

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES



TRABAJO ESPECIAL DE GRADO EN LICENCIATURA DE QUÍMICA

HEMISÍNTESIS DE DERIVADOS DEL ÁCIDO KAURÉNICO

www.bdigital.ula.ve

Autor: María Alejandra Oriana

García Bolaño

Tutor: Dr. Andrés Abad

Tutor Académico: Dr. Carlos Ayala

Co-Tutor: Dra. Rosa Aparicio

Febrero, 2023

MÉRIDA-VENEZUELA

AGRADECIMIENTOS

Siempre decimos que las personas más importantes en nuestras vidas son nuestros padres, es erróneo, ya que la persona más importante en nuestra vida, somos nosotros mismos; en consecuencia, estoy muy agradecida con la mujer que soy en estos momentos. No soy la misma persona, que se graduó hace 9 años de TSU. Me siento tan distinta, pero muy agradecida con todas las experiencias tanto académicas y personales. Hubo muchos momentos difíciles, durante la dedicación de esta carrera universitaria. Nunca pensé en sentir mucha ansiedad, tristeza, miedo, pérdida de esperanza y de mucha soledad. En el año 2019, pasaron muchas cosas inexplicables, pero de algo que estoy 100 % segura, que Dios nunca me abandonó. Yo le agradezco a Dios por este hermoso trabajo, que me ha hecho saber lo valiosa que soy.

Donde la vida comienza y el amor nunca termina, le agradezco a Emile Bolaño, Ricardo García, Luis Materán, Ariangie García, Luiseth Materán, Santiago García y David García. Gracias por todo el apoyo, sé que a veces tengo un carácter un poco atravesado, pero no saben lo importante que son para mí. Sin ustedes mi vida estaría vacía, los quiero mucho a todos. Seguidamente, mis primos (as), tíos (as), mis abuelitos (as) que están en el cielo, y sobre todo a mi abuelita Vestalia, que está en vida todavía y desde siempre me ha apoyado en todos los sentidos. A todos mis familiares, en especial a mi Toby gracias de corazón, los quiero mucho.

Uno recuerda con aprecio a sus profesores brillantes, pero con gratitud aquellos que tocaron nuestros sentimientos. Desde el día uno, confió en mí, sin conocerme y es el Dr. Luis Rojas Fermín, profe donde quiera que este, muchas gracias. Un gran agradecimiento y desde mi corazón muchas bendiciones a todos los integrantes del laboratorio de Síntesis del Instituto de Investigaciones “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro” en la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes (ULA).

Los profesores dejan una huella para la eternidad, nunca puedes saber cuándo se detiene su influencia. Con todo mi corazón, les agradezco a mis queridos tutores, Dr. J. Andrés Abad, Dr. Carlos Ayala y la Dra. Rosa Aparicio por brindarme mucho apoyo incondicional, y sobre todo las cosas, brindarme su amistad. Que Dios los bendiga, siempre les estaré agradecida con todo mi corazón. Les agradezco a mis profesores de Ciencias en especial a la Dra. Marietta Viscaya, Dr. Freddy Carrillo y el Dr. Carlos Rondón, por ayudarme en mi trabajo de grado. Por otra parte, existen personas que me ayudaron con mucho cariño durante la realización de este trabajo de grado y son mi amigo Msc. Andrés Márquez, la Lic. Betania Ariza que proviene de la Universidad Federal de São Carlos- Brasil y la Farm. Garielys López. Mil gracias, aquí siempre tendrán a una amiga.

La verdadera amistad resiste el tiempo, la distancia y el silencio. Mi amiga querida Olga Ibarra, que al estar lejos siempre está presente, Dios te bendiga a ti y a tus bebés hermosos. Yairys Hernández, por sus lindos consejos de perseverancia. Surimar Mora y Sara Marcano por estar pendiente de mí y darme muchos ánimos. Mi colega Betzabeth Aldana, por su cariño y sus buenos consejos, mi gran amigo José Henrys, que le agradezco de todo corazón su valiosa amistad, Richard Marquéz, que me alentó de seguir estudiando, para poder prepararme mejor en la vida. Mis profesores del IUT Dr. Federico Rivero Palacio, Douglas Rodríguez y Lubin Gutiérrez, por siempre darme su gran apoyo y consejos.

Gracias a mi ULA y esta hermosa ciudad que tanto le agradezco. Por medio de esta experiencia he conocido a grandes personas que han estado a mi lado, en los momentos buenos y en especial malos. Amigos los quiero mucho y que Dios los bendiga, María Isabel Albarran, Sara Moreno, Maricela Bustos, Rodrigo Montoya, Elías Posadas, Adriana Rondón, Mariana Serrano, Yubitzy Rivas, Keyni Mancini, Antonella Baldeón, Eylens Rangel, y pare de contar. Pero, sobre todo existen seis personas que les agradezco con todo mi corazón en mi emprendimiento de ayudar a los estudiantes con química, física, medicina y matemática, Ronald Zambrano, Carla Coy, Alex Yoris, Juan Coy, María Laura Zambrano y Wilmer Torres.

*Todos tenemos una reserva de fuerza insospechada,
que emerge cuando la vida nos pone a prueba*

Isabel Allende...

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE

	PÁGINA
INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO	3
2.1. Familia Asteraceae.....	3
2.1.1 Aspectos Botánicos.....	3
2.2 Género <i>Espeletia</i>.....	5
2.3. Especie.....	8
2.4. Biosíntesis de productos naturales	10
2.4.1 Biosíntesis de los terpenos	13
2.4.2. Diterpenos	17
2.5. Modificaciones estructurales del ácido <i>ent</i>-kaurénico reportadas en la literatura.....	20
2.5.1 Reacciones de Reducción.....	20
2.5.1.1 Hidrogenación.....	20
2.5.1.2 Reducción con tetrahidruro de Aluminio y Litio (LiAlH ₄)	21
2.5.2 Reacciones de Oxidación	23
2.5.2.1 Reacción de epoxidación	23
2.5.2.2 Reacción de hidroformilación.....	25
2.5.2.3 Hidroxilación con tetraóxido de osmio (OsO ₄)	27
2.5.2.4 Reacción de ozonólisis O ₃	29

2.5.2.5 Oxidación con dióxido de selenio (SeO ₂).....	31
2.5.3 Reacciones de esterificaciones.....	36
2.5.3.1 Esterificación de Fischer.....	36
2.5.3.2 Síntesis de cloruros de ácido.....	37
2.5.3.3. Esterificación con diazometano.....	40
2.5.3.4 Esterificación de Steglich.....	42
2.5.4. Reacciones de Adición.....	44
2.5.4.1. Reacción de Koenings Knorr.....	44
2.6 Técnicas de separación y purificación.....	47
2.6.1 Cromatografía.....	47
2.6.2. Cromatografía de adsorción.....	47
2.6.2.1. Cromatografía de columna.....	48
2.6.2.2 Cromatografía en capa fina (CCF).....	49
2.7. Técnicas de elucidación.....	50
2.7.1. Espectroscopia Infrarroja (IR).....	51
2.7.2. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	53
2.7.3. Espectrometría de Masas (EM).....	56
JUSTIFICACIÓN.....	58
HIPÓTESIS.....	59
OBJETIVOS.....	59

4.1. Objetivo General.....	59
----------------------------	----

4.2. Objetivos Específicos	59
----------------------------------	----

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	60
---------------------------------	----

5.1 Especificaciones de las técnicas y equipos utilizados.	60
---	----

5.1.1 Cromatografía en columna.....	60
-------------------------------------	----

5.1.2 Cromatografía en capa fina.....	60
---------------------------------------	----

5.1.3 Cromatografía preparativa	60
---------------------------------------	----

5.1.4 Espectroscopia de Infrarrojo	60
--	----

5.1.5 Espectroscopia de RMN ^1H , ^{13}C y bidimensional	61
--	----

5.1.6 Espectrometría de masas	61
-------------------------------------	----

5.2 Reactivos	62
---------------------	----

5.3 Recolección, secado y preparación del material vegetal.....	63
---	----

5.3.1 Obtención del ácido <i>ent</i> -kaurénico [1].....	63
--	----

5.4 Desarrollo de las Hemisíntesis del ácido <i>ent</i> -kaurénico [1].....	64
---	----

5.4.1 Procedimiento de la reacción del ácido <i>ent</i> - kaurénico [1] en presencia del etilenglicol	64
---	----

5.4.2 Reacción del ácido <i>ent</i> -kaurénico [1] con 1,3-propilenglicol.....	67
--	----

RESULTADOS Y DISCUSIONES	70
--------------------------------	----

6. Elucidación estructural de la Hemisíntesis del ácido <i>ent</i> -kaurénico [1] con etilenglicol..	71
--	----

6.1. Características físicas del compuesto [I].....	71
---	----

6.1.1. Espectroscopia Infrarroja (IR) del compuesto [I]	71
---	----

6.1.2. Espectroscopia de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C del compuesto [I]	73
---	----

6.1.3. Espectro de masas del compuesto [I]	78
6.2 Características físicas del compuesto [II]	79
6.2.1. Espectroscopia Infrarroja (IR) del compuesto [II]	79
6.2.2. Espectroscopia de RMN- ¹ H del compuesto [II]	81
6.3. Características del compuesto [III]	84
6.3.1. Espectroscopia Infrarroja (IR) del compuesto [III]	85
6.3.2. Espectroscopia de RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C del compuesto [III]	86
6.3.4. Espectros de Masas del compuesto [III]	93
6.3.4. Espectros bidimensionales del compuesto [III]	96
7. Elucidación estructural de la hemisíntesis del ácido <i>ent</i>-kaurénico [1] con 1,3-propilenglicol.....	101
7.1 Características del compuesto [IV]	101
7.2 Características del compuesto [V]	101
7.2.1. Espectroscopia Infrarroja (IR) del compuesto [V].....	102
7.2.2. Espectroscopia de RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C del compuesto [V]	103
7.3 Características del compuesto [VI]	108
7.3.1. Espectroscopia Infrarroja (IR) del compuesto [VI]	108
7.3.2. Espectroscopia de RMN- ¹ H del compuesto [VI].....	110
7.3.3. Espectros de Masas del compuesto [VI]	114
CONCLUSIONES.....	118
RECOMENDACIONES	119

