin P. F, Meanwell N. A, Wallace O. B. (2000). HIV-1 entry-an expanding portal for drug discovery. *Drug Discovery Today*, Vol. 5, N° 5, pp 183-194(12).
18. Bohlmann, F., and Rao, N. (1973). Neue hydroxyacetophenon-derivate aus *Espeletia schultzei* Wedd. *Chem. Ber.* 106, 3055-3038.
19. Bohlmann, F., Zdero, C., Cuatrecasas, J., King, R.M., and Robinson, H. (1980a). Neue sesquiterpene und norditerpene aus vertretern der gattung *Libanothamnus*. *Phytochemistry* 19, 1145-1148.
20. Bohlmann, F., Suding, H., Cuatrecasas, J., King, R.M., and Robinson, H. (1980c). Tricyclic sesquiterpenes and further diterpenes from *Espeletia* species. *Phytochemistry* 19, 2399-2403.
21. Bohlmann, F., Zdero, C., Robinson, H. and King, R.M. (1981). 15 α -Methylacryloxy-*ent*-kaurenic acid from *Ichthyothere* species. *Phytochemistry*, 20, 522-523.

22. Bohlmann, F., Zdero, C., Robinson, H. and King, R.M. (1982). Eudesmanolides and kaurene derivatives from *Wedelia hookeriana*. *Phytochemistry*, 21, 2329-2333.
23. Brieskorn, C. H. & Pöhlmann, E. (1968). Diterpene vom kaurantyp aus der Compositae *Espeletia schultzii* (Wedd). *Tetrahedron Lett.* (54), 5661-5664.
24. Bruno M., Rosselli s., Pibiri I., Piozzi F., Bondi M. L. and Simmonds M. S. J. (2001). Semisynthetic Derivatives of *ent*-kaurenes and their Antifeedant Activity. *Phytochemistry*, 58, 463-74.
25. Bruno M., Piozzi F., Arnold N. P., Baser K. H. C., Tabanca N. and Kirimer N. (2005). Kaurane Diterpenoids from Three *Sideritis* Species. *Turk J. Chem.*, 29, 61-64.
26. Camarda L., Ceraulo L., Di Stefano V. And Ferrugia M. (1996). Atractyligenin chemistry Part 4: Synthesis of 15 β -ol epimer of atractyligenin. *Boll. Chim. Farmaceutico*, 135, 189-191.
27. Campo-Bedolla P., Campos M. G., Valencia-Sánchez A., Ponce-Monter H., Uribe C., Osuna L. and Calderón J. (1997). Effect of kauranes from *Montanoa* spp. On rat uterus. *Phytotherapy Research*, 11, 11-16.
28. Campos-Lara, G., Ponce-Monter, H., Pedron, N., Valencia, A., Gallegos, A., Rios, T., Calderon, J., Gomez, F., Quijano, L., and Fuentes, V. (1990). Zoapatle XVI. Effect of two derivatives of *frutescens* on rat and guinea pig uterus. *International Journal of Crude Drug Research* 28, 61. kaurenoic acid isolated from *Montanoa*.
29. Cannon J. R., Chow P. W., Jefferies P. R. And Meehan G. V. (1966). Isolation of (-)-kaur-16-en-19-oic Acid and 15 β -hydroxy-(-)-kaur-16-en-19-oic Acid from *Phebalium rude* Bartl. *Aust. J. Chem.*, 19, 861-867.
30. Carmichael J, DeGraff W. G, Gazdar A. F, Minna J. D, Mitchell J. B. Evaluation of tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cáncer Research* (1987), Vol 47, N° 4, pp. 936-942.
31. Carrillo, F. (2011). Tesis Doctoral. Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela.

32. Castaño, C. (1995). El hombre y el continuum del páramo, Ecosistema a proteger, editado por Reyes, pp. 17-36. P. ECOAN, Bogotá.
33. Cavel B. D. and MacMillan J., (1967). Isolation of (-)-Kaur-16-en-19-oic Acid from the Mycellium of *Giberrella fujikuroi*. *Phytochemistry*, 6, 1151-54.
34. Chatterjee A., Desmukh K. and Chandrasekharan S. (1972). Diterpenoid Constituents of *Callicarpa macrophylla* Vahl. *Tetrahedron*, 28, 4319-4323.
35. Chen, K., Shi, Q., Fujioka, T., Zhang, D.-C., Hu, C.-Q., Jin, J.-Q., Kilkuskie, R., E., and Lee, K.-H. (1992). Anti-AIDS agents, 4. tripterifordin, a novel anti-HIV principles from *Tripterygium wilfordii*: isolation and structural elucidation. *Journal of Natural Products* 55, 88-92.
36. Chen W., Yang X-D., Zhao J-F., Zhang H-B. and LI L. (2006). Two New, 1-Oxygenated *ent*-Kaurane-Type Diterpenes from *Croton kongensis*. *Helv. Chim. Acta*, 90, 1554-1558.
37. Colegate S. M; Molyneux R. J. (2000). Detection, Isolation and Structural Determination. *Bioactive Natural Products*. CRC Press.
38. Coligan J, Kruisbeek A, Margulie D, Shevach E, Strober W. (1995). Isolation of Mononuclear Cells by Ficoll-Hypaque Gradient Centrifugation. En: Coligan, J. (Eds). *Current Protocols in Immunology*. pp A.3.3-A.3.4.
39. Cordell GA. (1995). Changing strategies in natural products chemistry. *Phytochemistry* . Vol. 40. Nº 6, pp 1585-1612(28).
40. Cragg, G.M., Newman, D.J. and Snader, K.M. (1997). Natural products in drug discovery and development. *J Nat Prod* 60, 52-60.
41. Cuatrecasas, J. (1976). A new subtribe in the Heliantheae (Compositae): Espeletiinae. *Phytol.* 35, 43-61.
42. Cuatrecasas, J. (1986). Speciation and radiation of the Espeletiinae in the Andes. En: Vuilleumier, F. y M. Monasterio (Eds). *High Altitude Tropical Biogeography*. Pp 267-303.
43. Cuatrecasas, J. (1995). A new genus of the Compositae: Paramiflos (Espeletiinae) from Colombia. *Proceedings Biological Society of Washington* 108: 748-750.

