

## Artículo original

# Ésteres glicosídicos de algunos derivados del ácido *ent*-kaur-16-eno-19-oico.

Glycosyl esters of some derivatives of *ent*-kaur-16-en-19-oic acid.

Villasmil Thayded<sup>1</sup>, Peña Alexis<sup>2</sup>, Aparicio Rosa<sup>3</sup>, Usubillaga Alfredo<sup>3\*</sup>.

<sup>1</sup>Postgrado Interdisciplinario de Química Aplicada, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida C.P. 5101. <sup>2</sup>Departamento de Biología y Química. Núcleo Universitario Rafael Rangel, Universidad de Los Andes, Trujillo C.P. 3150, <sup>3</sup>Instituto de Investigación, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida C.P. 5101, República Bolivariana de Venezuela.

Recibido junio 2014 - Aceptado septiembre 2014

## RESUMEN

El ácido *ent*-kaurénico es una sustancia que posee propiedades biológicas interesantes. En este estudio se describe la hemisíntesis de los ésteres glicosídicos de los ácidos 15 $\alpha$ -hidroxi-*ent*-kaur-16-eno-19-oico, 15 $\alpha$ -acetoxi-*ent*-kaur-16-eno-19-oico y 15-oxo-*ent*-kaur-16-eno-19-oico. Los ésteres se obtuvieron mediante reacción de las sales de plata de los ácidos con bromuro de tetraacetato de  $\alpha$ -D-glucopiranososa en benceno seco. Los ésteres carbohidrato se trataron luego con NH<sub>3</sub> en metanol libre de humedad para remover los grupos acetato. La estructura de los compuestos obtenidos se estableció mediante experimentos uni- y bidimensionales de resonancia magnética nuclear.

## PALABRAS CLAVE

Acido 15 $\alpha$ -hidroxi-*ent*-kaur-16-eno-19-oico, ácido 15 $\alpha$ -acetoxi-*ent*-kaur-16-eno-19-oico, ácido 15-oxo-*ent*-kaur-16-eno-19-oico, ésteres glicosídicos.

## ABSTRACT

Kaurenic acid is a substance with interesting biological properties. In the present study the hemisynthesis of the glycosidic esters of 15 $\alpha$ -hydroxy-*ent*-kaur-16-en-19-oic acid, 15 $\alpha$ -acetoxy-*ent*-kaur-16-en-19-oic acid and 15-oxo-*ent*-kaur-16-en-19-oic acid is described. The esters were obtained through reaction of the silver

salt of the acids with  $\alpha$ -D-glucopyranose tetracetyl bromide in dry benzene. The carbohydrate esters were then treated with ammonia in dry methanol to remove the protecting acetate groups. The structure of the carbohydrate esters was established by uni- and bi-dimensional NMR experiments.

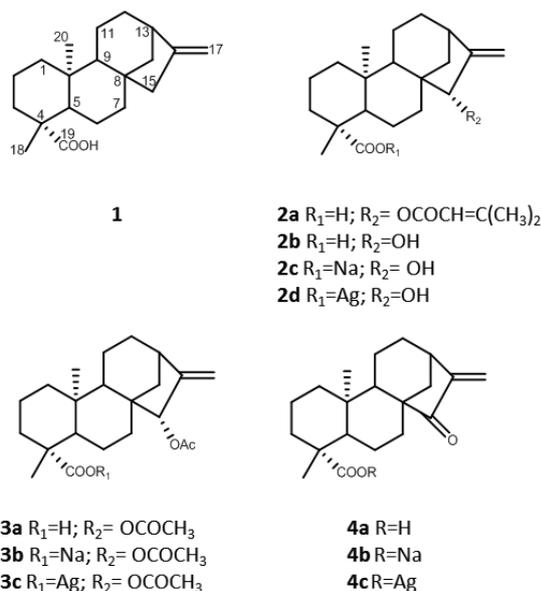
## KEY WORDS

15 $\alpha$ -hydroxy-*ent*-kaur-16-en-19-oic acid, 15 $\alpha$ -acetoxy-*ent*-kaur-16-en-19-oic acid, 15-oxo-*ent*-kaur-16-en-19-oic acid, glucose, esters.

## INTRODUCCIÓN

El ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico es un diterpeno tetracíclico ampliamente distribuido en el reino vegetal ya que interviene en la biosíntesis de las giberilinas, hormonas de crecimiento vegetal. Aunque su concentración en la mayoría de las plantas es sumamente baja, existen algunas especies que acumulan importantes cantidades de este diterpeno. Este es el caso del frailejón, planta resinosa que crece en los páramos de Colombia, Ecuador y Venezuela [1]. Se han descrito alrededor de 180 especies de frailejón de las cuales 74 son nativas de Venezuela. Se han estudiado hasta el momento unas 20 especies de frailejón y se ha encontrado que la resina de estas plantas, sin excepción, está formada por mezclas de diterpenos tipo kaurano y ceras, siendo los ácidos *ent*-kaur-16-eno-19-oico (Fig. 1) y *ent*-kaur-9(11)16-dieno-19-oico los componentes más importantes de la resina [2].