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1. Composición de las Asteráceas	3
Figura 2. Familia Asteráceas	4
Figura 3. Frailejones en el Páramo de Piedras Blancas con una especie de <i>Espeletia</i> en el Estado Mérida, Venezuela.	6
Figura 4. <i>Espeletia semiglobulata</i>	9
Figura 5. Espectro electromagnético	51
Figura 6. Región del Infrarrojo medio	53
Figura 7. Estados de transición de los espines	54
Figura 8. Desplazamientos químicos frecuente en el espectro de RMN de ^1H	55
Figura 9. Desplazamientos químicos aproximados en el espectro RMN para ^{13}C	55
Figura 10. Ionización por impacto de electrones	56
Figura 11. Espectro de Masas	57
Figura 12. Espectro de Infrarrojo del compuesto [I]	71
Figura 13. Espectro de RMN- ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del Compuesto [I]	73
Figura 14. Ampliación del espectro de RMN- ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto [I]	74
Figura 15. Espectro de RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) del compuesto [I]	75
Figura 16. Ampliación del espectro de RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) del compuesto [I]	76

Figura 17. Cromatograma de gases del compuesto [I]	78
Figura 18. Espectro de Masas del compuesto [I]	78
Figura 19. Espectro de Infrarrojo del compuesto [II]	79
Figura 20. Espectro de RMN- ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto [II].	81
Figura 21. Ampliación A del espectro de RMN- ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto [II]	82
Figura 22. Ampliación B del espectro de RMN- ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto [II]	83
Figura 23. Espectro de Infrarrojo del compuesto [III]	85
Figura 24. Espectro de RMN- ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto [III]	86
Figura 25. Ampliación A del espectro de RMN- ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto [III]	87
Figura 26. Ampliación B del espectro de RMN- ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto [III]	88
Figura 27. Espectro de RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) del compuesto [III]	90
Figura 28. Ampliación del espectro de RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) del compuesto [III]	91
Figura 29. Cromatograma de gases del compuesto [III]	93
Figura 30. Espectro de Masas del compuesto [III]	93
Figura 31. Fragmentación del compuesto [III]	94
Figura 32. Reacción de Steglich del ácido <i>ent</i> -kaurénico [1] con etilenglicol	95
Figura 33. Espectro ^1H - ^1H - COSY (CDCl_3) del compuesto [III]	97
Figura 34. Espectro HSQC (CDCl_3) del compuesto [III]	98
Figura 35. Espectro HMBC (CDCl_3) del compuesto [III]	100

Figura 36. Espectro de Infrarrojo del compuesto [V]	102
Figura 37. Espectro de RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) del compuesto [V]	103
Figura 38. Ampliación del espectro de RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) del compuesto [V]	104
Figura 39. Espectro de RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) del compuesto [V]	105
Figura 40. Ampliación A del espectro de RMN- ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) del compuesto [V]	106
Figura 41. Espectro de Infrarrojo del compuesto [VI]	108
Figura 42. Espectro de RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) del compuesto [VI]	110
Figura 43. Ampliación A del espectro de RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) del compuesto [VI]	111
Figura 44. Ampliación B del espectro de RMN- ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) del compuesto [VI]	112
Figura 45. Cromatograma de gases del compuesto [VI]	114
Figura 46. Espectro de Masas del compuesto [VI]	114
Figura 47. Fragmentación del compuesto [VI]	116
Figura 48. Reacción de Steglich del ácido <i>ent</i> -kaurénico [1] con 1,3-propilenglicol	117

ÍNDICE DE ESQUEMA

	PÁGINA
Esquema 1. Biosíntesis general de Metabolitos Secundarios	12
Esquema 2. Ruta para la obtención del acetoacetil-CoA, y el (3s)-3-Hidroxi-3-metilglutaril CoA (HMG-CoA).....	14
Esquema 3. Obtención del Difosfato de Isopentenilo.....	15
Esquema 4. Biosíntesis del Pirofosfato de Geranilgeranilo (GGPP).....	16
Esquema 5. Biosíntesis de los diterpenos	17
Esquema 6. Ciclación de Pirofosfato de Geranilgeranilo (GGPP) bajo catálisis ácida, que conducen a los diterpenos de las series "Normal" y "Enantio" (<i>ent</i> -).....	18
Esquema 7. Oxidación del Carbono (C-19) del <i>ent</i> -kaureno	19
Esquema 8. Reacción de hidrogenación catalítica.....	21
Esquema 9. Mecanismo de reducción con Tetrahidruro de Aluminio y Litio (LiAlH ₄)	22
Esquema 10. Mecanismo de una epoxidación	24
Esquema 11. Reacción de hidroformilación	26
Esquema 12. Reacción de hidroxilación con Tetraóxido de Osmio (OsO ₄).....	28
Esquema 13. Mecanismo de ozonólisis O ₃	30
Esquema 14. Reacción de hidroxilación con Dióxido de Selenio (SeO ₂)	31

Esquema 15. Reacción de DMSO.....	35
Esquema 16. Esterificación de Fischer	36
Esquema 17. Mecanismo de la reacción de esterificación de Fischer	37
Esquema 18. Reacción para la obtención del cloruro de acilo	38
Esquema 19. Mecanismo de la obtención de un éster por medio de un cloruro de acilo	39
Esquema 20. Reacción de esterificación con diazometano	40
Esquema 21. Mecanismo general de esterificación con diazometano	41
Esquema 22. Mecanismo de la esterificación de Steglich	42
Esquema 23. Reacción de Koenings Knorr	45

ÍNDICE DE TABLAS

PÁGINA

Tabla 1. Ejemplos de varias especies de frailejones de la sub-tribu Espeletiinae.	6
Tabla 2. Clasificación taxonómica de la planta <i>Espeletia semiglobulata</i>	8
Tabla 3. Abreviaturas de las señales para RMN- ¹ H.....	61
Tabla 4. Reactivos o solventes utilizados	62
Tabla 5. Cantidades específicas, condiciones de la Hemisíntesis del ácido <i>ent</i> -kaurénico [1] con etilenglicol.....	65
Tabla 6. Resultados de la Hemisíntesis del ácido <i>ent</i> -kaurénico [1] con etilenglicol.....	66
Tabla 7. Cantidades específicas y condiciones de la Hemisíntesis del ácido <i>ent</i> -kaurénico [1] con 1,3-propilenglicol.....	68
Tabla 8. Resultados de la Hemisíntesis del ácido <i>ent</i> -kaurénico [1] con 1,3- propilenglicol.....	69
Tabla 9. Códigos de las muestras de las hemisíntesis del ácido <i>ent</i> -kaurénico [1].....	70
Tabla 10. Bandas de absorción en el espectro Infrarrojo (IR) del compuesto [I]	72
Tabla 11. Desplazamientos químicos (δ) ppm en el espectro RMN- ¹ H del compuesto [I]	75
Tabla 12. Desplazamientos químicos (δ) ppm en el espectro RMN- ¹³ C del compuesto [I]	77
Tabla 13. Bandas de absorción en el espectro Infrarrojo (IR) del compuesto [II].....	80

Tabla 14. Desplazamientos químicos (δ) ppm en el espectro RMN- ^1H del compuesto [II] 84

Tabla 15. Bandas de absorción en el espectro Infrarrojo (IR) del compuesto [III] 86

Tabla 16. Desplazamientos químicos (δ) ppm en el espectro RMN- ^1H del compuesto [III] 89

Tabla 17. Desplazamientos químicos (δ) ppm en el espectro RMN- ^{13}C del compuesto [III] 92

Tabla 18. Señales de ^{13}C y ^1H en el espectro de HSQC..... 99

Tabla 19. Bandas de absorción en el espectro Infrarrojo (IR) del compuesto [V] 102

Tabla 20. Desplazamientos químicos (δ) ppm en el espectro RMN- ^1H del compuesto [V] 104

Tabla 21. Desplazamientos químicos (δ) ppm en el espectro RMN- ^{13}C del compuesto [V] 107

Tabla 22. Bandas de absorción en el espectro Infrarrojo (IR) del compuesto [VI] 109

Tabla 23. Desplazamientos químicos (δ) ppm en el espectro RMN- ^1H del compuesto [VI] 113

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación, describe la hemisíntesis del ácido *ent*-kaurénico [1], aislado de las hojas de *Espeletia semiglobulata*. Mediante la reacción de Steglich con los dioles etilenglicol y 1,3-propilenglicol. De cada reacción, los productos obtenidos se les realizaron las técnicas de separación y purificación, mediante cromatografía de columna con eluyentes de diferentes polaridades y monitoreadas las fracciones por cromatografía de capa fina. Lográndose obtener tres compuestos para cada reacción, los seis compuestos obtenidos fueron caracterizados por las técnicas de elucidación como: espectroscopia de Infrarroja (IR), la espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN-¹H, RMN-¹³C y bidimensional) y la Cromatografía de Gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM). Finalmente, la hemisíntesis del ácido *ent*-kaurénico [1] junto con los dos dioles, como resultado se obtuvieron dos derivados: el 2-hidroxietil kaurenato [III] y el compuesto 3-hidroxipropil kaurenato [VI]. Son compuestos nuevos obtenidos por hemisíntesis.

www.bdigital.ula.ve

ABSTRACT

In the present research work, he describes the hemisynthesis of *ent*-kaurenic acid [1], isolated from the leaves of *Espeletia semiglobulata*. Through the Steglich reaction with the diols ethylene glycol and 1,3-propylene glycol. From each reaction, the products obtained were subjected to the separation and purification techniques, by means of column chromatography with eluents of different polarities and the fractions were monitored by thin layer chromatography. Being able to obtain three compounds for each reaction, the six compounds obtained were characterized by elucidation techniques such as: Infrared (IR) spectroscopy, Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy (^1H -NMR, ^{13}C -NMR and two-dimensional) and Gas Chromatography. coupled to mass spectrometry (GC-MS). Finally, the hemisynthesis of *ent*-kaurenic acid [1] together with the two diols, as a result, two derivatives were obtained: 2-hydroxyethyl kaurenate [III] and the compound 3-hydroxypropyl kaurenate [VI]. They are new compounds obtained by hemisynthesis.

www.bdigital.ula.ve

INTRODUCCIÓN

La construcción de una molécula, se puede llevar a cabo mediante una síntesis orgánica, en la que se establecen ciertos parámetros, que dependen de qué tipo de reacción química se quiere realizar. La síntesis orgánica se puede clasificar en: 1) síntesis total, que se basa en la construcción de moléculas complejas, a partir de moléculas simples. Este tipo de síntesis es muy utilizado para la obtención de productos de uso diario, fabricados por la industria química y farmacéutica; 2) hemisíntesis o semisíntesis, que consiste en la transformación parcial de un compuesto conocido, que a su vez es aislado de una fuente animal o vegetal.