44. Da Costa, F.B., Albuquerque, S., and Vichnewski, W. (1996). Diterpenes and synthetic derivatives from *Viguiera aspilloides* with Trypanomicidal activity. *Planta Médica* 62, 557-559.
45. De Los Rios, C., Hidalgo Baez, D., Contreras, Q., Crescente, O., and Caserta, A. (1999). Evaluación fitoquímica y actividad antibacteriana de las inflorescencias de *Espeletia schultzii* (Asteraceae). *Ciencia-Maracaibo* 7, 72-77.
46. Dennis D. T. and West C. A., (1967). Biosynthesis of Gibberellins III. The Conversion of (-)-Kaurene to (-)-Kaurene-19-oic-Acid in Endosperm of *Echinocystis macrocarpa* Greene. *Journal of Biological Chemistry*, 242, 3293-300.
47. Denizot F, Lang R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Meth.*, 89: 271-277.
48. Devita, V.T., Jr., Serpick, A.A. and Carbone, P.P. (1970). Combination chemotherapy in the treatment of advanced Hodgkin's disease. *Ann Intern Med* 73, 881-95.
49. Dorigueto A. C., Vieira H. S., Ellena J. A., Takahashi J. A., Boaventure M. A. D. And Mascarenhas. (2002). A novel diterpene lactone. *Acta Cryst.*, 58, 1392-1394.
50. Emerson, B. C. (2002). Evolution on oceanic islands: molecular phylogenetic approaches to understanding pattern and process. *Molecular ecology*. 11: 951-966.
51. Fatope, M.O., Audu, O.T., Takeda, Y., Zeng, L., Shi, G., Shimada, H., and McLaughlin, J. (1996). Bioactive ent-kaurene diterpenoids from *Annona senegalensis*. *Journal of Natural Products* 59, 301-303.
52. Fischetti VA; Novick RP; Ferretti JJ; Portnoy DA; Rood JI (editors) (2000). *Gram-Positive Pathogens*.
53. Freshney, R. (1987). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, p.117, Alan R. Liss, Inc., New York.

54. Freshney, R. Ian. (2000). Culture of animal cells. Editorial Wiley-Liss. Páginas: 149-165, 309-313.
55. Fujita T., Takeda Y., Han-Dong S., Minami Y., Manunaka T., Takeda S., Yamada Y. And Togo T. (1988). Cytotoxic and Antitumor Activities of *Rabdosia* Diterpenoids. *Phytochemistry*, 40, 1461-1467.
56. Fujita T., Takeda Y., Han-Dong S., Minami Y., Marunaka T., Takeda S., Yamada Y. And Togo T. (1988). Cytotoxic and Antitumor Activities of *Rabdosia* Diterpenoids. *Planta Med.*, 54, 414-417.
57. Gallo, R. C., Salahuddin, S. Z., Popovic, M., Shearer, G. M., Kaplan, M., Haynes, B. F., Palker, T. J., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B., White, G., Foster, P., and Markham, F. D. (1984). Human T-lymphotropic retrovirus, HTLV-III, isolated from AIDS patients and donors at risk for AIDS. *Science* 224, 500-503.
58. Galt R. H. B. and Hanson J. R., (1964). Partial Synthesis of (-)-Kaur-16-en-19-oic Acid from 7-Hydroxykaurenolide. *Chemistry and Industry*, 837.
59. Galt R. H. B. and Hanson J. R., (1966). The Chemistry of Tetracyclic Diterpenoids IV. The Partial Synthesis of (-)-Kaur-9(11), 16-dien-19-oic Acid from 7-Hydroxykaurenolide. *Tetrahedron*, 22, 3185-87.
60. García P. A., De Oliveira A. B. And Batista R. (2007). Occurrence, Biological Activities and Synthesis of Kaurane Diterpenes and their Glycoside. *Molecules*, 12, 455-483.
61. Ghisalberti E. L. (1997). The biological activity of naturally occurring kaurene diterpene. *Fitoter.* 68(4), 303-325.
62. Ghoumari H., Benajiba M-H., Azmani A., García-Granados A., Martínez A., Parra A., Rivas F. and Socorro O. (2005). *Ent*-kauranoid derivatives from *Sideritis moorei*. *Phytochemistry*, 66, 1492-1498.
63. Grabley, S.; Thiericke, R. (1999). *Drug Discovery from Nature*, Springer-Verlag, Germany.
64. Graebe J. E., Dennis D. T., Upper C. D. and West C. A., (1965). Biosynthesis of Gibberellins I. The Biosynthesis of (-)-Kaurene, (-)-Kauren-

- 19-ol and "trans"- Geranylgeraniol in Endosperm of *Echinocystis macrocarpa* Greene. *Journal of Biological Chemistry*, 240, 1847-54.
65. Guentzel MN (1996). *Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter, and Proteus*. In: *Barron's Medical Microbiology* (Barron S et al, eds.) (4th ed. edición). Univ of Texas Medical Branch.
66. Gustafson, K.R., Munro, M.H.G., Blunt, J.W., Cardenilla, J.H., McMahon, J.B., Gulakowski, R.J., Cragg, G.M., Cox, P.A., Brinen, L.S., Clardy, J., and Boyd, M.R. (1991). HIV inhibitory natural products 3. diterpenes from *Homalanthus acuminatus* and *Chrysobalanus icaco*. *Tetrahedron* 47, 4547-4554.
67. Gutiérrez, S.R., Fuentes, O., Téllez, A.N., and Torrenegra, R.D. (1998). Principios activos antibacterianos de *Espeletia barclayana*. *Rev. Latim. Quím.* 26, 71-74.
68. Guzmán-Duran, A., Wens, M.A., Ponce Monter, H., Pedrón, N., and Gallegos, A.J. (1988). Zoapatle XIII. Isolation of water soluble fractions from *Montanoa frutescens* and some biological activities. *Archivos de investigación médica* 19, 157.
69. Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
70. Hansel T, De Vries I, Iff T, Rihs S, Wandzilak M, Betz S, Blaser K, Walker C. (1991). An Improved Immunomagnetic Procedure for the Isolation of Highly Purified Human Blood Eosinophils. *J. Immunol. Methods.* 145: 105-110.
71. Hanson J. R. and White A. F. (1972). The Chemistry of the Tetracyclic Diterpenoids-VIII. The Stereochemistry of Atractylanic Acid. *Tetrahedron*, 24, 2533-2536.
72. Hanson J. R. (1966). The chemistry of the tetracyclic Diterpenoids—I. *Tetrahedron*, 22, 1453-1460.
73. Hanson J. R. B. V. Charlwood and D. V., Banthorpe. (1991). "Methods in Plant. Biochemistry, Vol. 7: Terpenoids", pág. 263-87. . Academic Press. London.