\*Correspondencia al autor: usubillaga@ula.ve

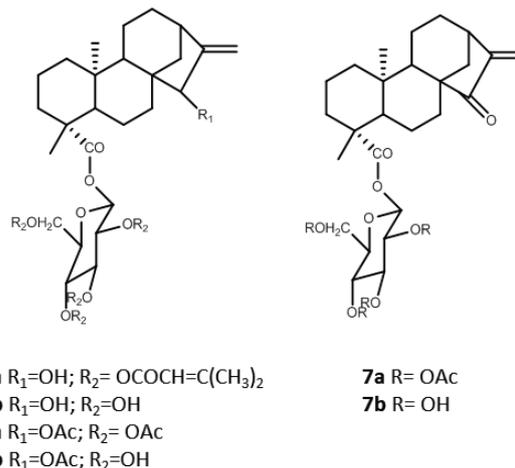


**Fig. 1.** Estructura molecular de los ácidos: *ent*-kaur-16-eno-18-oico (1), *ent*-15 $\alpha$ -senecioxi- kaur-16-eno-19-oico (2a), *ent*-15-hidroxi-kaur-16-eno-19-oico (2b), *ent*-15- $\alpha$ -acetoxi- kaur-16-eno-19-oico (3a) y *ent*-15-oxo- kaur-16-eno-19-oico (4a) y sus sales de sodio y plata.

El ácido *ent*-kaur-16-eno-19-oico, que en adelante llamaremos simplemente ácido kaurénico (1), es una sustancia que posee propiedades biológicas interesantes por lo que ha sido objeto de estudio por parte de muchos investigadores [3]. Se ha encontrado que posee moderada actividad antimicrobiana [4] y propiedades molusquicidas. Investigadores brasileños han reportado que es activo ante el *Trypanosoma cruzi* y se ha demostrado que inhibe el crecimiento de algunos insectos fitófagos [5]. Pero una de sus propiedades más interesantes es su moderada actividad *in vitro* ante varios tipos de cáncer, como pulmón (A-549), sistema nervioso central (XF498), ovario (SK-OV-3), piel (SK-MEL-2) y colon (HCT15) [6].

Sosa y col. (1998) encontraron que el ácido kaurénico es activo *in vivo* ante el melanoma murino B16F1 en ratones C57BL/6 a niveles de 1,0 mg/Kg [7]. Considerando que el ácido kaurénico es prácticamente insoluble en agua, Sosa y col. prepararon el éster glicosídico del ácido kaurénico y observaron que su administración provocaba una disminución en el número de metástasis y prolongaba la supervivencia de los ratones. En vista de que se ha determinado que algunos derivados del ácido kaurénico substituidos en el carbono C-15, como es el caso de los ácidos 15 $\alpha$ -hidroxi-*ent*-kaur-16-eno-19-oico (2b), 15 $\alpha$ -*ent*-acetoxi-kaur-16-eno-19-oico (3a) y 15-oxo-*ent*-kaur-16-eno-19-oico (4a) poseen actividad citotóxica [8,9],

se decidió obtener mediante hemisíntesis los ésteres glicosídicos de estos compuestos. Por otra parte, en estudio realizado por Rodrigues y colaboradores se encontró que 1, 3a y 4a epoxidados en  $\Delta 16$  poseían actividad antimalárica en ratones contaminados con *Plasmodium berghei* [10]. Por consiguiente se decidió obtener también los ésteres glicosídicos de 2b, 3a y 4a con el objeto de posteriormente obtener los derivados epoxidados y estudiar las propiedades citotóxicas y antimaláricas de todas estas sustancias. La Figura 2 muestra la estructura molecular de los ésteres glicosídicos tanto protegidos (5a, 6a y 7a), como desprotegidos (5b, 6b y 7b).



**Fig. 2.** Estructura de los ésteres glicosídicos protegidos y desprotegidos.

Existen algunos glucósidos diterpénicos de origen natural. Los más conocidos son los rebaudósidos, sustancias aisladas de la *Stevia rebaudiana* 180 veces más dulces que la sucrosa, que son utilizadas en Japón, China y Corea del Sur como substitutos del azúcar [11]. Otros glucósidos con esqueleto kaurénico como el atractilósido y el carbonil-atractilósido son tóxicos [12].

Se han descrito varios métodos para obtener ésteres glicosídicos de ácidos carboxílicos. Uno de los más conocidos es la reacción de Mitsunobu [13] que utiliza trifetilfosfina y dietil azodicarboxilato lo que conduce a la inversión de configuración del carbono anomérico del carbohidrato. Wood y Fletcher [14] describieron un método para obtener los ésteres carbohidrato de grupos carboxilo estéricamente impedidos, como es el caso del grupo carboxilo en el ácido kaurénico. En este método la sal de plata del ácido reacciona en benceno seco con el bromuro peracetilado del azúcar y forma el éster carbohidrato acetilado. Este fue el método utilizado por Visbal y colaboradores para obtener los

ésteres del ácido kaurénico con glucosa, ramnosa y galactosa [15]. En el presente trabajo se utilizó este método para obtener los ésteres glicosídicos de los ácidos 15 $\alpha$ -hidroxi-*ent*-kaur-16-eno-19-oico (**2b**), 15 $\alpha$ -acetoxi-*ent*-kaur-16-eno-19-oico (**3a**) y 15-oxo-*ent*-kaur-16-eno-19-oico (**4a**).