Unos de los ejemplos de compuestos obtenidos por hemisíntesis, son los antibióticos β -lactámicos, los esteroides y la síntesis de progesterona, que es a partir del estigmasterol, un compuesto que se halla en un 20 % en el aceite de soja (Camps y cols., 2005). Asimismo, la diosgenina es ampliamente usada en la industria farmacéutica para la síntesis de la mayoría de las hormonas esteroideas, tales como los anticonceptivos (Maldonado y cols., 2012). Otro ejemplo de hemisíntesis, es la producción de la procaina que es una molécula derivada de la cocaína, la cual es aislada de la especie *Erythroxylon coca* (Avendaño, 2001).

De igual forma, existen otros tipos de compuestos que se le han realizado muchas transformaciones químicas o hemisíntesis, y son los compuestos de origen diterpénico, los cuales podemos encontrar en diversas especies de plantas. Una especie conocida por producir grandes cantidades de diterpenos, es el frailejón. Esta es una planta compuesta, muy común en Venezuela en los páramos y subpáramos, que se encuentran alrededor de las Cordilleras Andinas (Monasterio, 1980). Muchos investigadores han obtenido ciertos diterpenos de esa planta, de la fracción ácida del frailejón se encuentra el ácido kaurénico, que es un diterpeno con gran interés desde el punto de vista químico, botánico y medicinal (Usubillaga y cols., 2003).

El ácido kaurénico, tiene una gran importancia a nivel biológico, eso ha conllevado al estudio de su modificación estructural. A este compuesto, se le han realizado diversas transformaciones químicas, tales como reacciones de oxidaciones, reducciones, adiciones, sustituciones, eliminaciones y esterificaciones. Dicho esto, se pudo justificar el objetivo de esta investigación, el cual es modificar la estructura del ácido kaurénico, por vía de reacciones de esterificaciones, utilizando como reactivos los dioles etilenglicol y 1,3-propilenglicol.

www.bdigital.ula.ve

MARCO TEÓRICO

El ácido *ent*-kaurénico [1] se encuentra en diferentes plantas, pero por medio de investigaciones que se han realizado, en su mayoría se encuentra en la familia Asteraceae. A continuación, se desarrollará someramente cómo está conformada esta familia de plantas.

2.1. FAMILIA ASTERACEAE

2.1.1 Aspectos Botánicos

Las asteráceas (Asteraceae), también llamadas antiguamente compuestas, reúnen más de 23.000 especies, por lo que son la familia de angiospermas con mayor riqueza y diversidad biológica (Jeffrey, 2007). Esta familia está caracterizada, por presentar las flores dispuestas en una inflorescencia compuesta, denominada capitulo, la cual se rodea de una o más filas de brácteas (involucro) (figura 1). 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 (Jeffrey, 2007).

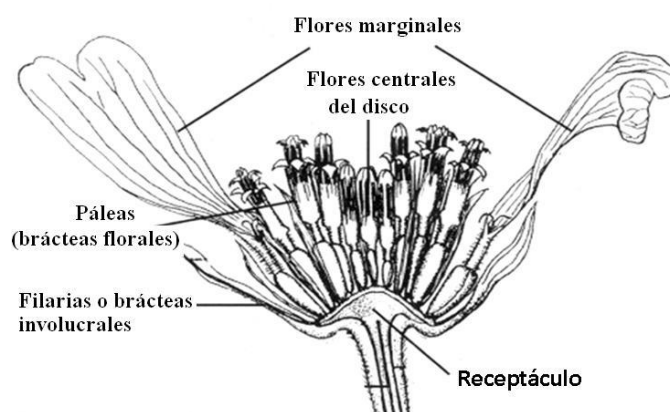


Figura 1. Composición de las Asteráceas

Fuente: Tomada y modificado de <https://www.unavarra.es/herbario/htm/Compositae.htm>

Algunas de las representantes de la familia Asteraceae son: las margaritas, las dalias, los girasoles, cardos, la achicoria y la lechuga, ente otras (figura 2). Aparte de su gran diversidad, las Asteraceae comprenden más de 1.700 géneros y unas 24.000-30.000 especies distribuidas por todo el mundo, excepto en la Antártida, que incluyen desde pequeñas hierbas de 1 cm de altura hasta árboles de más de 30 m (Katinas y cols., 2007). En Venezuela, (Badillo, 1997) esta familia de plantas es la tercera de las angiospermas más diversas, después de las Orchidaceae y Fabaceae.



Figura 2. Familia Asteráceas

Fuente: Tomada y modificado de <https://panama.inaturalist.org/taxa/47604-Asteraceae>

Los miembros de esta familia son plantas herbáceas, raramente árboles, arbustos o lianas. Muchas especies presentan látex y en especial aceites esenciales. Sus hojas están bien desarrolladas, aunque en algunos casos se hallan muy reducidas, generalmente alternas u opuestas simples. Las flores son pequeñas, hermafroditas, o en ocasiones funcionalmente unisexuales o estériles (Katinas y cols., 2007).

En resumen, la familia Asteraceae (Cuatrecasas, 1986), actualmente comprende tres subfamilias y 16 tribus que son las Asteroideae (Astereae, Anthemideae, Calenduleae, Eupatorieae, Gnaphalieae, Heliantheae, Inuleae, Plucheeae, Senecioneae), Cichorioideae (Arctoteae, Cardueae, Lactuceae, Liabeae, Mutisieae, Vernoniaeae) y Barnadesioideae (Barnadesieae).

En efecto, la sub familia que tiene como interés para esta investigación es la sub-familia Asteroideae, y la tribu Heliantheae. La tribu Heliantheae, fue nombrada por Cassini (1819) para incluir girasoles con capítulos en su mayoría radiados, receptáculos pálidos, hojas opuestas y corolas amarillas; sin embargo, en el año 1829, Cassini presentó su clasificación final para Heliantheae que contenía cinco divisiones principales (Kadereit y Jeffrey, 2007). En esta tribu se encuentra el género *Espeletia*, que es el género de plantas que contiene la mayor cantidad de ácido kaurénico, de acuerdo a los estudios fitoquímicos realizados en Venezuela.

2.2 GÉNERO *ESPELETIA*

Este género es llamado comúnmente frailejón, fue nombrado por Humboldt y Bonpland en 1809, en honor a Don José de Espeletia, virrey del Nuevo Reino de Granada (Standley, 1915). Su distribución geográfica es amplia; en Venezuela se encuentran en la región nor-occidental, en Colombia en la sierra de Santa Marta, en Costa Rica en la cordillera de Talamanca y al norte de Ecuador y Perú. Es importante mencionar, que existe alrededor de 175 especies de frailejón que se han descrito, de las cuales 75 son autóctonas de Venezuela (Luteyn, 2000). Los frailejones como se puede observar en la figura 3, crecen generalmente por encima de los 3000 m de altitud, además presentan diferentes formas de crecimiento relacionadas con el tipo de vegetación donde se encuentren (Cuatrecasas, 1979).



Figura 3. Frailejones en el Páramo de Piedras Blancas con una especie de *Espeletia* en el Estado Mérida, Venezuela.

Fuente: tomada y modificada (Mavárez, 2019)

En numerosas especies pertenecientes a este género (Abdala, 2000), se han encontrado diversos compuestos biosintetizados a base de triterpenos, lactonas sesquiterpénicas, aceites esenciales y grandes cantidades importantes de varios diterpenos tipo kaureno y el ácido *ent*-kaurénico [1]. En la tabla 1, se muestran varias especies de frailejones, pertenecientes a la sub-tribu Espeletiinae, que han sido estudiadas por diferentes investigadores.

Tabla 1. Ejemplos de varias especies de frailejones de la Sub-tribu Espeletiinae.

Género y especie	Parte de la planta	Referencia
<i>Espeletia floccosa</i> ,		
<i>Espeletia figueirasii</i> y <i>Espeletia moritziana</i> .	Hojas	Usubillaga y Morales, 1972.
<i>Montanoa pterodopa</i>	Hojas	Bohlmann y Le Van, 1978.

<i>Wedelia trilobata</i>	Hojas	Bohlmann y cols., 1981.
<i>Aspilia parvifolia</i>		
<i>Montanoa tomentosa</i> (zoaplatle)	Hojas	Enríquez y cols., 1983.
<i>Wedelia calycina</i> y <i>Wedelia hispida</i>	Hojas	Herz y kulanthaivel, 1984
<i>Espeletia killipii</i>	Hojas	Torrenegra y cols., 1994.
<i>Espeletia tunjana</i>		
<i>Coespeletia</i> y <i>Ruilopezia</i>	Hojas	Romero, 2000.
<i>Espeletia schultzii</i> Wedd	Hojas	Moreno, 2002 Mondolis y cols., 2013
<i>Wedelia paludosa</i>	Hojas	Batista y cols., 2005
		Peña y cols., 2008.
		Peña, 2008.
		Cordero, 2012
<i>Coespeletia moritziana</i>	Hojas	Peña, 2012 Cordero y cols., 2017
<i>Espeletiopsis angustifolia</i> Cuatrec.	Hojas	Meccia y cols., 2010.
<i>Espeletia nana</i> Cuatrec	Hojas y raíces	Peña y cols., 2012
<i>Coespeletia moritziana</i> y <i>Espeletia semiglobulata</i>	Hojas	Ríos y cols., 2017

Los estudios fitoquímicos de los frailejones merideños, se iniciaron en el Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Los Andes, a principios de 1970. La planta *Espeletia semiglobulata*, es la especie de la que se aisló el ácido *ent*-kaurénico [1], que fue utilizado para realizar las transformaciones moleculares en esta investigación.

2.3. ESPECIE

La *Espeletia semiglobulata*, es una planta resinosa característica de los páramos andinos de Venezuela (Usubillaga y cols., 2003). Este género fue descrito por Cuatrecasas en 1995. A continuación, en la tabla 2 se puede observar la clasificación taxonómica de esta especie.