74. Harvey, A.L. (1999). Medicines from nature: are natural products still relevant to drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* 20, 196-8.
75. Hasan C. M., Healey T. M. and Waterman P. G. (1982). Kolavene and Kaurane Diterpenes from the Stem Bark of *Xylopiya aethiopica*. *Phytochemistry*, 21, 1365-1368.
76. Hedberg, I. y O. Hedberg. (1979). Tropical-alpine life-forms of vascular plants. *Oikos*. 33: 297-307.
77. Henrick C. A. and Jefferies P. R. (1964). The Chemistry of Euphorbiaceae VII. The Diterpenes of *Ricinocarpus stylosus* Diels. *Australian Journal of Chemistry*, 17, 915-33.
78. Henry G. E., Adams L. S., Rosales J. C., Jacobs H., Heber D. and Seeram N. P. (2006). Kaurene diterpenes from *Laetia thamnina* inhibit the growth of human cancer cells in vitro. *Cancer Lett.*, 244, 190-194. 217.
79. Heywood V.H., Harborne J.B., and Turner B.L. (1977). An overture to the Compositae. In the *Biology and Chemistry of the Compositae*, V.H. Heywood, J. B. Harborne, and B.L. Turner, eds (London).
80. Huang JB. (1997). There is a bright future for Qigong anti-cancer therapy A speech at the assessment conference of Taiji Five-Element Qigong anti-cancer therapy [in Chinese]. *China Qigong Science* (6):5-8.
81. Huang P, Oliff A., (2001). Signaling pathways in apoptosis as potential targets for cancer therapy. *Trends Cell Biol* 11: 343-348.
82. Hueso-Falcón I., Cuadrado I., Cidre F., Amaro-Luis J. M., Estevez-Braun A., Heras B. And Hortelano S., (2011). Synthesis and Anti-inflammatory Activity of *ent*-Kaurene Derivatives. *Eur. J. Med. Chem.*, 46, 1291-1305.
83. Hueso-Falcón I., Carina Noelia Casero, Ángel Amesty, Fátima Gutiérrez Nicolás, Juan C. Cedrón, Ana Estévez-Braun y Ángel G. Ravelo. (2011). Quimiotecas bioactivas a partir de estructuras privilegiadas de origen natural. *Biocáncer* 5.
84. Hueso I., Girón N., Velasco P., Amaro J., Ravelo A., De Las Heras B., Hortelano S., y Estevez A. (2010). Synthesis and induction of apoptosis

signaling pathway of *ent*-kaurene derivatives. *Biorg. Med. Chem.* 18, 1724-1735.

85. Ibáñez J. Estudio de la composición del aceite esencial y de la resina en el ciclo vital de la *Espeletia schultzei*, *Coespeletia moritziana*, *Ruilopezia atropurpurea* y de un híbrido. (2004). Master's Thesis, Postgrado Interdisciplinario de Química Aplicada, Faculty of Sciences, University of Los Andes, Mérida, Venezuela.
86. Jahan I. A., Nahar N., Mosihuzzaman M., Shaheen F., Atta-ur-rahman. And Choudhary M. I. (2004). Six new diterpenoids from *Suregada multiflora*. *J. Nat. Prod.*, 67, 1789-1795.
87. Jeffrey, C. (2007). Compositae: Introduction with key to tribes. in *Families and Genera of Vascular Plants*, vol. VIII. Pages 61-87. Flowering Plants, Eudicots, Asterales (J. W. Kadereit and C. Jeffrey, eds.). Springer-Verlag, Berlin.
88. Jevons MP. (1961). Celbenin – resistant staphylococci. *Brit Med J.*; 1: 124-5.
89. Katinas, L., Gutiérrez, D.G., Grossi, M. & Crisci, J.V. (2007). Panorama de la familia Asteraceae (Compositae) en la República Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 42: 113–129.
90. Kilic T., Yildiz Y. K., Goren A. C., Tumen G. and Topcu G. (2003). Phytochemical analysis of some *Sideritis* species of Turkey. *Chem. Nat. Compd.*, 39, 453-456.
91. Knox, E. B. y J. D. Palmer. (1995). Chloroplast DNA variation and the recent radiation of the giant senecios (Asteraceae) on the tall mountains of eastern Africa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 10349-10353.
92. Kohda, H., Kasai, R., Yamasaki, K., Murakami, M., and Tanaka, O. (1976). New sweet diterpene glucosides from *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry* 15, 981-983.
93. Kondoh M., Harada M., Koizumi N., Fujii M., Nagashima F., Asakawa Y. and Watanabe Y. (2004). An *ent*-Kaurene Diterpene Enhances Apoptosis

- Induced by Tumor Necrosis Factor in Human Leukemia Cells. *Planta Med.*, 70, 723-727.
94. Kubinyi H., (1995). Strategies and recent technologies in drug discovery, *Pharmazie* 50: 647–662.
95. Kubo I., Xu, Y., and Shimizu, K. (2004). Antibacterial Activity of ent-Kaurene Diterpenoids from *Rabdosia rosthornii*. *Phytotherapy Research* 18, 180.
96. Kubo I., Ganjian I., Kubota T. (1982). Chemotaxonomic significance of ent-kaurene diterpenes in *Rabdosia umbrosus* varieties. *Phytochemistry* 21(1): 81-83.
97. Kubo I., Kamikawa T., Isobe T. and Kubota T. (1974). Bitter Principles of *Isodon umbrosus* Hara. The structure of Umbrosin A and B. *Bulletin of the Chemical of Japan*, 47, 1277-1279.
98. Kuntz, S., Wenzel, U. and Daniel, H. (1999). Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *Eur J Nutr* 38, 133-42.
99. Largo, Rafael; Donoso, José M.; Pruyas; Martha. (1973). Neumopatía a proteus. *Rev. Chilena Pediatría*. Vol 44, N9 4, .
100. Le Quesne P.W., Vidya Honkan, Kay D. Onan, Morrow P.A., Tonkyn David. (1985). Oxidized kaurene derivatives from leaves of *Solidago missouriensis* and *S. rigida*. *Phytochemistry*, 24(8): 1785-1787.
101. Li-Mei Li, Guo-You Li, Sheng-Xiong Huang, Sheng-Hong Li, Yan Zhou, Wei-Lie Xiao, Li-Guang Lou. (2006). 7 α , 20-epoxy-ent-kauranoids from *Isodon parvifolius*. *J. Nat. Prod*, 69, 645-649.
102. Li Y., Liu J., Yu S., Proksch P., GU J. and Lin W. (2010). TNF- α inhibitory Diterpenoids from the Chinese mandrove plant *Excoecaria agallocha* L. *Phytochemistry*, 71, 2124-2131.
103. Lin L-H., Lee L-W., Sheu S-Y. and Lin P-Y. (2004). Study on the Stevioside Analogues of Steviolbioside, Steviol, and Isosteviol 19-Alkyl Amide Dimers: Synthesis and Cytotoxic and Antibacterial Activity. *Chem. Pharm. Bull.*, 52, 1117- 1122.