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Procedimientos generales.** Los puntos de fusión se midieron en un aparato Fisatom Modelo 430D y no están corregidos. Los espectros infrarrojo se realizaron en un espectrómetro Shimadzu Inffinity y los espectros de resonancia magnética nuclear se efectuaron en un espectrómetro Bruker modelo Avance de 400 MHz. Para la completa elucidación estructural se realizaron experimentos uni y bidimensionales:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , H-H-COSY, DEPT, HMBC, HMQC y NOESY. Los espectros de masas de alta resolución se realizaron en la Universidad de California, se utilizó un equipo Agilent 6210 LCTOP. Para la purificación de las sustancias sintetizadas se utilizó la cromatografía flash en columna sobre gel de sílice (Merck 60, 63-200 mesh) eluyendo las fracciones con hexano y mezclas de hexano-acetona, hexano- acetato de etilo, o hexano-éter dietílico. Para la cromatografía en capa fina (TLC) se usaron placas Merck de gel de sílice de 0,20 mm de espesor sobre un soporte de aluminio. La cromatografía de gases-masas se realizó en un equipo MSD Hewlet Packard 5975 sobre columna HP-5MS (95 % metil-5 % fenil polisiloxano), con helio (0,9 mL/minuto) como gas portador. Se utilizó una temperatura inicial de 250 °C seguida de un programa de 5 °C/minuto hasta 300 °C, manteniéndose la temperatura final 5 minutos. La D-glucopiranososa se adquirió de la compañía Aldrich (Milwaukee, USA). Otros reactivos se adquirieron de la compañía Merck y no se purificaron antes de usarlos. Se utilizó hexano, acetona y acetato de etilo de grado técnico previa destilación. Se preparó benceno y éter anhidros mediante adición de alambre de sodio metálico y destilación.

**Obtención de ácido 15 $\alpha$ -hidroxi-*ent*-kaur-16-eno-19-oico (**2b**).** Se recolectó en julio de 2010 17 kg de hojas de *Coespeletia moritziana* en el Pico del Águila (Muestra testigo AU-27, Herbario MERF). El material seco y molido (5,9 kg) se extrajo a temperatura ambiente con hexano-éter dietílico (4:1). El extracto se agitó con una solución de hidróxido de sodio 0,5 molar. A la fase acuosa, que contenía la fracción ácida, se agregó ácido clorhídrico hasta pH 3,0 y se agitó con hexano. La capa orgánica que contenía los ácidos libres se llevó a sequedad obteniéndose 145 g de residuo que

se trató a temperatura ambiente durante 48 horas con 1,5 L de éter dietílico, obteniéndose una masa cristalina (13,8 g) de ácido 15 $\alpha$ -O-senecioxi-*ent*-kaur-16-eno-19-oico (**2a**), que se filtró y lavó con éter dietílico. Se purificó el ácido **2a** mediante cromatografía flash sobre una columna de gel de sílice, eluyendo con hexano. La pureza del ácido 15 $\alpha$ -O-senecioxi-*ent*-kaur-16-eno-19-oico se comprobó mediante metilación de una alícuota y cromatografía de gases-masas observándose un solo pico a 11,5 min. Peso molecular 414 (C<sub>26</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub>). Se disolvió 10 g de **2a** en 50 mL de dimetilsulfóxido, se agregó 5 gramos de hidróxido de potasio y se calentó a reflujo durante 3 horas. A la solución fría se añadieron 200 mL de agua y se llevó hasta pH 3,0 por adición de ácido clorhídrico. Se agitó con hexano y el extracto hexánico se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se llevó a sequedad obteniéndose 7,4 gramos de una sustancia que según una inspección en capa fina contenía un 95 % de ácido 15 $\alpha$ -hidroxi-*ent*-kaur-16-eno-19-oico (**2b**) y pequeñas impurezas de ácido kaurénico y ácido 15 $\alpha$ -O-senecioxi-*ent*-kaur-16-eno-19-oico. Una cristalización en metanol y una recristalización en benceno permitió obtener ácido 15 $\alpha$ -hidroxi-*ent*-kaur-16-eno-19-oico puro con punto de fusión de 224-228 °C (lit 224-228 °C) [16]. El espectro de gases-masas del ácido metilado mostró un solo pico a 6,18 minutos, ión molecular a m/z 332 (C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>O<sub>3</sub>).

**Obtención de ácido 15 $\alpha$ -acetoxi-*ent*-kaur-16-eno-19-oico (**3a**).** Se disolvieron 3,0 g de ácido 15 $\alpha$ -hidroxi-*ent*-kaur-16-eno-19-oico en 10 mL de anhídrido acético, se agregaron 10 mL de piridina y se sometió la mezcla a reflujo durante 30 minutos. Al cabo de este tiempo se agregó 100 mL de agua helada y se extrajo la mezcla con éter dietílico. Se secó la solución etérea sobre sulfato de sodio anhidro y se llevó a sequedad. Se evaporó la masa sólida tres veces luego de añadir pequeñas cantidades de tolueno a fin de eliminar completamente la piridina. Se purificó el residuo sólido mediante cromatografía flash sobre una columna de gel de sílice eluyendo primero con hexano y luego con hexano-acetato de etilo (4:1). Se obtuvo 2,8 g de ácido 15 $\alpha$ -acetoxi-*ent*-kaur-16-eno-19-oico puro (**3a**), punto de fusión 172-174 °C, idéntico al mismo ácido aislado de *Espeletia schultzei* [17] (TLC, IR). El ácido metilado fue inspeccionado mediante cromatografía de gases-masas, observándose un solo pico a 7,19 minutos, peso molecular m/z 374 (C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>O<sub>4</sub>).