Tabla 2. Clasificación taxonómica de la planta *Espeletia semiglobulata*

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Sub-clase	Asteridae
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Sub-Familia	Asteroideae
Tribu	Heliantheae
Género	<i>Espeletia</i>
Especie	<i>Espeletia semiglobulata</i>

Tomada y modificada (Usubillaga y Capra, 1988)

De esta especie (figura 4), se han identificados algunos compuestos diterpénicos que son activos biológicamente; sin embargo, la mayoría de los frailejones estudiados hasta el momento, el componente más abundante de la fracción ácida, es el ácido *ent*-kaur-9(11)-16-dieno-19-óico, conocido comúnmente como ácido *ent*-grandiflorénico [2] (Piozzi y cols., 1968). En 1997 en el Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Los Andes (ULA), desarrollaron un método para analizar los ésteres metílicos del ácido *ent*-kaurénico [1] y sus derivados mediante cromatografía de gases (CG). Posteriormente adaptaron para analizar mezclas de kaurenos mediante CG acoplada a espectrometría de masas (EM). Este método permitió establecer que la mayoría de los frailejones contenían una mezcla de ácido *ent*-kaurénico [1] y ácido *ent*-grandiflorénico [2], siendo este último casi siempre el más abundante (Ibañez, 2004).



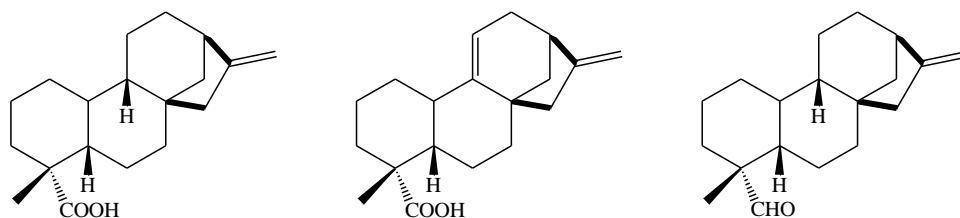
Figura 4. *Espeletia semiglobulata*

Fuente: Tomado y modificado de

[\[Asteraceae\] Espeletia semiglobulata Cuatrec 2 | Esta foto h... | Flickr](#)

En el marco de la mencionada metodología, los investigadores (Aparicio y cols., 2013) realizaron un estudio a la *Espeletia semiglobulata* y obtuvieron de la fracción ácida un (52 %) de ácido *ent*-kaurénico [1] y este fue identificado como el componente mayoritario de la fracción ácida; mientras que en la fracción neutra predominó el *ent*-kaurenal [3] (61 %). Estos resultados

que obtuvieron son importantes, ya que proporciona un método fácil y reproducible para aislar el ácido *ent*-kaurénico [1] en grandes cantidades, el cual puede ser utilizado como material de partida para reacciones de hemisíntesis, y posteriormente en evaluaciones de diferentes propiedades biológicas.



Ácido *ent*-kaurénico [1] Ácido *ent*-grandiflorénico [2] *Ent*-kaurenal [3]

Ahora bien, como se mencionó anteriormente, el ácido *ent*-kaurénico [1] es un diterpeno y según muchas investigaciones presenta actividad biológica relevante. A continuación, en el siguiente segmento, se mostrará el origen de la biosíntesis de este compuesto en las plantas.

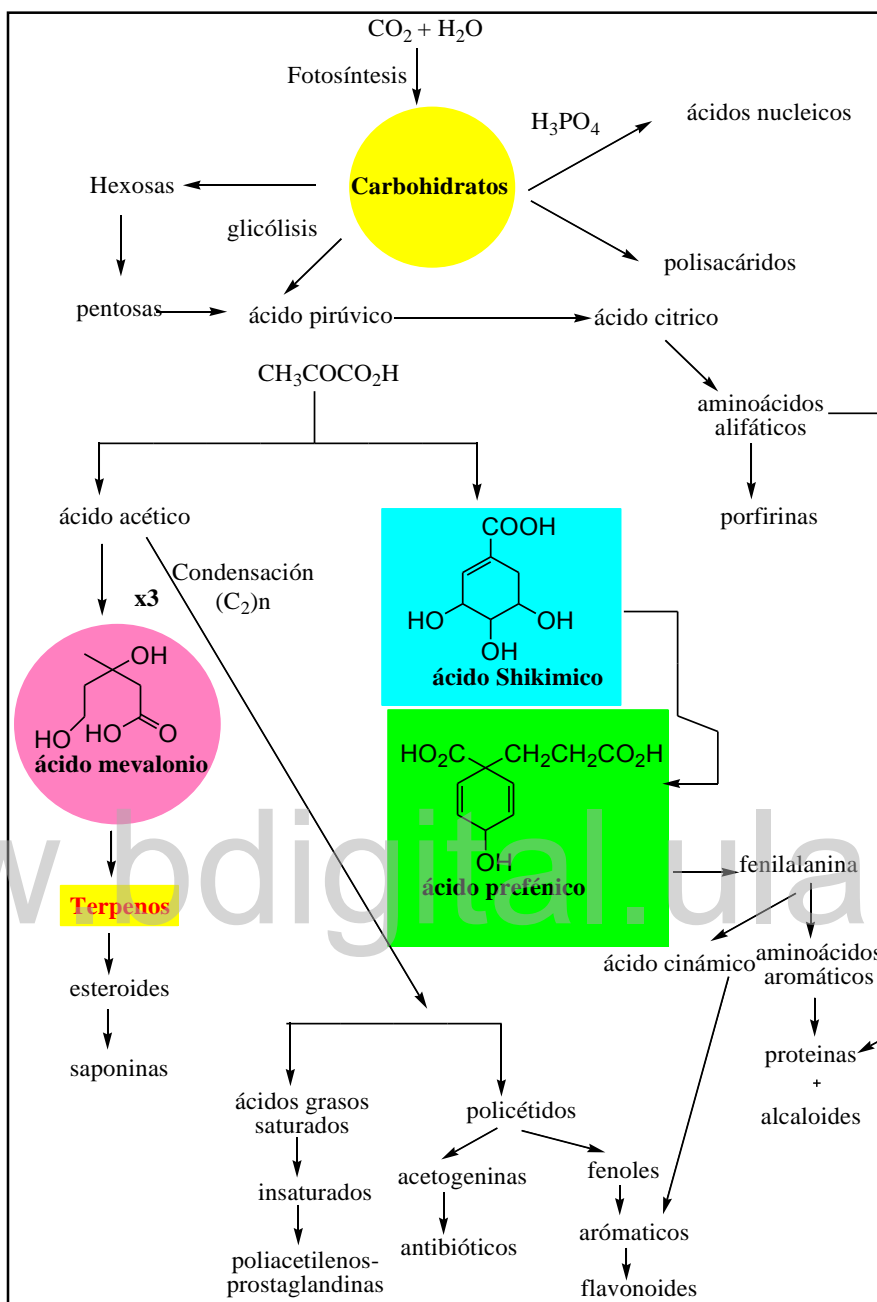
2.4. BIOSÍNTESIS DE PRODUCTOS NATURALES

Las plantas junto con los animales, son seres vivos que ayudan al funcionamiento del ciclo del carbono. Son seres vivos independientes que, por medio de la fotosíntesis usan el sol como fuente de energía, para convertir del dióxido de carbono y el agua, principalmente en almidón y celulosa. Asimismo, las plantas para poder vivir, crecer y reproducirse, necesitan transformar una gran variedad de compuestos orgánicos. Estas transformaciones requieren de sistemas enzimáticos y una energía que es obtenida en forma de adenosintrifosfato (ATP). El conjunto de estas reacciones específicas, se le conoce como metabolismo, que es el proceso mediante el cual un organismo fabrica sus propias sustancias y mantiene la vida (García y Pérez, 2009).

Las proteínas, los hidratos de carbono, las grasas y los ácidos nucleicos, son las moléculas más importantes para la vida; y se les conoce como metabolitos primarios. A pesar de las características extremadamente diferentes de los distintos seres vivos, las rutas generales para modificar y sintetizar estas sustancias son esencialmente las mismas para todos con pequeñas modificaciones (Ordaz y cols., 2009). Por otro lado, existen otros compuestos que también son sintetizados por la planta que son los metabolitos secundarios. Estos metabolitos no tienen un rol directo en la reproducción de la planta, pero cumplen funciones complementarias con las vitales.

La clasificación de los metabolitos secundarios puede hacerse de acuerdo a sus estructuras, a su bioformación, a la fuente de producción o a su acción biológica. Como se mencionó anteriormente, todos los compuestos orgánicos que nos rodean, están constituidos principalmente por carbono e hidrógeno, y a menudo contienen oxígeno y nitrógeno. La formación de estos productos naturales comienza con la fotosíntesis que tiene lugar en plantas superiores, algas y algunas bacterias, y necesita de la luz solar, ya que es un proceso endotérmico; sin embargo, aquellos organismos incapaces de absorber la luz, absorben su energía de la degradación de carbohidratos, de modo que su fuente principal de carbono es la inversa a la indicada como se puede apreciar en el esquema 1 (Marcano y Hasegawa, 2002). Los metabolitos secundarios se forman por distintas vías:

- Rutas del ácido shikímico, conducentes a la síntesis de sustancias aromáticas entre ellos aminoácidos y ácido cinámico.
- Ruta acetato-malonato donde el acetato es el precursor de los ácidos grasos y los policétidos.
- Ruta del ácido mevalónico que da lugar a terpenoides.
- Rutas del metabolismo del nitrógeno, principalmente aminoácidos, que llevan a la síntesis de alcaloides (Marcano y Hasegawa, 2002).