104. Liu, L.F., Desai, S.D., Li, T.K., Mao, Y., Sun, M. and Sim, S.P. (2000) Mechanism of action of camptothecin. *Ann N Y Acad Sci* 922, 1-10.
105. Lovelock J.E., Bishop M.W.H. (1959). Propagation and conservation of cultures. *Nature*, 183, 1394-1395.
106. Luteyn, J.L. (1999). Páramos. A checklist of plant diversity, geographical distribution and botanical literature. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 84, New York.
107. Madigan TM, Martinko JM, Parker J. (2003). *Brock-Biology of Microorganisms*. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
108. Marcano, D.; Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica Orgánica*. Universidad Central de Venezuela. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Caracas.
109. Matsuo A., Kodoma J., Nakayama M. and Hayashi S. (1977). *Ent-kaurane diterpenoids from the liverwort Jungermannia infusca*. *Phytochemistry*, 16, 489-490.
110. Meccia G., Quintero P., Rojas L. B., Usubillaga A. And Juan Carmona. (2010). Análisis de los ácidos kaurenicos presentes en *Espeletopsis angustifolia* Cuatrec. De los Andes Venezolanos. *Av. Quim.*, 5, 45-49.
111. Metwally M.A., Dawidar A.M.; Abou-elzahab M.M. (1985). Kaurene derivatives from *Oyedaea buphthalmoides* DC. *Pharmazie* 40(10): 736-737.
112. Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A. (1990). High Gradient Magnetic Cell Separation with MACS. *Cytometry*. 11: 231-238.
113. Mitscher, L., Rao, G.S.R., Veysoglu, T., Drake, S., and Haas, T. (1983). Isolation and identification of trachyloban-19-oic acid and (-)-kaur-9(11), 16-dien-19-oic acid as antimicrobial agents from the parrie sunflower, *Helianthus annuus*. *J. Nat. Prod.* 46, 745-746.
114. Monasterio, M., (1980). Los páramos andinos como región natural, características biogeográficas generales y afinidades con otras regiones andinas. Estudio ecológico de los páramos andinos. Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.

115. Morales A., Pérez P., Mendoza R., Compagnone R., Suarez A. I., Arvelo F., Ramírez J. L. and Galindo-Castro I. (2005). Cytotoxic and proapoptotic activity of *ent*-16 β -17 α -dihydroxykaurane on human mammary carcinoma cell line MCF-7. *Cáncer Letters*, 218, 109-116.
116. Mori K. and Matsui M., (1967). Diterpenoid Total Synthesis VIII. (\pm)-Kaur-16-en-19-oic Acid, (\pm)-Kaur-16-en-19-ol, (\pm)-Monogynol and Some Oxygenated Kauranes. *Tetrahedron*, 24, 3095-3111.
117. Morgan S. J. y Darling D. C. (1995). Cultivo de células animales. Editorial Acribia, S. A. España, pp. 122-130.
118. Monsalve, M.E., (2004). Tesis doctoral. Modificaciones moleculares sobre diterpenos derivados del kaureno. Universidad de Los Andes, Facultad de Farmacia. Mérida-Venezuela.
119. Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65, 55-63.
120. Moujir L. (1998). Actividad antibiótica de la netzahualcoyona, una triterpenoquinona aislada de *Schafferia cuneifolia*. Tesis doctoral
121. Muller, S., Tirapelli, C.R., de Oliveira, A.M., Murillo, R., Castro, V., and Merfort, I. (2003). Studies of *ent*-kaurane diterpenes from *Oyedaea verbesinoides* for their inhibitory activity on vascular smooth muscle contraction. *Phytochemistry* 63, 391.
122. Muñoz A., *Cáncer genes y nuevas terapias*. (1997). Ed. Hélice, Madrid.
123. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. (2006). *Microbiología Médica*. Quinta edición. Madrid. Elsevier
124. National Comité for Clinical Laboratory Standards. (1997). Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria grow aerobically 4th ed. NCCLS document M7-A4, 17. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
125. Noble, R.L. (1990). The discovery of the vinca alkaloids--chemotherapeutic agents against cancer. *Biochem Cell Biol* 68, 1344-51.

126. Nuñez R. Marvin J. (2004). Tesis Doctoral. Metabolitos secundarios bioactivos aislados de *Maytenus chiapensis* y *Crossopetalum uragoga* (Celastraceae).
127. Ohkoshi, E., Kamo, S., Makino, M., and Fujimoto, Y. (2004). *ent*-Kaurenoic acids from *Mikania hirsutissima* (Compositae). *Phytochemistry* 65, 885-890.
128. Padmaja, V., Thankamany, V., Hara, N., Fujimoto, Y., and Hisham, A. (1995). Biological activities of *Annona glabra*. *Journal of Ethnopharmacology* 48, 21-24.
129. Papavero Nelson, (1995). Historia de la Biología comparada, Volumen VIII. El siglo de las luces.
130. Pelletier LL Jr. (1996). Microbiology of the Circulatory System. In: Baron's Medical Microbiology (Baron S et al, eds.) (4th ed. edición). Univ of Texas Medical Branch.
131. Peña, A. (2008). Monografía de Tesis para optar al título de Licenciado en Química. Universidad de Los Andes. Venezuela.
132. Peña, A., Alarcón, L., Usubilaga, A., Velasco, J., Delgado P. (2009). Contribución al estudio de los ácidos kaurénicos aislados a partir de *Coespeletia moritziana* Sch. Bip. Ex. Wedd. (Frailejón) y su actividad antibacteriana. *Argroll.* 6, 67-84.
133. Peña, A. (2012). Tesis Doctoral. Contribución al estudio de algunas especies del género *Espeletia*, aislamiento de nuevos derivados kaurenicos y ensayos de su actividad. Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela.
134. Pérez Rodríguez Nora (1972). "Estudio de los componentes de la *Espeletia timotensis*" Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia, Universidad de Los Andes.
135. Pinto A. C., D. O. Prado S. K. and Pinchin R. (1981). Two Kaurenes from *Vellozia Caput-ardeae*. *Phytochemistry*, 20, 520-521.
136. Piozzi F. (1966). The Structure and Stereochemistry of Atractyligenin. *Tetrahedron, Part II*, 515-529.