**Obtención del ácido 15-oxo-*ent*-kaur-16-eno-19-oico (**4a**).** Se disolvieron 2,1 g de ácido 15 $\alpha$ -hidroxi-*ent*-kaur-16-eno-19-oico en 10 mL de piridina y se agregó un exceso de complejo CrO<sub>3</sub>-piridina, reactivo

de Sarett [18]. Se dejó toda la noche a 30 °C bajo atmósfera de argón y agitación magnética. Al día siguiente un ensayo en capa fina indicó que se había consumido por completo el producto inicial y se había formado 100 % del ácido 15-oxo-*ent*-kaur-16-eno-19-oico (**4a**, Rf =062, solvente, hexano-acetato de etilo 4:1). Se añadieron 200 mL de agua y se agitó tres veces con éter dietílico. El extracto etéreo se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporó a sequedad. El residuo se disolvió en hexano caliente y se purificó sobre una columna de sílica gel (80 g) eluyéndose con hexano y luego con mezclas de hexano-acetato de etilo obteniéndose 1,82 g de **4a** con punto de fusión de 184-185 °C (lit. 184-5 °C) [9], UV  $\lambda_{\max}$  234 nm (log  $\epsilon$  3,85), IR (KBr)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup> 3072, 2934, 2864, 1724, 1690, 1644, 1470, 1256, 935.

**Preparación de las sales de plata de 2b, 3a y 4a.** Se disolvieron 5,0 g de **2b** en 100 mL de metanol y se añadieron dos gotas de solución de fenoltaleína. Se tituló con una solución 0,5 molar de hidróxido de sodio hasta que la solución tomó un color ligeramente rosado, para formar la sal sódica **2c**. Se añadieron 3,0 g de NO<sub>3</sub>Ag disueltos en 10 mL de agua y se dejó en la oscuridad durante 3 horas. Se filtró rápidamente la sal de plata (**2d**) sobre un embudo de frita de vidrio y se puso en la estufa a 50 °C durante la noche. Al día siguiente se guardó la sal de plata formada (4,9 g) en un desecador al vacío y en la oscuridad. Se utilizó el mismo procedimiento que se acaba de describir para preparar 2,40 g de **3c** a partir de 1,9 g de **3a** y 1,15 g de **4c** a partir de 0,9 g de **4a**.

**Obtención del bromuro de tetraacetato de  $\alpha$ -D-glucopiranos.** Se utilizó el procedimiento de Redemann y Niemann [19]. La cantidad de 22 g de monohidrato de glucosa produjeron 35 g de bromuro que se recrystalizó en éter di-isopropílico (p.f. 86-88 °C). Este producto se conserva indefinidamente en la nevera a -10 °C bajo éter di-isopropílico.

**Preparación del éster glicosídico del ácido 15 $\alpha$ -hidroxi-*ent*-kaur-16-eno-19-oico (**5b**).** Se suspendió la sal de plata (**2d**, 2,1 g, 4 mmol) en benceno seco (tratado con alambre de sodio) en un balón especialmente tratado a la llama y al vacío para eliminar toda la humedad. Se añadieron 2,2 g (5,4 mmol) de bromuro de tetra-acetato de  $\alpha$ -D-glucopiranos disuelto en benceno seco y se dejó bajo agitación en la oscuridad en atmósfera de argón durante 12 horas. Transcurrido ese tiempo se filtró al vacío sobre frita de vidrio. El filtrado se llevó a seco a presión reducida y se purificó mediante cromatografía flash sobre gel de sílice eluyendo con mezclas de hexano-acetato de etilo obteniéndose

1,1 g del éster glicosídico acetilado (**5a**) del ácido 15 $\alpha$ -hidroxi-*ent*-kaur-16-eno-19-oico (rendimiento del 34 % con un punto de fusión de 120-122 °C). El espectro de masas de alta resolución, medido bajo la forma de sal sódica mostró un peso molecular de 671,3908 (C<sub>34</sub>H<sub>48</sub>O<sub>12</sub>.Na). IR (KBr)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup> 3068, 2949, 2862, 1759, 1736, 1234, 1217, 1082, 905. Espectro de H<sup>1</sup>-RMN (Tabla 1). Espectro de C<sup>13</sup>-RMN (Tabla 2). El éster protegido se sometió a hidrólisis suave mediante reacción con NH<sub>3</sub> seco en solución metanólica. Una solución de 1,0 g de **5a** en 100 mL de metanol seco se saturó con NH<sub>3</sub> obtenido mediante reacción de NH<sub>4</sub>OH con KOH y secado en una columna de sulfato de sodio anhidro. Esta hidrólisis condujo a la obtención del éster glicosídico libre (**5b**) del ácido 15 $\alpha$ -hidroxi-*ent*-kaur-16-eno-19-oico en forma cuantitativa (0,8 g). El éster cristalizó directamente de la solución metanólica, con punto de fusión de 108-110 °C. IR (KBr)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 3599, 3398, 3068, 2949, 2920, 2854, 1724, 1635, 1074, 993. Espectro de H<sup>1</sup>-RMN (Tabla 1). Espectro de C<sup>13</sup>-RMN (Tabla 2).

TABLA 1

Desplazamientos químicos de los protones de los ésteres glicosídicos protegidos (**5a**, **6a** y **7a**) y libres (**5b**, **6b** y **7b**).