Esquema 1. Biosíntesis general de metabolitos secundarios

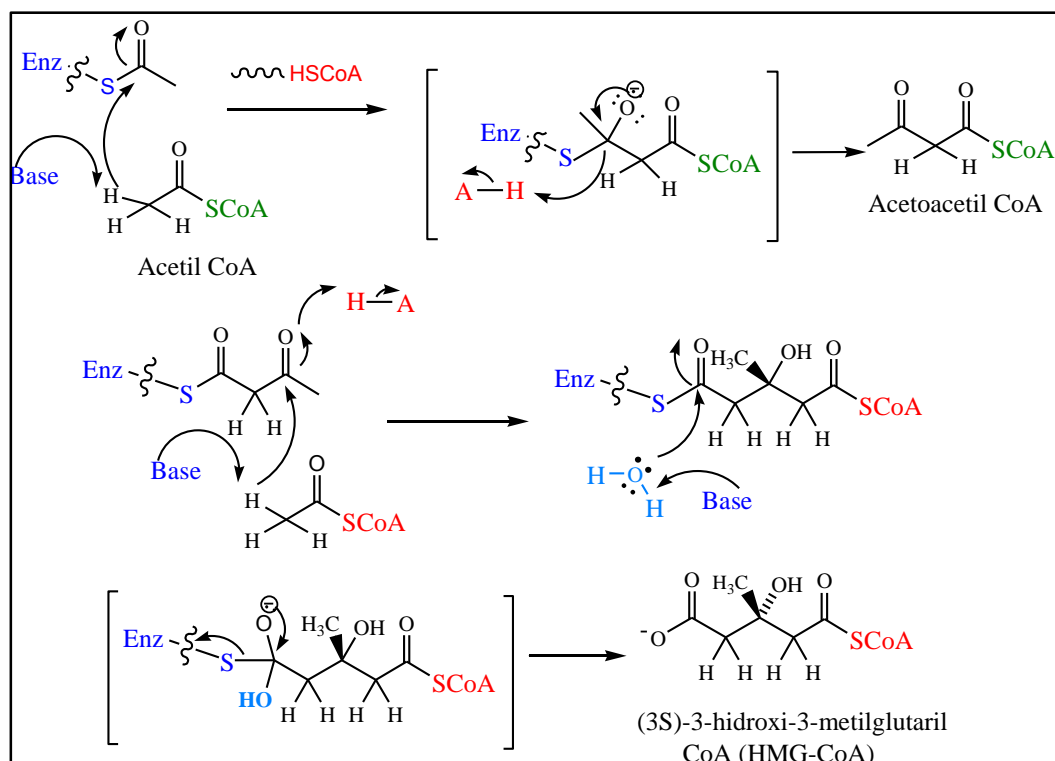
Fuente: Tomado y modificado (Marcano y Hasegawa, 2002)

El ácido *ent*-kaurénico [1], es clasificado como un metabolito secundario y se puede formar a través de la ruta del ácido mevalónico, que da lugar a los terpenos. A continuación, se estudiará la biosíntesis de este metabolito.

2.4.1 Biosíntesis de los terpenos

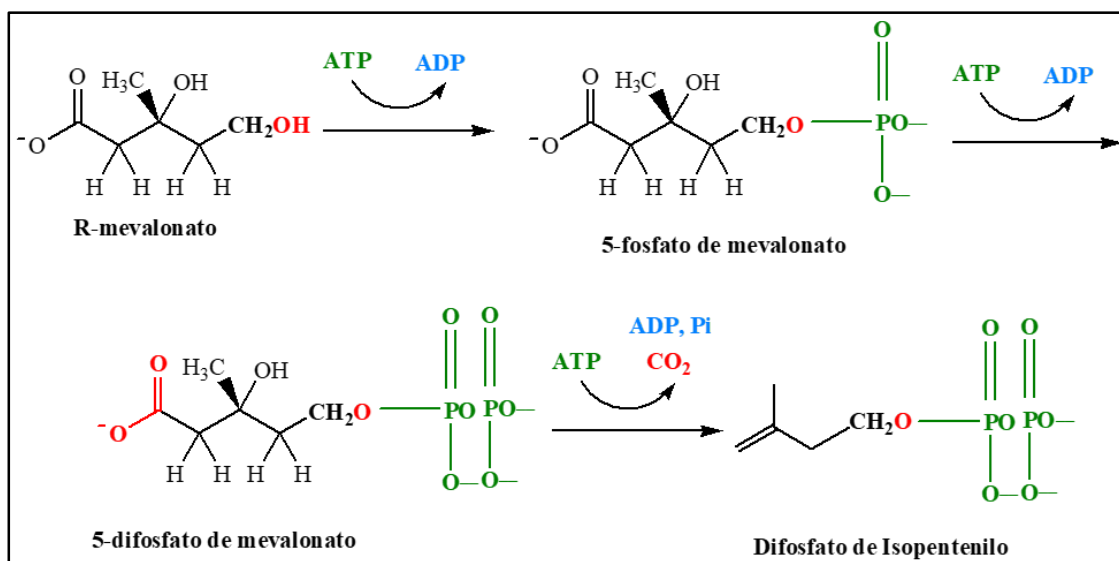
Los terpenos son los metabolitos secundarios más amplios, con una diversidad estructural y funcional; además, son interesantes desde el punto de vista biológico y farmacológico (Azcón y Talón, 2000). Estos compuestos en su estructura química, contienen un múltiplo de cinco carbonos y se derivan de forma biosintética, a partir del precursor de cinco carbonos que es el isopentil difosfato (Hornback, 2006).

El material de partida para la biosíntesis de los terpenos, viene dado por una condensación de Claisen, entre dos moléculas de ácido acético, que en este caso se representa como acetil CoA (esquema 2). De esta condensación, se genera el producto acetoacetil- CoA, un β -cetoéster que es utilizado en una nueva condensación aldólica. El acetoacetil CoA, experimenta una adición tipo aldólica de un ion enolato del acetil CoA, que es una reacción catalizada por la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa. Seguidamente, la reacción ocurre de nuevo a partir de la formación inicial de un enlace tioéster entre el sustrato, y un grupo SH de la cisteína en la enzima, seguida por la adición del ion enolato y la hidrólisis posterior para dar al compuesto (3S)-3-hidroxi-3-metilglutaril CoA (HMG-CoA) (Hornback, 2006).



Esquema 2. Ruta para la obtención del acetoacetyl-CoA, y el (3S)-3-hidroxi-3-metilglutaril CoA (HMG-CoA). Fuente: Tomado y modificado (Hornback, 2006)

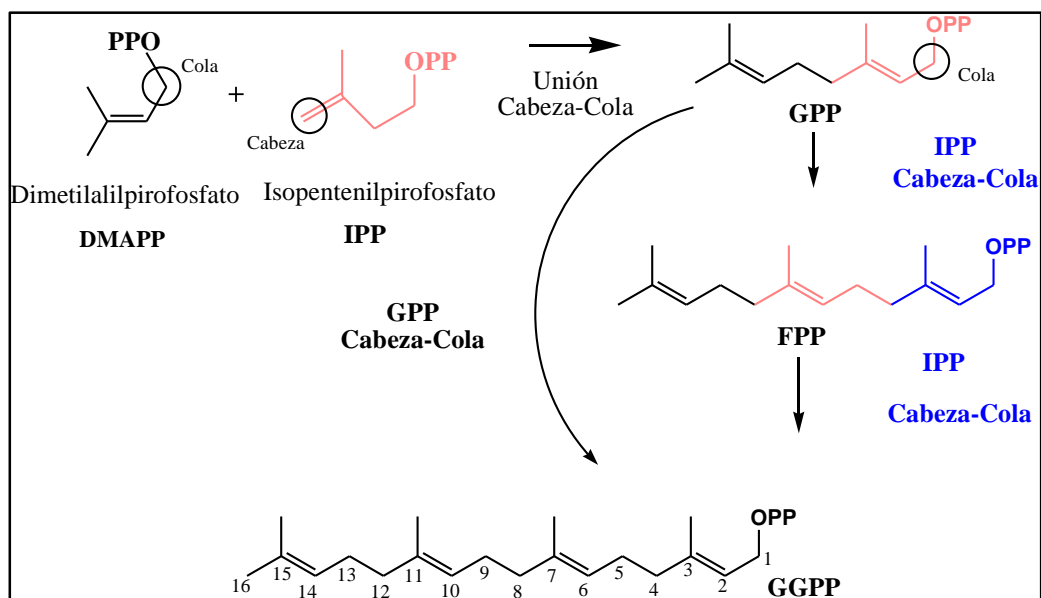
La reducción de la HMG-CoA para dar (R)-mevalonato, se cataliza por la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril reductasa y requiere de dos equivalentes de nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH). Ahora para obtener el precursor de los terpenos, se necesitan tres reacciones adicionales para convertir el mevalonato a difosfato de isopentilo. Las primeras dos, son la fosforilaciones directas que ocurren por las reacciones de sustitución nucleofílica en el fósforo terminal del ATP. Para esta reacción, primero se convierte el mevalonato a 5-fosfato de mevalonato (fosfomevalonato) por la reacción con ATP en un proceso catalizado por la mevalonato quinasa, luego el 5-fosfato de mevalonato reacciona con un segundo ATP para da 5-difosfato de mevalonato (difosfomevalonato). Por último, la tercera reacción resulta en la fosforilación del grupo hidroxilo terciario, seguida por la descarboxilación y la pérdida del ion fosfato, que da el difosfato de isopenteneno, el precursor de los terpenoides (Hornbak, 2006).



Esquema 3. Obtención del Difosfato de Isopentenilo

Fuente: Tomado y modificado de (Hornback, 2006)

Para la conversión del difosfato de isopentenilo (IPP) en terpenoides, comienza con su isomerización en difosfato de dimetilalilo (DMAPP), que es llamado formalmente pirofosfato dimetilalilo. Estas dos moléculas se combinan para formar el difosfato de geranilo (GPP), el precursor de diez carbonos de casi todos los monoterpenos. Luego, el difosfato de geranilo puede unirse a otra molécula de difosfato de isopentilo y formar el difosfato de farnesilo (FPP), compuesto de quince carbonos, que es el precursor de casi todos los sesquiterpenos. La adición de otra molécula de difosfato de isopentilo, genera un compuesto de veinte carbonos, que es el pirofosfato de geranilgeranilo (GGPP), precursor de los diterpenos (esquema 4) (Hornback, 2006).