137. Piozzi F., Passananti S., Paternostro M. P. and Sprio V., (1971). Kaurenoid Diterpenes in *Espeletia grandiflora*. *Phytochemistry*, 10, 1164-66.
138. Piozzi F., Passananti S., Mario M. L. and Sprio V., (1972). Structure of Grandiflorenic Acid. *Canadian Journal of Chemistry*, 50, 109-12
139. Piozzi F. Sprio, V., Passannanti, S. & Mondelli, R. (1968). Structure of grandiflorolic acid. *Gazz. Chim. Ital.* 98, 907-910.
140. Piozzi F. and Bruno M. (2011). Diterpenoids from Roots and Aerial Parts of *Genus Stachys*. *Rec. Nat. Prod.*, 5, 1-11.
141. Prance, G.T. (1994). *Ethnobotany and the search for new drugs*, Ciba Foundation Symposium 185. Ed. John Wiley & Sons.
142. Rauscher, J. T. (2000). *Molecular systematics of the Espeletia Complex: Evidence from NRITS sequence on the evolution of an Andean adaptive radiation*. Tesis Doctoral, School of Arts and Sciences. Washington University, Saint Louis, Missouri, USA.
143. Robinson, H. (1981). A study of the tribal and subtribal limits of the Heliantheae (Asteraceae). *Smithsonian Contr. Botany* 51.
144. Rodríguez B. y Cobos TL. (2006). Nuevas especies de frailejones. Disponible en: <http://www.universia.net.co>.
145. Rodríguez-Linde M. E., García-Granados A., Quevedo-Sarmiento J., Moreno E., Onorato M. R., Parra A. And Ramos-Cormenzana A. (1994). Antimicrobial activity of natural and Semisynthetic Diterpenoids from *Sideritis* ssp. *Microbios*, 77, 7-13.
146. Romero Cabello Raúl. (2007). *Microbiología y parasitología humana*. Tercera edición. Editorial medica panamericana. México.
147. Roque N.F., Giannella T.L., Giesbrecht A.M., Rita de Cassia S.B.C. Barbosa. (1987). Kaurene diterpenes from *Wedelia paludosa*. *Rev. Latinoamer. Quim.* 18/3 110-111.
148. 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.

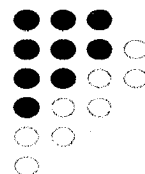
149. Sakamoto, I., Yamasaki, K., and Tanaka, O. (1977). Application of ^{13}C -NMR spectroscopy to chemistry of plant glycosides: rebaudioside D and E, new sweet diterpene glucosides of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Chem. Pharm. Bull 25, 3437-3439.
150. Serebryakov E. P., Kobrina N. S., Simolin A. V. and Kucherov V. F. (1968). 16 α -Hydroxy-(-)-Kauran-19-al and 16 α -Hydroxy-(-)-Kauran-19-oic Acid. Chem. Ind.(London), 14, 1770-1771.
151. Schleifer KH; Kilpper-Balz R (1984). «Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov.». Int. J. Sys. Bacteriol. 34: pp. 31–34.
152. Sharrer T. (2006). "He-La" Herself. Celebrating the woman who gave the world its first immortalized cell line. The Scientist; 20: 22.
153. Simpson, B. B. y C. A. Todzia. (1990). Patterns and Processes in the development of the high Andean flora. American Journal of Botany. 77: 1419-1432.
154. Slimestad R., Marston A., Mavi S. and Hostettmann K. (1995). Larvicidal Constituents of *Melantheria albinervia*. Planta Med., 61, 562-563.
155. Smith, A. C. y M. F. Koch. (1935). The genus Espeletia: a study in phylogenetic taxonomy. Brittonia. 1: 479-532.
156. Smith, A. P. y T. P. Young. (1987). Tropical alpine plant ecology. Annual Review of Ecology and Systematics. 18: 137-158.
157. Somova L. I., Shode F. O., Moodley K. and Govender Y. (2001). Cardiovascular and diuretic activity of kaurene derivatives of *Xylopi aethiopica* and *Alepidea amatymbica*. J. Ethnopharmacol., 77, 165-174.
158. Stahelin, H. (1973). Activity of a new glycosidic lignan derivative (VP 16-213) related to podophyllotoxin in experimental tumors. Eur J Cancer 9, 215-21.
159. Stevens, P. F. (2001 en adelante). «Asteraceae» (en inglés). *Angiosperm Phylogeny Website. Version 7, Mayo 2006*. Consultado el 04-28-2008.

160. Stuessy, T. F., (1977). Heliantheae systematic review, pp. 621-671 en the Biology and chemistry of the Compositae. Editado por V. H. Heywood, J. B. Harborne and B. L. Turner. Academic Press, London.
161. Sun H-D., Lin Z-W. and Niu F-D. (1994). Cytotoxic Diterpenoids from *Isodon megathyrsus*. J. Nat. Prod., 57, 1424-1429.
162. Suzuki I., Kondoh M., Harada M., Koizumi N., Fujii M., Nagashima F., Asakawa Y. and Watanabe Y. (2004). An *ent*-Kaurene Diterpene Enhances Apoptosis Induced by Tumor Necrosis Factor in Human Leukemia Cells. *Planta Med.*, 70, 723-727.
163. Tellez, A.N., Torrenegra, R., Pedroso, J., and Gray, A. (1998). Cycloartan-3 β -2-methyl butanoate isolated from genus *Espeletia* (Asteraceae). *Molecules* 3, M-49.
164. Tellez, A.N., Torrenegra, R., Pedroso, J., and Martinez, A. (2000). Cycloeucalen-3b-(2-methyl butanoate). New cycloeucalen isolate from the *Espeletia barclayana* Cuatrec. (Asteraceae). *Molecules* 5, M-163.
165. Torrenegra R., Gómez D. L. and Téllez A. N. (2001). Actividad Giberélica de los compuestos diterpénicos derivados de kaureno aislados de *Espeletiopsis santanderensis* Cuatr. *Actual Biol.*, 23, 19-22.
166. Torrenegra, R.D., and Téllez, A.N. (1995). Chemotaxonomy value of melampolides in *Espeletia* species (Aseraceae). *Biochem. System. Ecol.* 23, 449-450.
167. Torres, (2004). Investigación en la transformación secundaria de frutos, tubérculos, flores, hojas o tallos de especies pertenecientes a ecosistemas andinos. Informe técnico. Jardín botánico José Celestino Mutis. Subdirección científica. Bogotá D. C. pág. 2-14.
168. Turner BG, Summers MF. (1999). Structural biology of HIV. *J Mol Biol* ., 285: 1-32.
169. Usubillaga A. and Nakano T. (1979). Kauranoid Diterpenes in *Ruilopezia margarita*. *Planta Medica.*, 35, 331-338.
170. Van der Hammen, T., y A. M. Cleef. (1986). Development of the high Andean paramo flora and vegetation, pp. 153-201, in *High Altitude Tropical*