H	5a	6a	7a	5b	6b	7b
1a	0,77 dt 4,14 Hz	1,01 dt 4,14 Hz	0,79 dt 4,14 Hz	0,75 dt 4,14 Hz	0,72 dt 3,13 Hz	0,7 dt 3,13 Hz
1b	1,84 m	1,86 m	1,65 m	1,77 m	1,75 d 6,4 Hz	1,71 m
2a	1,55 m	1,42 m	1,44 m	1,48 m	1,45 m	1,41 m
2b	2,12 m	Na	1,80 m	2,17 m	2,18 m	2,14 m
3a	1,05 m	0,98 m	1,03 m	1,06 m	1,04 m	1,01 m
3b	2,27 m	2,13 m	2,14 m	2,35 m	2,37 m	2,35 m
5	1,09 m	1,07 dd 1,12 Hz	1,16 m	1,11 m	1,03 d 10,7 Hz	1,16 t 3,7 Hz
6a	1,90 m	1,85 m	1,85 m	1,97 d 13,0 Hz	1,98 d 10 Hz	2,08 m
6b	2,30 m	1,60 m	Na	2,37 d 13,0 Hz	2,35 m	2,38 m
7a	1,38 m	1,50 m	1,35 m	1,40 m	1,30 m	1,42 m
7b	1,45 m	1,54 m	Na	1,43 m	1,69 m	2,03 m
9	1,03 m	1,19 m	1,22 m	1,02 m	1,13 m	1,28 m
11a	1,54 m	1,52 m	1,62 m	1,54 m	1,50 m	1,57 m
11b	1,59 m	1,56 m	1,67 m	1,59 m	1,53 m	2,15 m
12a	1,45 m	1,68 m	1,68 m	1,46 m	1,49 m	1,50 m
12b	1,35 m	1,24 m	1,77 m	1,37 m	1,38 m	1,58 m
13	2,58 sa	2,77 sa	3,02 sa	2,54 sa	2,67 sa	2,83 sa
14a	1,06 m	1,43 m	1,37 m	1,03 d 6,8 Hz	1,48 m	1,01 d 3,9 Hz
14b	2,10 dd 2,11 Hz	1,87 d 12,1 Hz	2,30 d 11,8 Hz	2,11 d 6,8 Hz	2,08 m	2,46 d 12,0 Hz
15a	2,03 m	5,24 brs	-----	1,99 t 13,0 Hz	5,51 s	-----
15b	2,06 m	-----	-----	2,01 d 6,2 Hz	-----	-----
17a	4,73 br	5,42 brs	5,25 s	4,84 brs	5,09 s	5,18 s
17b	4,79 brs	5,72 brs	5,92 s	4,87 brs	5,22 s	6,04 s
18	0,78 s	0,83 s	0,88 s	1,20 s	1,30 s	1,26 s
20	1,14 s	1,16 s	1,18 s	1,27 s	1,21 s	1,26 s
CH3CO	-----	2,02 s	-----	-----	2,12 s	-----
1'	5,75 d 7,6 Hz	5,72 d 7,8 Hz	5,73 d 7,8 Hz	6,19 d 8,0 Hz	6,13 d 7,8 Hz	6,25 d 7,8 Hz
2'	5,24 t 7,8 Hz	5,2 d 7,8 Hz	5,24 t 8 Hz	4,2 t 8,1 Hz	4,23 td 8,4 Hz	4,20 t 8,1 Hz
3'	5,22 t 9,0 Hz	5,25 t 9,0 Hz	5,22 t 9,0 Hz	4,25 t 8,1 Hz	4,22 t 9,0 Hz	4,25 t 9,0 Hz
4'	5,14 t 9,0 Hz	5,14 d 9,2 Hz	5,14 d 9,4 Hz	5,14 d 9,4 Hz	4,28 t 9,0 Hz	4,37 t 9,2 Hz
5'	3,82 m	3,8 m	3,81	3,81 m	4,05 m	4,03 d
6a'	4,07 d 12,3 Hz	4,07 dd 1,3 y 12,0 Hz	4,07 dd 1,3 y 12,0 Hz	4,07 dd 1,3 y 12,0 Hz	4,36 d 12,0 Hz	4,37 d 12,0 Hz
6b'	4,29 dd 4,8 y 12,0 Hz	4,28 dd 4,9 y 12,0 Hz	4,24 dd 4,9 y 12,0 Hz	4,24 dd 4,9 y 12,0 Hz	4,44 d 12,0 Hz	4,44 d 12,0 Hz

TABLA 2

Desplazamientos químicos de C-13 de los ésteres glicosídicos protegidos (**5a**, **6a**, **7a**) y libres (**5b**, **6b**, **7b**).

C	5a	6a	7a	5b	6b	7b
1	39,9	40,0	39,9	41,0	41,0	40,4
2	19,0	19,1	19,0	19,7	19,8	19,5
3	38,3	37,9	37,8	38,6	38,3	38,5
4	44,2	44,2	56,3	43,7	44,6	44,4
5	56,3	56,8	20,0	57,6	57,5	57,0
6	20,0	20,7	33,8	22,4	21,6	20,8
7	41,6	32,8	52,6	41,8	35,4	34,7
8	44,6	44,2	51,6	44,6	48,1	53,0
9	51,6	52,9	40,4	55,3	53,5	52,2
10	40,9	39,9	18,5	40,1	40,5	40,9
11	18,5	18,5	32,4	18,9	19,0	19,0
12	33,6	34,8	38,2	33,7	33,2	32,6
13	44,6	42,8	36,7	44,5	43,2	38,7
14	40,0	37,4	210,0	39,9	37,5	36,9
15	49,5	83,1	149,5	49,3	83,5	210,2
16	156,0	156,0	149,5	156,0	156,6	147,0
17	103,5	110,2	114,7	103,7	110,3	114,0
18	28,9	28,8	28,9	28,8	29,9	28,8
19	176,1	176,8	175,6	177,0	177,2	177,1
20	16,2	16,4	16,0	16,1	16,4	16,1
CH <sub>3</sub> COO	-----	20,3	-----	-----	21,5	----
CH <sub>3</sub> COO	-----	171,2	-----	-----	171,1	----
1'	91,3	91,3	91,3	95,9	96,2	96,2
2'	70,4	70,4	70,3	74,2	74,5	74,4
3'	73,2	73,3	73,2	79,2	79,5	79,5
4'	68,3	68,3	68,3	71,2	71,5	71,4
5'	72,9	72,6	72,6	79,5	79,7	79,7
6'	61,8	61,8	61,8	62,3	62,5	62,5