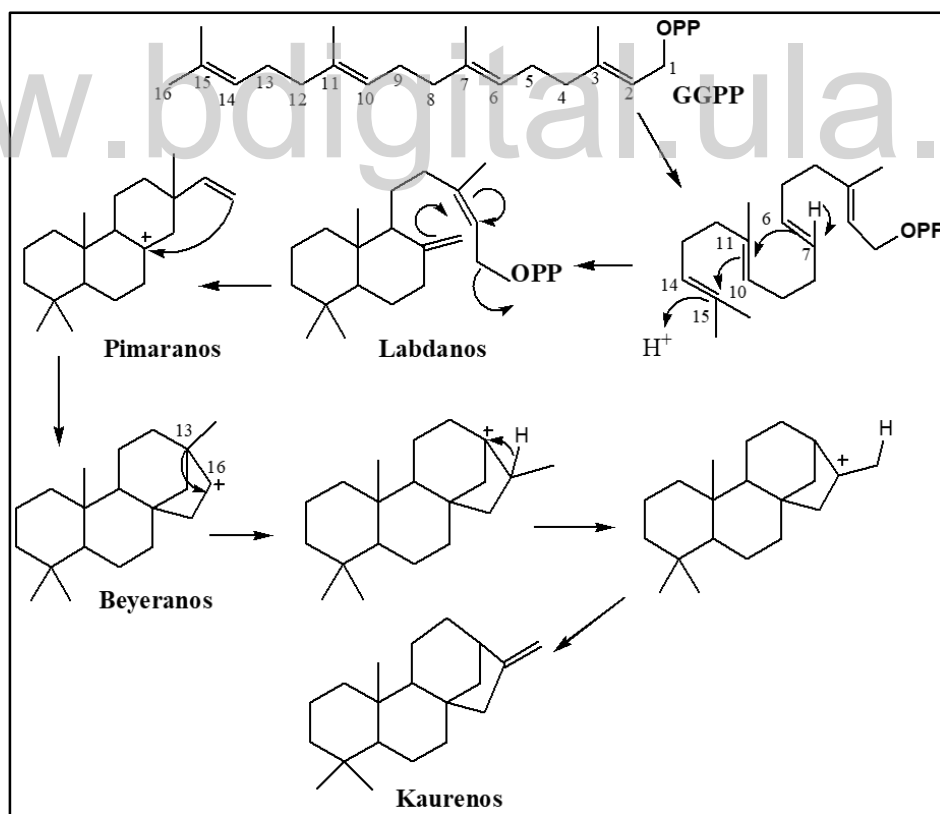
Esquema 4. Biosíntesis del Pirofosfato de Geranilgeranilo (GGPP)

Fuente: Tomado y modificado (Marcano y Hasegawa, 2002; Hornback, 2006)

La gran parte de la química en la biosíntesis de los terpenos, se puede entender sobre la base de las reacciones de carbocationes, que se forman cuando el grupo pirofosfato se aleja de los compuestos, tal como el pirofosfato de isopentenilo o el pirofosfato de dimetilalilo, siendo que el grupo pirofosfato (OPP) es un buen grupo saliente (Hornback, 2006). Por lo tanto, la formación de geranil pirofosfato de isopentenilo, puede ser visto como resultado de la adición del carbocatión producido a partir de dimetilalilo pirofosfato a pirofosfato de isopentenilo. Es importante recordar que estas reacciones están controladas por enzimas, lo que hace que no implica la generación de carbocationes libres, y a menudo sean reacciones concertadas (Hornback, 2006).

2.4.2. Diterpenos

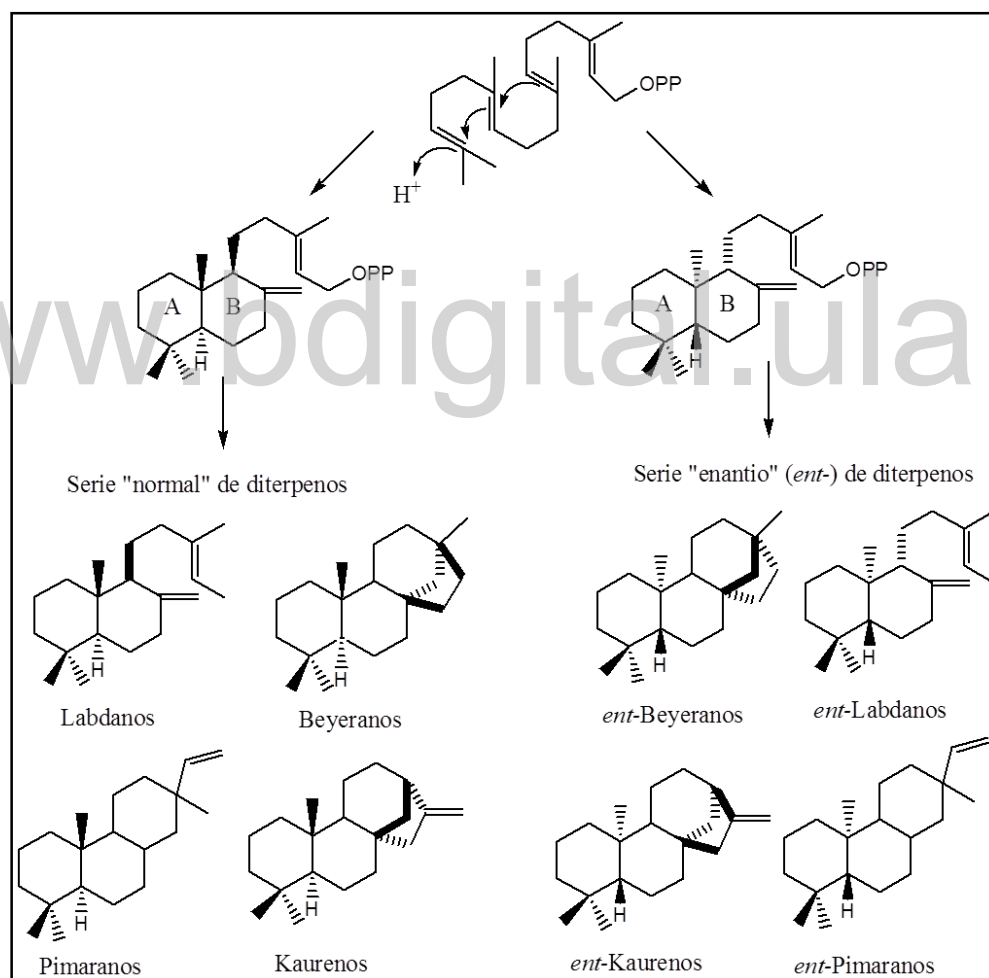
Los diterpenos son compuestos de 20 átomos de carbono, y se les considera derivados de 4 moléculas de isopreno, como se puede observar en el esquema 5. En la naturaleza se pueden conseguir diterpenos que poseen más de 20 carbonos y también menos de 20 carbonos; la terminación “eno” para el nombre diterpeno, se debe a la presencia de insaturaciones en el anillo básico, pero debido a que estos anillos también presentan otros grupos funcionales, actualmente se les da la determinación “oide” (Wade, 2004). Esta clase de terpenos se forman por medio de ciclaciones (GGPP), con el ataque electrofílico sobre el doble enlace entre el C-14 y C-15 (esquema 5). 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 (Marcano y Hasegawa, 2002).



Esquema 5. Biosíntesis de los Diterpenos

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

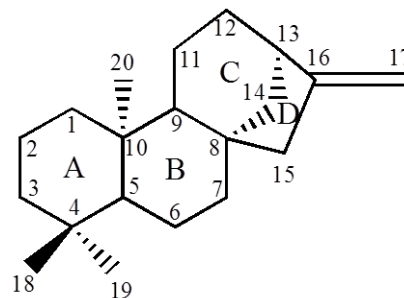
En las diferentes etapas de la ciclación pueden ocurrir reordenamientos Wagner-Meerwein, (W-M=transposición carbocatiónica) que conducen a la contracción y a la expansión de anillos, rearreglos de intermediarios, movimientos de carbono e hidrógeno, oxidaciones, entre otros. Finalmente, ocurre una transferencia del metilo en posición del C-13 al C-16 para dar paso a la formación de los kaurenos. Por otra parte, en el esquema 6 podemos observar la serie “enantiomérica” (denotado como “*ent-*”) que nos indican las estructuras correspondientes a la imagen especular que resultan de la fusión de los anillos A y B, de la serie denominada “normal” (Fleming y Jones, 2004).



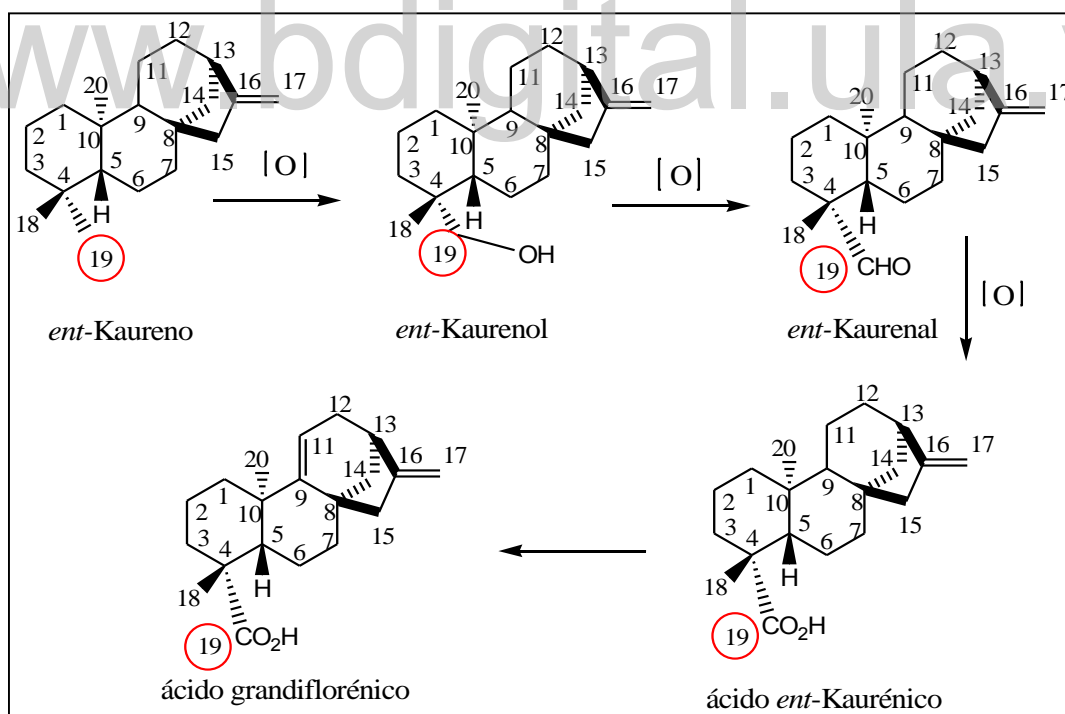
Esquema 6. Ciclación de pirofosfato de geranilgeranilo (GGPP) bajo catálisis ácida, que conducen a los diterpenos de las series "NORMAL" y "ENANTIO" (*ent-*).

Fuente: Tomado y modificado: (García y cols., 2007).

Los kaurenos representan un grupo importante de diterpenos tetracíclicos. Su estructura está constituida por una unidad de perhidrofenantreno (anillos A, B y C) fusionada con una unidad de ciclopentano (anillo D), que es formada por un puente de dos carbonos entre C-8 y C-13 (Fleming y Jones, 2004).