- Biogeography, edited by F. Vuilleumier and M. Monasterio. Oxford University Press, New York.
171. Vargas, O. (1998^a). Impacto del Fuego y Pastoreo sobre el Medio Ambiente Páramo, pp. 63- 72, en *El páramo: Ecosistema a proteger*, editado por Reyes, P. ECOAN, Bogotá.
172. Velikova, M., Bankova, V., Tsvetkova, I., Kujumgiev, A., and Marcucci, M.C. (2000). Antibacterial ent-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees. *Fitoterapia* 71, 693.
173. Vieira S. H., Takahashi A. J., Oliveira B. A., Chiari E., y Boaventura M. A. (2002). Novel derivatives of kaurenoic acid: preparation and evaluation of their trypanocidal activity. *J. Braz. Chem. Soc.* 13, 151-157.
174. Visbal, T., Martín, P., Mora, A.J., Delgado, G.E., Usubillaga, A. (2004). Carbohydrate esters of kaurenic acid. *Rev. latinoamer. Quím.* 32, 67-75.
175. Vlietnick A. J., De Bruyne T, Apers S, Pieters L. A., (1998). Plant-derived leading compounds for chemotherapy of Human Immunodeficiency Virus (HIV) infection. *Planta Med.*; 64:97-109.
176. Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P. and McPhail, A.T. (1971). Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am Chem Soc* 93, 2325-7.
177. Weislow O. W., Kiser R, Fine D. L., Bader J, Shoemaker R. H., Boyd M.R., (1989). New soluble-formazan assay for HIV-1 cytopathic effects: application to high-flux screening of synthetic and natural products for AIDS-antiviral activity. *Journal of the National Cancer Institute.* Vol 81, Nº 8, 577-586.
178. Wilkens M., Alarcón C., Urzúa A. and Mendoza L. (2002). Characterization of the Bactericidal Activity of the Natural Diterpene Kaurenoic Acid. *Planta Med.*, 68, 452-454.
179. Williams, S.D., Birch, R., Einhorn, L. H., Irwin, L., Greco, F. A. and Loehrer, P.J., (1987). Treatment of disseminated germ-cell tumors with

- cisplatin, bleomycin, and either vinblastine or etoposide. *N Engl J Med* 316, 1435-40.
180. Wu, Y. C., Hung, Y. C., Chang, F. R., Consentino, M., Wang, H. K., and Lee, K. H. (1996). Identification of *ent*-16b, 17-dihydroxykauran-19-oic acid as an anti-HIV principles and isolation of new diterpenoids annosquamosins A and B from *Annona squamosa*. *Journal of Natural Products* 59, 635-637.
181. Xu J., Yang J. Y., Ran Q., Wang L., Liu J., Wang Z., Wu X., Hua W., Yuan S., Zhang L., Shen M. and Ding Y. (2008). Synthesis and biological evaluation of novel 1-O- and 14-O-derivatives of oridonin as potential anticancer drug candidates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 18, 4741-4744.
182. Yamaguchi M., Taniguchi M., Kubo I. and Kubota T. (1977). Inhibitory Effect of Antibacterial and Antitumor Diterpenoids on Oxidative Phosphorylation in Mitochondria Isolated from Rat Liver. *Agr. Biol. Chem.*, 41, 2475-2477.
183. Yang, Y., Chang, F., Wu, C., Wang, W., Wu, Y. (2002). New *ent*-kaurane diterpenoids with anti-platelet aggregation activity from *Annona squamosa*. *J. Nat. Prod.* 65, 1462-1467.
184. Yeh, S.-H., Chang, F.-R., Wu, Y.-C., Yang, Y.-L., Zhuo, S.-K., and Hwang, T.-L. (2005). An anti-inflammatory *ent*-kaurane from the stems of *Annona squamosa* that inhibits various human neutrophil functions. *Planta Médica* 71, 904-909.
185. Zhang, Y.H., Wang, Y.L., Wei, Q.Y., Cai, Y.J., Wang, Q., and Liu, Z.L. (2005). Diterpenoids from the Chinese herb *Caryopteris terniflora* and their antibacterial and antitumor activity. *Pharmazie* 60, 551.
186. Zgoda-Pols J. R., Freyer A. J., Killmer L. B. and Porter J. R. (2002). Antimicrobial diterpenes from the stem bark of *Mitrephora celebica*. *Fitoterapia*, 73, 434-438.

Anexos



www.bdigital.ula.ve

ANEXO I

Mantenimiento de líneas celulares.

Una de las formas de crecimiento in vitro es el cultivo en monocapa. Cuando las células requieren la adhesión a un sustrato para crecer y dividirse, el crecimiento se realiza en una única capa celular (monocapa).

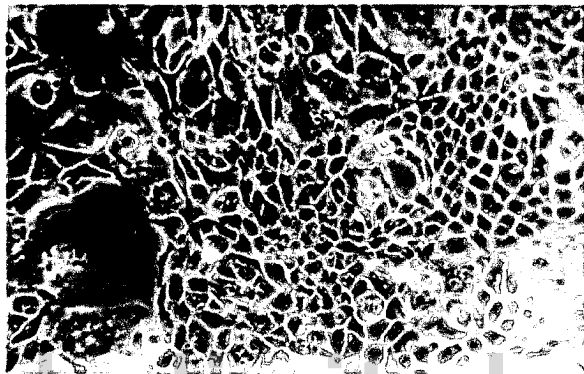


Figura 41: Cultivo en monocapa

Esta monocapa crecerá hasta alcanzar cerca del 100% de confluencia (máxima capacidad de cubrimiento de superficie); pasado esta etapa, el crecimiento se detiene por inhibición por contacto y las células pueden comenzar a degenerar, despegarse y morir. No obstante, algunas variantes de células tumorales son capaces de “apilarse” y dar lugar a multicapas.

Algunas definiciones importantes:

CULTIVO CELULAR: Término utilizado para denominar el crecimiento de células in vitro, incluyendo el cultivo de células aisladas. En los cultivos celulares, las células no están organizadas en verdaderos tejidos.

CULTIVO PRIMARIO: El cultivo iniciado a partir de células, tejidos u órganos tomados directamente de un organismo. Un cultivo primario debe ser considerado

como tal hasta que se subcultive (o repique) con éxito por primera vez. En ese momento se considera una línea celular.

DENSIDAD DE SATURACION: El máximo número de células mantenible bajo condiciones específicas de cultivo en un recipiente. Este término se expresa usualmente como el número de células por centímetro cuadrado en una superficie de cultivo o el número de células por centímetro cúbico en un cultivo en suspensión.

EFICIENCIA DE SIEMBRA (ADHESION): El porcentaje de células sembradas que se adhieren a la superficie del recipiente de cultivo en un tiempo determinado. Siempre deben establecerse las condiciones bajo las cuales se realizó la determinación.

LINEA CELULAR: Una línea celular se origina a partir de un cultivo primario en el momento del primer subcultivo exitoso. El término línea celular implica que los cultivos de la misma consisten en numerosos linajes de células presentes originalmente en el cultivo primario. Los términos finita o continua son usados como prefijo si se conoce el estado del cultivo. Si no, el término línea es suficiente. El término línea continua reemplaza al término línea establecida.

MEDIO QUIMICAMENTE DEFINIDO: Una solución nutritiva para cultivo de células siendo conocida la estructura química de cada componente. Aunque se sabe que aún los compuestos químicos puros pueden tener algunos contaminantes, se deben usar compuestos químicos de alta calidad con datos analíticos, si es posible, de los contaminantes.

PASAJE (REPIQUE): La transferencia o trasplante de células, con o sin dilución, de un recipiente de cultivo a otro. Se entiende que siempre que las células se transfieren de un recipiente a otro, una cierta porción de éstas se pierde y que por

lo tanto, se produce la dilución de las células en forma deliberada o no. Este término es sinónimo del término subcultivo.