**Síntesis del éster glicosídico del ácido 15 $\alpha$ -acetoxi-*ent*-kaur-16-eno-19-oico (6b).** Se suspendió 0,8 g (1,71 mmol) de sal de plata del ácido 15 $\alpha$ -acetoxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico (**3c**) en benceno seco. Se añadió 0,75 g (1,83 mmol) de bromuro de tetra-acetato de  $\alpha$ -D-glucopiranososa disuelto en benceno seco y se dejó bajo agitación en la oscuridad en atmósfera de argón durante 12 horas. Transcurrido ese tiempo se filtró al vacío sobre frita de vidrio. El filtrado se llevó a seco a presión reducida y se purificó mediante cromatografía flash sobre columna de gel de sílice eluyendo con mezclas de hexano-acetato de etilo. Se obtuvo 0,55 g del éster glicosídico acetilado (**6a**), punto de fusión 139-140 °C, IR (KBr)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 3067, 2947, 1759, 1738, 1371, 1219, 906., El espectro de masas de alta resolución, medido bajo la forma de sal sódica mostró un peso molecular de 713,3144 (C<sub>36</sub>H<sub>50</sub>O<sub>13</sub>.Na). IR (KBr)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 3072, 2956, 2870, 1755, 1468, 1382, 1237, 1061, 902. Espectro de H<sup>1</sup>-RMN (Tabla 1). Espectro de C<sup>13</sup>-RMN (Tabla 2). Se hidrolizó el éster 6a con NH<sub>3</sub> seco utilizando el mismo procedimiento ya descrito. El éster libre 6b cristalizó directamente de la solución metabólica (0,40g), punto de fusión 167-168 °C; IR (KBr)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 3412, 3080, 2932, 1736, 1663, 1371, 1240, 1045, 1024, 901; espectro de H<sup>1</sup>-RMN (Tabla 1), espectro de C<sup>13</sup>-RMN (Tabla 2).

**Síntesis del éster glicosídico del ácido 15-oxo-**

***ent*-kaur-16-eno-19-oico (7b).** Se suspendió 0,9 g (2,05 mmol) de sal de plata del ácido 15-oxo-*ent*-kaur-16-eno-19-oico (**4c**) en benceno seco. Se añadió 1,0 g (2,44 mmol) de bromuro de tetra-acetato de  $\alpha$ -D-glucopiranososa disuelto en benceno seco y se dejó bajo agitación durante 12 horas en atmósfera de argón, en la oscuridad. Transcurrido este tiempo se filtró al vacío sobre frita de vidrio. El filtrado se llevó a seco a presión reducida y se purificó mediante cromatografía flash sobre columna de gel de sílice eluyendo con mezclas de hexano-acetato de etilo. Se obtuvo 0,95 g del éster glicosídico acetilado (**7a**), punto de fusión 157-159 °C; IR (KBr)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup>: 3084, 3955 2862, 1751, 1645, 1371, 1229, 1074, 906. El espectro de masas de alta resolución, medido bajo la forma de sal sódica mostró un peso molecular de 669,2881 (C<sub>34</sub>H<sub>46</sub>O<sub>12</sub>.Na). Espectro de H<sup>1</sup>-RMN (Tabla 1), espectro de C<sup>13</sup>-RMN (Tabla 2). Se hidrolizó el éster **7a** con NH<sub>3</sub> seco utilizando el mismo procedimiento ya descrito. El éster libre **7b** cristalizó directamente de la solución metanólica (0,70 g), punto de fusión 150-151 °C. Espectro de H<sup>1</sup>-RMN (Tabla 1), espectro de C<sup>13</sup>-RMN (Tabla 2).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El ácido 15 $\alpha$ -hidroxi-*ent*-kaur-16-eno-19-oico (**2b**) se obtuvo mediante hidrólisis del ácido 15 $\alpha$ -O-senecioxi-*ent*-kaur-16-eno-19-oico (**2a**) aislado de la *Coespeletia moritziana*. El ácido 15 $\alpha$ -acetoxi-*ent*-kaur-16-eno-19-oico (**3a**) y el ácido 15-oxo-*ent*-kaur-16-eno-19-oico (**4a**) se obtuvieron de **2b** mediante acetilación y oxidación respectivamente. Las estructuras del ácido kaurénico y sus derivados se presentan en la Figura 1. Para obtener los ésteres glicosídicos de **2b**, **3a** y **4a** se preparó las sales de plata de estos tres compuestos (**2d**, **3c** y **4c**) mediante reacción de las respectivas sales sódicas con nitrato de plata. Para lograr la esterificación de los kaurenos fue necesario hacerlos reaccionar con bromuro de tetra-acetilglucosa que se obtuvo mediante el procedimiento de Redemann y Niemann [19]. Esta reacción se realiza en solución de benceno anhidro, el ión bromuro reacciona con el ión plata formando bromuro de plata que es insoluble en benceno. Simultáneamente el carbono anomérico de la glucosa protegida forma un enlace con el grupo carboxilato del kaureno. Los ésteres glicosídicos libres (**5b**, **6b** y **7b**) se obtuvieron mediante hidrólisis suave de los grupos acetilo tratando **5a**, **6a** y **7a** con NH<sub>3</sub> seco en solución de MeOH absoluto.