Estos diterpenos son intermediarios en la biosíntesis de numerosos metabolitos de plantas y hongos, como la giberelina, que poseen propiedades esteroideogénicas, anticonceptivas, antiinflamatorias, antibióticas, antiparasitarias y citotóxicas (Ghisalberti, 1997). Por acción de una enzima que es la oxidasa, el carbono 19 sufre ciertas oxidaciones sucesivas; a un alcohol *ent*-kaurenol [4], seguidamente a un aldehído *ent*-kaurenal [3] y al ácido *ent*-kaurénico [1], que es el sustrato de este trabajo de investigación (Ghisalberti, 1997). Como se puede observar en el esquema 7, el ácido *ent*-kaurénico [1] se transforma al ácido *ent*-grandiflorénico [2].



Esquema 7. Oxidación del carbono (C-19) del *ent*-kaureno

Fuente: Tomado y modificado (Carrillo, 2011; Ghisalberti, 1997)

2.5. MODIFICACIONES ESTRUCTURALES DEL ÁCIDO *ENT*-KAURÉNICO REPORTADAS EN LA LITERATURA

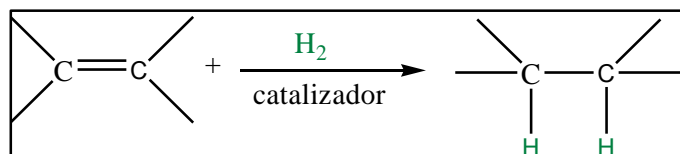
El ácido *ent*-kaurénico [1] se ha sometido a diversas transformaciones para modificar sus propiedades tanto químicas como biológicas. Unos de los grupos que son más afectados vendría siendo el C₁₆ y C₁₇ (enlace exocíclico) y el C₁₉ que es el grupo carboxilo. A continuación, se mostrarán algunas reacciones de transformación de este compuesto que están reportadas en la literatura.

2.5.1 REACCIONES DE REDUCCIÓN

En los derivados de los kaurenos, se encuentran dos posibilidades de reducción, tanto al doble enlace exocíclico y el carbono C-19. A continuación, se mencionará brevemente estos dos tipos de reacciones.

2.5.1.1 Hidrogenación

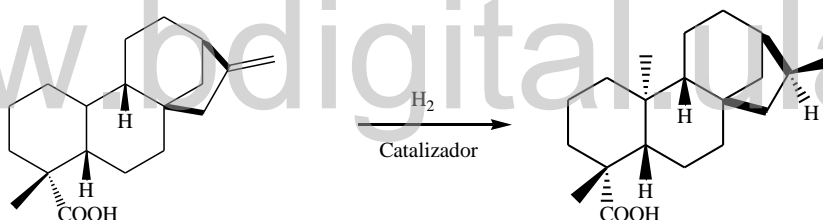
La hidrogenación de un alqueno, es una reducción mediante la adición de H₂ al doble enlace para dar lugar a un alcano. En esta reacción aparte de adicionar H₂, se requiere de un catalizador que contenga Pt, Pd o Ni y se utiliza a temperatura ambiente, utilizando hidrógeno gaseoso a presión atmosférica (esquema 8). El alqueno a reducir normalmente se disuelve en un alcohol, un alcano o ácido acético, seguidamente se añade una pequeña cantidad de un catalizador, y la mezcla se agita durante el proceso de la reacción (Wade, 2004). La hidrogenación transcurre en la superficie del metal, donde la solución líquida del alqueno se pone en contacto con el hidrógeno y el catalizador.



Esquema 8. Reacción de hidrogenación catalítica

Fuente: Tomada y modificada (Wade. 2004)

En el esquema 8, los dos átomos de hidrógeno se adicionan desde la superficie sólida, y por el mismo lado; y vendría teniendo una estereoquímica *sin*. Los dos hidrógenos se adicionan en la misma cara del doble enlace que está ligada al catalizador (McMurry, 2012). Los investigadores (Hueso y cols., 2010), utilizaron esta reacción de hidrogenación catalítica con el ácido *ent*-kaurénico [1], obteniendo como producto el ácido *ent*-kaur-16 β -metil-19-oico [5].



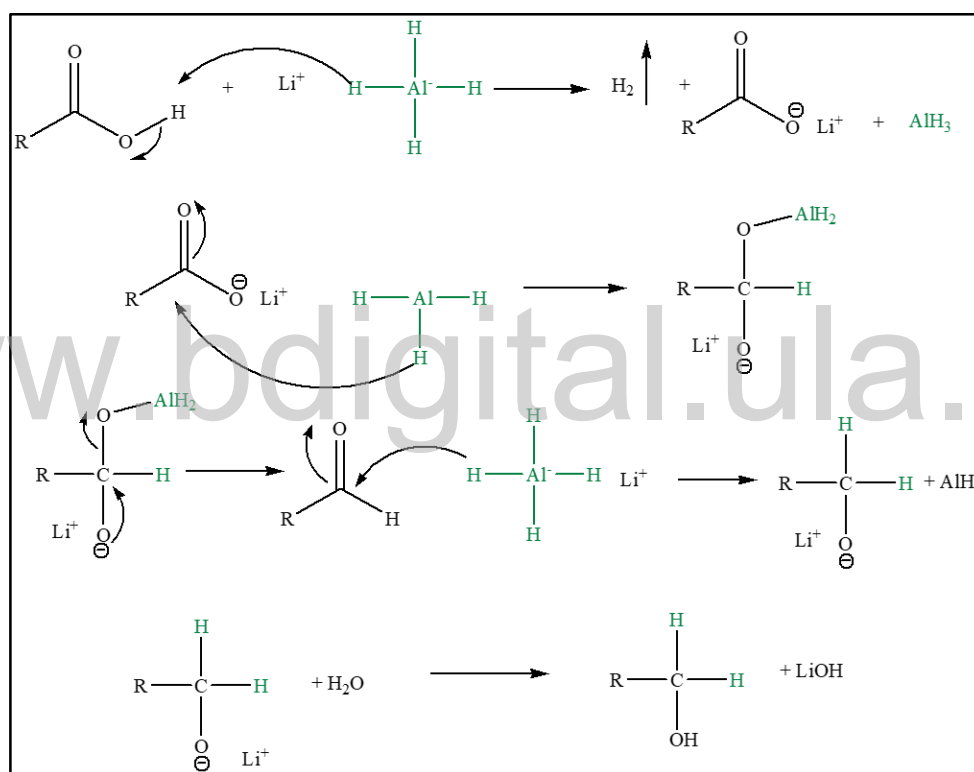
Ácido *ent*-kaurénico [1]

Ácido *ent*-kaur-16 β -metil-19-oico [5]

2.5.1.2 Reducción con tetrahidruro de Aluminio y Litio (LiAlH₄)

El agente reductor más usado en la reducción de grupos funcionales carbonilo (ácidos, ésteres, cetonas y aldehídos) es el tetrahidruro de Aluminio y Litio (LiAlH₄); además, también se tiene el borohidruro de sodio (NaBH₄), pero este último solo reduce cetonas y aldehídos. Estos hidruros adicionan un ión hidruro (H⁻), y hace que el grupo carbonilo se reduzca a un ión alcóxido, luego la protonación de este da lugar a un alcohol (Wade, 2004).

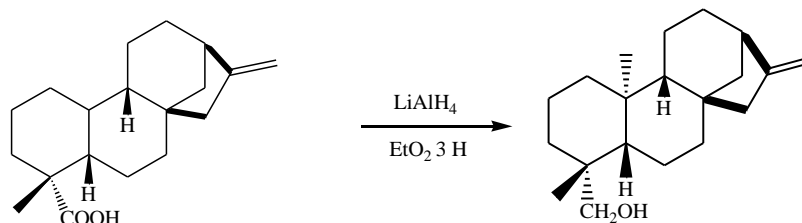
El mecanismo de esta reacción, se puede llevar en diferentes etapas, el hidruro de aluminio y litio es una base fuerte, y el primer paso es la desprotonación del ácido; por consecuencia, el resto del mecanismo hay varios caminos posibles, y el más probable es que se adicione un AlH_3 al grupo carbonilo del carboxilato de litio (esquema 9). La eliminación da lugar a un aldehído, que se reduce rápidamente a alcóxido de litio. Por último, se añade agua para poder protonar el alcóxido a un alcohol primario (Wade, 2004).



Esquema 9. Mecanismo de reducción con tetrahidruro de Aluminio y Litio (LiAlH_4)

Fuente: Tomada y modificada (Wade. 2004)

Aparte de utilizar la reacción de hidrogenación catalítica, los investigadores (Hueso y cols., 2010), utilizaron esta reacción para la reducción del carbono 19 del ácido *ent*-kaurénico [1], y obtuvieron como producto el alcohol *ent*-kaurenol [4] utilizando etanol como reactivo para protonar el alcóxido.



Ácido *ent*-kaurénico [1]

Ent-kaurenol [4]

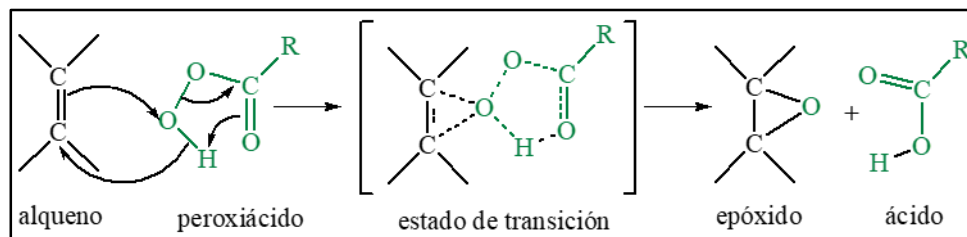
2.5.2 REACCIONES DE OXIDACIÓN

Las oxidaciones son particularmente importantes, ya que muchos grupos funcionales contienen oxígeno, y las oxidaciones de alquenos es uno de los mejores métodos para introducir oxígeno en moléculas orgánicas. En efecto, una epoxidación, hidroxilación o ruptura oxidativa a los dobles enlaces de los alquenos, se consideran unas de las principales oxidaciones que ha sufrido el ácido *ent*-kaurénico [1], ya sea en sus carbonos C₁₆ y C₁₇ o en las posiciones α y β .