PASAJE NUMERO (REPIQUE NUMERO): El número de veces que las células en cultivo han sido subcultivadas. En la descripción de este proceso debe establecerse la relación o dilución de las células a fin de determinar la edad relativa del cultivo.

www.bdigital.ula.ve

ANEXO II

Separación celular

Es necesario para realizar los estudios funcionales de células mononucleares, el aislamiento de éstos a partir de muestras de sangre periférica, órganos linfoides u otros tejidos. Este aislamiento se puede realizar por varios métodos pero en esta ocasión se va a hacer referencia a la "Separación por gradiente de densidad", para lo cual se utiliza la centrifugación sobre una solución de densidad definida como es el Ficoll-Hypaque (Lymphoprep). El Ficoll es un polímero de carbohidrato y metrizamida (compuesto denso que contiene yodo) y que permite que se hundan los eritrocitos y los granulocitos (debido a su mayor densidad = 1.077), y que floten las células mononucleares (linfocitos y monocitos); lo que permite, que tras la centrifugación sea fácil obtener las células mononucleares de sangre periférica para su estudio.

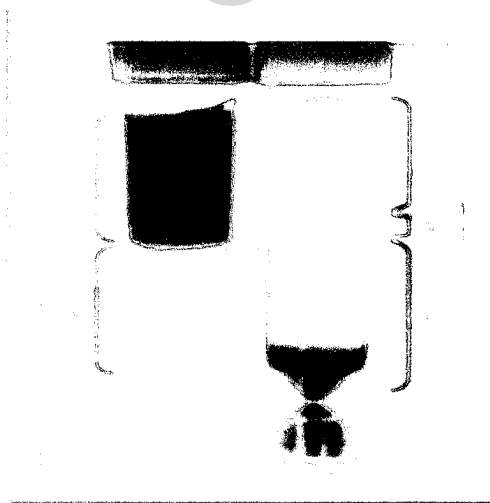


Figura 42: Se observa la muestra de sangre periférica heparinizada (B), sobre el Ficoll (F) (A la izquierda). Luego de la centrifugación (a la derecha) se obtiene la separación celular, de arriba hacia abajo se observa el plasma (P), una capa transparente de monocitos y linfocitos (W), el Ficoll con los granulocitos y los eritrocitos (R).

Materiales

- Tubos cónicos para centrífuga de 15 mL estériles (06 tubos)
- Tubo cónico de plástico de 50 mL estéril (01 tubo)
- Probetas de vidrio 50 mL (02)
- Ficoll-Hypaque (Lymphoprep™) (20 mL)
- Suero Fisiológico estéril (50 mL)
- Pipetas de 10 mL estériles
- Pipetas Pasteur de plástico estériles
- Parafilm
- Guantes de látex o vinilo estériles
- Bombilla de pipeteo (pipettus aid)
- Gradilla
- Centrífuga
- Campana de flujo laminar (en caso de no disponer de una, disponer de un ambiente donde trabajar con la máxima esterilidad posible)

Procedimiento

1. Importante tener Ficoll-Hypaque a temperatura ambiente.
2. Durante todo el procedimiento trabajar con las máximas medidas de esterilidad y bioseguridad, de ser posible dentro de campana de flujo laminar o ambiente dispuesto para tal procedimiento.
3. Limpiar superficie de trabajo con etanol 70% y calzarse guantes y bata de laboratorio. Si no se trabaja en campana de flujo laminar utilizar además gafas como medida de seguridad contra salpicaduras de sangre.
4. Dispensar 20 mL de suero fisiológico en probeta de vidrio estéril y cubrir hasta su uso.
5. Dispensar 20 mL de Ficoll-Hypaque en probeta de vidrio estéril y cubrir hasta su uso.

6. Colocar los cuatro tubos cónicos de centrífuga en gradilla y dispensar 4 mL de Ficoll-Hypaque en cada tubo utilizando pipeta milimetrada.
7. En tubo de 50 mL aparte, mezclar 18 mL de sangre con 18 mL de suero fisiológico utilizando pipetas milimetradas.
8. Cargar 8 mL de sangre diluida con suero fisiológico en pipeta milimetrada y dispensar muy cuidadosamente y lentamente sobre el Ficoll-Hypaque en el tubo de centrífuga. Poner el tubo inclinado y apoyar la punta de la pipeta sobre la pared del tubo para dejar deslizar la sangre suavemente sobre el Ficoll y poder formar una interfase (Ficoll abajo y sangre arriba).
9. Repetir la acción en cada uno de los tubos de centrífuga que contienen Ficoll. Se puede utilizar la misma pipeta.
10. Cubrir todos los tubos y llevar a centrifugar.
11. Centrifugar a 1500 r.p.m. durante 30 minutos, a temperatura ambiente y sin freno al final de centrifugación.
12. Retirar cuidadosamente de la centrífuga y llevar a la gradilla. Verificar la formación de las fases de gradiente de densidad (arriba el plasma sanguíneo, debajo la banda de células mononucleares, debajo el Ficoll-Hypaque, debajo las células PMNs y debajo los eritrocitos aglutinados).
13. Extraer toda la banda de células mononucleares utilizando pipetas pasteur de plástico y dispensar en tubo de centrifugación nuevo. Dispensar las cuatro bandas en un único tubo de centrifugación y luego completar hasta 15 mL con suero fisiológico. Cubrir tubo y llevar a centrifugación.
14. Centrifugar con contrapeso a 1500 r.p.m. durante 10 minutos, a 4°C pudiendo utilizar freno al final de la centrifugación.
15. Extraer tubo de la centrífuga sin agitarlo.
16. Decantar sobrenadante y resuspender células del fondo con un pulso de vórtex o con golpes con las yemas de los dedos.
17. Completar nuevamente hasta los 15 mL con suero fisiológico, cubrir tubo y llevar nuevamente a centrifugar igual que en el paso anterior.
18. Centrifugar con contrapeso a 1500 r.p.m. durante 10 minutos, a 4°C pudiendo utilizar freno al final de la centrifugación.

19. Decantar sobrenadante y resuspender células del fondo con un pulso de vórtex o con golpes con las yemas de los dedos.
20. Agregar 2 mL de Medio de cultivo completo, cubrir tubo y agitar para resuspender células en el medio de cultivo.
21. Contar células.