En la reacción entre la sal de plata y el bromuro de tetra-acetilglucosa se tiene que evitar la presencia

de agua porque el agua reacciona con el halógeno del azúcar, por esta razón se utilizó benceno seco que fue tratado con alambre de sodio y el kaurenato de plata se secó al vacío sobre pentóxido de fósforo. Sin embargo es inevitable que el bromuro de tetraacetilglucosa contenga trazas de humedad, ya que si se trata de secarlo así sea un corto tiempo en un desecador, adquiere un color negro, signo de descomposición. Por consiguiente es inevitable tener trazas de humedad en el transcurso de la reacción y esta pequeña cantidad de agua es probablemente la responsable de que el rendimiento de la reacción no pase del 30 %.

La configuración del grupo carboxílico tanto del ácido kaurénico (**1**), como de los derivados 15 $\alpha$ -acetoxi (**3a**) y 15-oxo (**4a**) es  $\alpha$ -axial con respecto al plano de los anillos A/B del esqueleto kaurénico. En vista de que el metilo C-20 tiene también configuración  $\alpha$ -axial el grupo carboxílico está sometido a un impedimento estérico que puede ser parcialmente responsable del bajo rendimiento de la reacción.

La constante de acoplamiento de los hidrógenos anoméricos, tanto de los productos protegidos (**5a**, **6a** y **7a**) como de los ésteres que tienen los hidroxilos libres (**5b**, **6b** y **7b**) es de aproximadamente 8 Hz, lo que quiere decir que el enlace que une la glucosa al grupo carboxilo es  $\beta$  y por consiguiente ecuatorial con respecto al plano de la glucosa. La asignación de los desplazamientos químicos tanto protónicos como de carbono 13 de todos los compuestos, se realizó con ayuda de experimentos  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY, DEPT, HMQC y HMBC. Estos valores se presentan en las Tablas 1 y 2. Experimentos NOESY indican que no hay interacción de los átomos de hidrógeno del azúcar con los átomos de hidrógeno de los kaurenos, lo que indica que la molécula de azúcar está orientada hacia abajo con respecto al plano del kaureno. Un análisis de rayos-X del éster glicosídico del ácido kaurénico, obtenido por Mora y col. 2004 [20], confirmó la configuración deducida de los experimentos de resonancia magnética nuclear.

En la Tabla 1 se presentan los desplazamientos químicos protónicos de los ésteres glicosídicos protegidos (**5a**, **6a** y **7a**) y libres (**5b**, **6b** y **7b**). Los espectros de resonancia de los ésteres glicosídicos protegidos se ejecutaron en solución de cloroformo deuterado. Los espectros de resonancia de los ésteres desprotegidos (**5b**, **6b** y **7b**) que tienen todos los grupos hidroxilo libres y por consiguiente son compuestos polares insolubles en cloroformo, se realizaron en piridina deuterada. Aunque los compuestos son muy parecidos entre sí, las señales de los compuestos disueltos en cloroformo difieren

de los disueltos en piridina, sobre todo en aquellos protones que están cerca de grupos anisotrópicos, como los carbonilos y el carbono anomérico de la glucosa. Por ejemplo en los tres productos protegidos (**5a**, **6a** y **7a**), el protón H-1 unido al carbono anomérico del azúcar muestra un desplazamiento que es prácticamente idéntico ( $\delta$  5,75,  $\delta$  5,72 y  $\delta$  5,73) en cambio en los ésteres donde los hidroxilos están libres, la señal de este protón aparece alrededor de  $\delta$  6,20. Los protones H-2', H-3' y H-4' muestran igualmente un desplazamiento diamagnético (hacia campo más alto) en aquellos compuestos que tienen los hidroxilos libres, este desplazamiento es de casi 1,0 ppm. En cambio los hidrógenos H-4' y H-5' muestran un ligero desplazamiento paramagnético (0,2-0,3 ppm).

El grupo acetilo ubicado sobre el carbono C-15 influye notablemente sobre el desplazamiento químico de los protones del doble enlace exocíclico (H-17a y H-17b), Hay un desplazamiento paramagnético (hacia campo más bajo) de estos dos protones en **6a** debido a la influencia del carbonilo del grupo acetilo. La influencia del carbonilo es aún más notable en el caso del grupo 15-oxo ya que los protones H-17a y H-17b se desplazan a  $\delta$  5,25 y  $\delta$  5,92. Pero la influencia de estos carbonilos afecta también los protones H-9, H-13, H-14 que se desplazan a campo más alto, sobre todo en el caso de los compuestos **7a** y **7b**.

La presencia del grupo acetoxi produce el desplazamiento paramagnético del carbono C-15 a 83,1 ppm y en el caso del compuesto 15-oxo (**7a** y **7b**) a 210 ppm. Obviamente, las señales de los carbonos C-7, C-9, C-12, C-13 y C-14 vecinos a C-15 sufren un desplazamiento a campo más alto, ya que el efecto del doble enlace del grupo C=O es contrario en los carbonos vecinos, al efecto observado sobre los protones que portan dichos carbonos.

Las señales de los dos protones exocíclicos (H-17a y H-17b) que aparecen en el ácido kaurénico a  $\delta$  4,73 y  $\delta$  4,79 se desplazan a campo más bajo en **6a** ( $\delta$  5,22  $\delta$  5,73) y en **7a** ( $\delta$  5,25  $\delta$  5,92). Estos valores cambian ligeramente en los ésteres glicosídicos libres **5b**, **6b** y **7b** que se realizaron en piridina deuterada.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico, Tecnológico y Artístico de la Universidad de Los Andes (ULA) por el financiamiento concedido a través de proyecto FA-509-11-08-A y al Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear de la ULA por los espectros uni- y bi-dimensionales realizados.

---

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**


---

- [1] Vareschi V. Flora de los páramos de Venezuela. Ediciones del Rectorado, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. 1970.
- [2] Usubillaga A, Romerc M, Aparicio R. Kaurenic acids in Espeletiinae. Acta Hort. 2003; 576: 115-117.
- [3] Ghisatberti EL. The biological activity of naturally occurring kaurane diterpenes Fitoterapia. 1997; LXVIII: 303-325.
- [4] Oguntimein BO. The terpenoids of *Anonna reticulata*. Fitoterapia. 1987; 58: 411-413.
- [5] Alves TMA, Chaves PPG, Santos LMST, Nagem TJ, Murta SMF, Cevaloro IP, et al. A diterpene from *Mikania obtusata* active on *Trypanosoma Cruzi*. Planta Med. 1995; 61: 85-87.
- [6] Ryu SY, Ahn JW, Jan YN, Han BH, Kim SH. *In vitro* antitumor activity of diterpenes from *Aralia cordata*. Arch Pharm Res. 1996; 19(1) :76-78.
- [7] Sosa-Sequera M, Suarez O, Reina R, Ramirez M, Usubillaga A. Acción del ácido kaurénico contra el melanoma experimental. Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam. 1998; 48(4): 78.
- [8] Morales A, Pérez P, Mendoza R, Compagnone R, Suarez A, Arvelo F, Ramirez J, Galindo-Castro I. Cytotoxic and proapoptotic activity of ent-16 $\beta$ -17 $\alpha$ -dihydroxykaurane in human mammary carcinoma cell line MCF.7. Cancer Lett. 2005; 218: 109-116.
- [9] Ruiz Y, Rodrigues J, Arvelo F, Usubillaga A, Monsalve M, Diez N, Galindo- Castro I. Cytotoxic and apoptosis-inducing effect of ent-15-oxo-kaur-16-en-19-oic acid, a derivative of grandiflorolic acid from *Espeletia schultzei*. Phytochem. 2008; 69: 432-438.
- [10] Rodrigues, J, Gamboa N, Monsalve M, Usubillaga A. Síntesis y actividad antimalárica de algunos derivados kaurénicos. Resumen *in extenso* FI 23. Memorias del VII Congreso Venezolano de Química, Mérida, 7-10 de Noviembre. 2005.
- [11] Kobayashi M, Horikawa S, Degrandi I, Ueno J, Misuhashi. Dulcosides A and B, new diterpenes glycosides from *Stevia rebaudiana*. Phytochem. 1997;16.1404-1408.
- [12] Norito K, Hiroshi K Kasuo Y, Osamu T. Paniculosides 1 — V. Diterpene glucopyranosides from *Stevia ovata* Lag. Chem Pharm Bull. 1978; 26: 2266-2267.
- [13] Mitsunobu O, Yamada M, Mukaiyama T. Preparation of esters of phosphoric acid by the reaction of trivalent phosphorus compounds with ethyl azodicarboxylate in the presence of alcohols. Bull Chem Soc Jpn. 1967; 40: 935-939.
- [14] Wood J, Fletcher HG. The anomeric 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-O-mesitoyl-D- glucopyranoses and their behavior with alkali. J. Am. Chem Soc. 1956; 78:207- 210.
- [15] Visbal T, Martin P, Mora A, Delgado GE, Usubillaga A. Carbohydrate esters of kaurenic acid. Rev Latinoam Quím. 2004; 32:67-75.
- [16] Piozzi F, Sprio V, Passannanti S, Mondelli R. Struttura dell'acido grandiflorolico. Gaz Chim Ital. 1968; 98(8-9): 907-910.
- [17] Brieskorn CH, Pohlmann E. Diterpene von kaurantyp aus der Composite *Espeletia Schultzei* (Wedd). Tetrahedron Lett. 1968; 54: 5661-5668.
- [18] Poos GI, Arth GE, Beyler RE, Sarett LH. Approaches to the total synthesis of adrenal steroids V. 4b-methyl-7-ethylendioxy-1,2,3,4,4a,4b,5,6,7,8,10,10ab-dodecahydrophenanthrene-4 $\beta$ -oI-1-ene and related tricyclic derivatives. J. Am. Chem Soc. 1953; 75: 422-429.
- [19] Redemann CS, Niemann C. Acetobromoglucose (2,3,4,6)tetraacetyl- $\alpha$ -D- glucopyranosyl bromide. In collective Vol III, p.11-14 Organic Synthesis, E. C. Horning, Editor. New York: John Wiley and Sons, Inc.; 1955.
- [20] Mora AJ, Delgado GE, Vaughan GBM, Martin P, Visbal T, Usubillaga A. A peracetylated glucosyl ester of kaurenic acid . Acta Crys. 2004; E60: 334-336.