Finalmente el contaje de células es un paso importante porque es necesario tener ajustado el número de células a una cantidad de 1 millón de células por mL. El contaje se realiza en cámara de Neubauer y con Azul de Tripán. Luego de tener ajustado el número de células se procede al cultivo de las células mononucleares para poder realizar los estudios funcionales.

www.bdigital.ula.ve

ANEXO III

Cámara de Neubauer

La Cámara de Neubauer es un instrumento utilizado en cultivo celular para realizar conteo de células en un medio de cultivo líquido. Esta cámara de contaje está adaptada al microscopio de campo claro o al de contraste de fases. Se trata de un portaobjetos con una depresión en el centro, en el fondo de la cual se ha marcado con la ayuda de un diamante una cuadrícula de dimensiones conocidas. Consta de dos placas de vidrio, entre las cuales se puede alojar un volumen conocido de líquido. Para contar las células de un cultivo líquido, se agrega una gota de este entre estas dos placas y se observa al microscopio óptico la cantidad de células presentes en un campo determinado de la grilla.

Con base en la cantidad de células contadas, conociendo el volumen de líquido que admite el campo de la grilla, se calcula la concentración de células por unidad de volumen de la solución de medio de cultivo inicial.

La fórmula de valoración del número de células (válida universalmente) es la siguiente:

Partículas por μl = (partículas contadas)/(superficie contada($[\text{mm}]^2$) · profundidad de la cámara(mm) · dilución)

Referencia:

Obtenido de "http://es.wikipedia.org/wiki/C%C3%A1mara_de_Neubauer"

TÉCNICAS DE CONTAJE CELULAR

Una suspensión celular se caracteriza por presentar un número de partículas microscópicas dispersas en un fluido. Habitualmente será necesario determinar tanto la densidad de las células en la suspensión como el porcentaje de éstas que son viables.

Para determinar la densidad de las células se emplean diferentes técnicas, desde la relativamente simple cámara de conteo celular de la que existen numerosas variantes, entre ellas la cámara de Neubauer, hasta equipos automáticos de conteo celular como el "Cell Coulter" de la empresa Beckman-Coulter.

El principio del contador celular se basa en la medida de los cambios en la resistencia eléctrica que se producen cuando una partícula no conductora en suspensión en un electrolito atraviesa un pequeño orificio. Como se puede ver en el esquema, una pequeña abertura entre los electrodos es la zona sensible a través de la que pasan las partículas que se encuentran en suspensión. Cuando una partícula atraviesa el orificio desplaza su propio volumen de electrolito. El volumen desplazado es medido como un pulso de voltaje. La altura de cada pulso es proporcional al volumen de la partícula. controlando la cantidad de la suspensión que circula a través del orificio es posible contar y medir el tamaño de las partículas. Es posible contar y medir varios miles de partículas por segundo, independientemente de su forma, color y densidad.

Sin embargo, es posible determinar la densidad celular empleando métodos más sencillos. Nos basta con una cámara de conteo celular, por ej. la cámara de Neubauer, y un microscopio. Una cámara de conteo celular es un dispositivo en el que se coloca una muestra de la suspensión a medir. El dispositivo presenta unas señales que determinan un volumen conocido (x microlitros). Al contar bajo el microscopio el número de partículas presentes en ese volumen se puede determinar la densidad de partículas en la suspensión de origen.

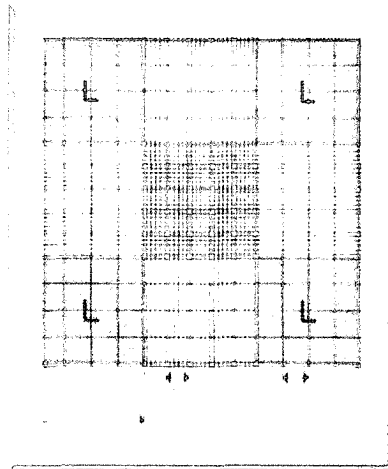


Figura 43: Cuadrado de 3 x 3 mm en una cámara de Neubauer

La cámara de Neubauer es una cámara de conteo adaptada al microscopio de campo claro o al de contraste de fases. Se trata de un portaobjetos con una depresión en el centro, en el fondo de la cual se ha marcado con la ayuda de un diamante una cuadrícula como la que se ve en la imagen. Es un cuadrado de 3 x 3 mm, con una separación entre dos líneas consecutivas de 0.25 mm. Así pues el área sombreada y marcada L corresponde a 1 milímetro cuadrado. La depresión central del cubreobjetos está hundida 0.1 mm respecto a la superficie, de forma que cuando se cubre con un cubreobjetos éste dista de la superficie marcada 0.1 milímetro, y el volumen comprendido entre la superficie L y el cubreobjetos es de 0.1 milímetro cúbico, es decir 0.1 microlitro.

Si se cuenta las cuatro áreas sombreadas (L) observando un total de x células entre las cuatro áreas, la concentración en la suspensión celular será concentración en la suspensión (células / mL) = $10000 (x/4)$

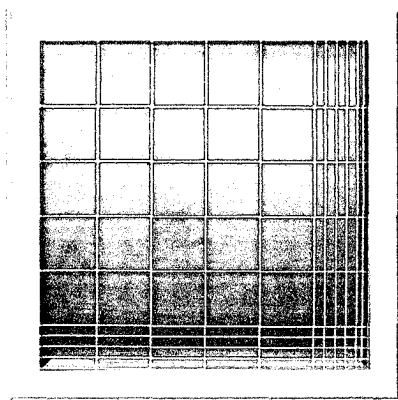


Figura 44: Región de una cámara de Neubauer

En la imagen puedes observar el aspecto de una de las regiones marcadas como L y que en el microscopio se ven como una cuadrícula de 16 pequeños cuadrados de 0.25 milímetros de lado. Esta imagen ha sido tomada empleando un microscopio invertido de contraste de fases.

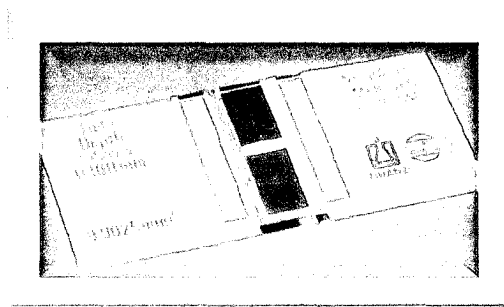


Figura 45: Cámara de Neubauer

Existen numerosos modelos de cámaras de contaje celular adaptadas a su uso en microscopía. En la imagen puedes observar una cámara de Neubauer doble, como las que se usan en el laboratorio de prácticas docentes.

Para determinar la viabilidad celular se emplean diferentes métodos. El más común es el de tinción con azul tripán. El azul tripán es un coloide que se introduce en el interior de las células que presentan roturas en la membrana. Así

pues las células que aparecen en la imagen, claramente de color azul, son consideradas no viables. Asimilar células blancas, por exclusión, a células viables es un error pues por este método se sobrevalora la viabilidad de las células en la suspensión, determinando como inviables sólo aquellas con la membrana rota. Existen otros métodos de determinación de la viabilidad celular como el más preciso de la tinción con yoduro de propidio

www.bdigital.ula.ve