2.5.2.1 Reacción de epoxidación

En una epoxidación, los alquenos se transforman en epóxidos con un peroxiácido, siendo este un ácido carboxílico que tiene un átomo extra de oxígeno en una unión –O–O–, el más común que se utiliza es el ácido *m*-cloroperoxibenzoico, comúnmente llamado (MCPBA). El inicio de esta reacción ocurre ya que el grupo –OH del peroxiácido, contiene un oxígeno electrófilico, que es atacado por el alqueno, adicionándolo al doble enlace para formar de esta manera el epóxido

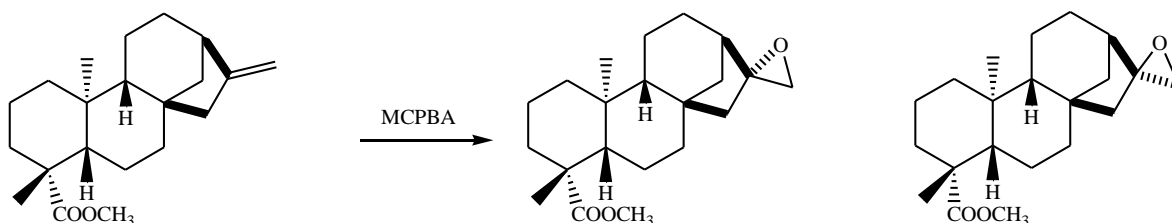
(Wade, 2004). En el esquema 10, podemos observar que esta reacción es concertada, debido a que se rompen y se forman varios enlaces al mismo tiempo.



Esquema 10. Mecanismo de una epoxidación

Fuente: Tomada y modificada (Wade, 2004)

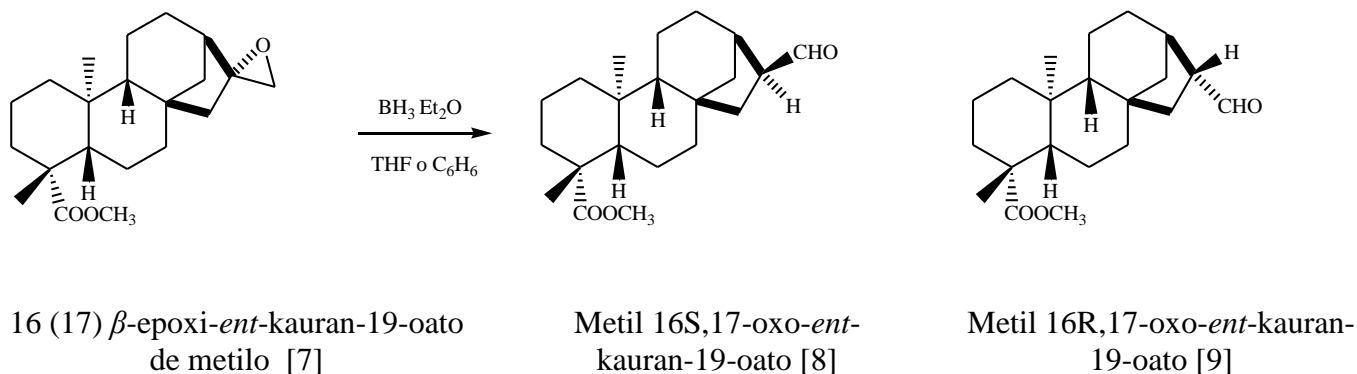
A partir de esta reacción, con el éster metílico 16-eno-*ent*-kaureno [6] los investigadores (Hueso y cols, 2010), utilizaron una cantidad de MCPBA al 70 %, DMC y NaHCO_3 por 25 min. Por otra parte (Batista y cols., 2013 y Morarescu, 2019), también realizaron esta reacción, pero cambiando un poco las condiciones con MCPBA, NaHCO_3 , CH_2Cl_2 , por 30 min. Los investigadores obtuvieron como producto el 16 (17) β -epoxi-*ent*-kauran-19-oato de metilo [7].



Éster metílico 16-eno-*ent*-kaureno [6] 16 (17) β -epoxi-*ent*-kauran-19-oato de metilo [7]

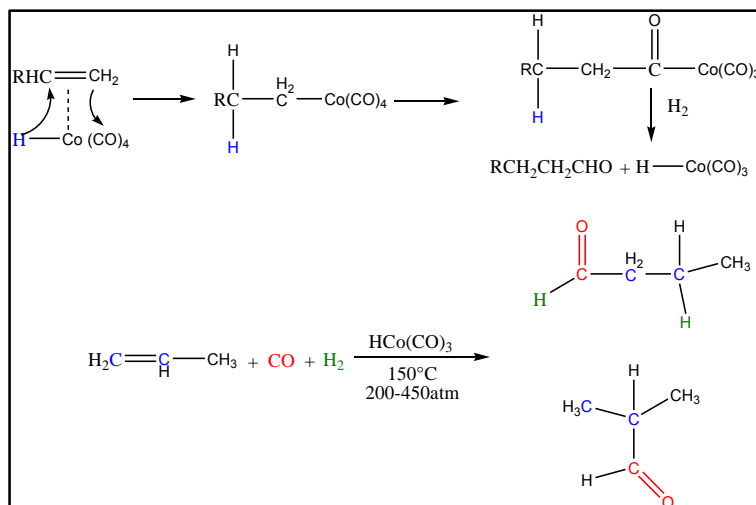
La mayoría de los epóxidos pueden ser protonados con cualquier ácido moderado, abriendo el anillo y formando un 1,2-diol (Wade, 2004). Por medio de los trabajos realizados, para la modificación del ácido *ent*-kaurénico [1], se ha visto que cuando se tiene una epoxidación al doble enlace en los carbonos C_{16} y C_{17} ; en consecuencia, de una hidrólisis ácida se produce una

hidroxilación anti del doble enlace. Los investigadores (Batista y cols., 2013 y Hueso y cols., 2010), luego de tener el grupo epóxido, obtuvieron los dos aldehídos, metil 16S,17-oxo-*ent*-kauran-19-oato [8] y el metil 16R,17-oxo-*ent*-kauran-19-oato [9] con los reactivos $\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$, en THF o C_6H_6 .



2.5.2.2 Reacción de hidroformilación.

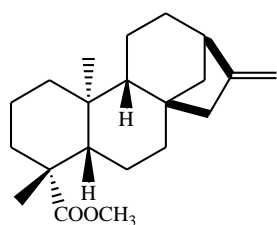
Este tipo de reacción o síntesis oxo, se usa para la producción de aldehídos a partir de alquenos. Esta se cataliza mediante compuestos de organorodio u organocobalto, y añade un átomo de hidrógeno al enlace $\text{C}=\text{C}$ para formar un enlace $\text{C}-\text{C}$, y un grupo formilo en la molécula, lo que crea un aldehído. Los primeros catalizadores conocidos y usados frecuentemente en reacciones de este tipo son los carbonilos de cobalto. La especie activa en este caso es el complejo $[\text{CoH}(\text{CO})_4]$, que opera a temperaturas y presiones altas (esquema 11) (Serrano, 2007).



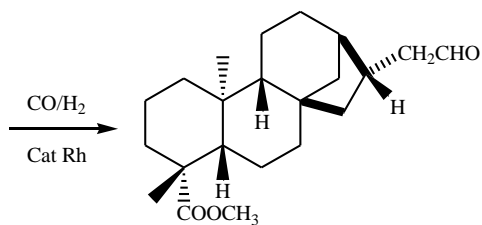
Esquema 11. Reacción de Hidroformilación

Tomado y modificado: (Serrano, 2007).

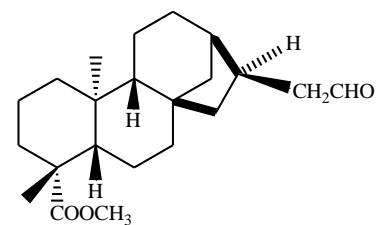
La hidroformilación del enlace $C_{16} = C_{17}$ en el ácido *ent*-kaurénico (Peixoto y cols., 2008 y Morarescu, 2019), utilizaron el uso de catalizadores a base de rodio. Los investigadores utilizaron dos tipos de sustrato, uno de ellos fue el éster metílico 16-eno-*ent*-kaureno [6], este derivado sufrió la modificación con Rh no modificado, Rh/ PPh_3 y sistemas catalíticos a base de Rh/tris-(*o*-t-butilfenil) fosfito. A continuación, se mostrarán los productos que se formaron con el sustrato del compuesto [6].



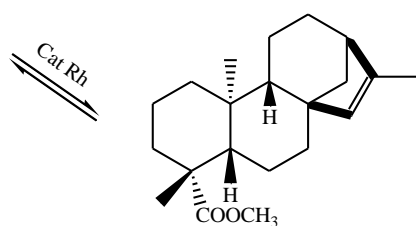
Éster metílico 16-eno-*ent*-
kaureno [6]



Éster metílico del 17- α -al-*ent*-
kaurénico [10]



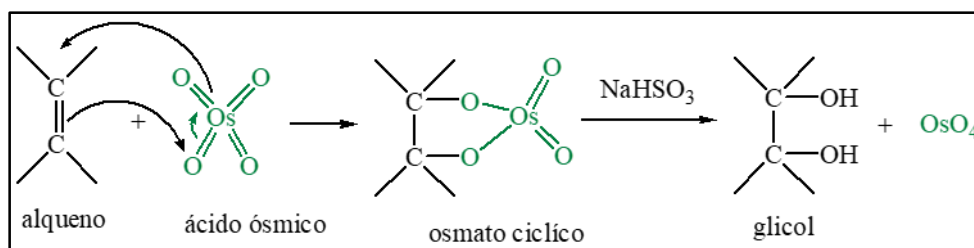
Éster metílico del 17- β -al-*ent*-
kaurénico [11]



Éster metílico del ácido isokaurénico [12]

2.5.2.3 Hidroxilación con tetraóxido de osmio (OsO_4)

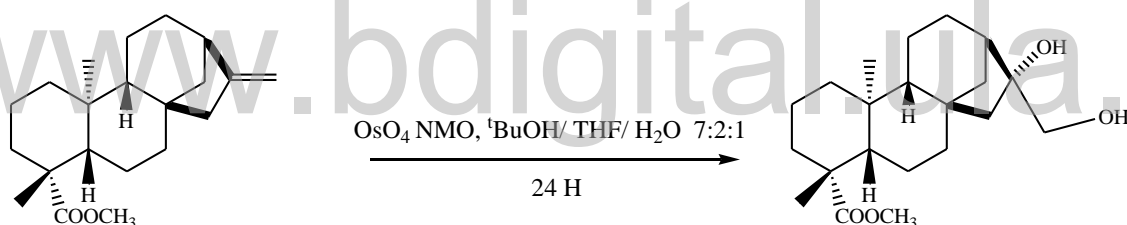
La reacción de hidroxilación de un grupo alqueno con tetraóxido de osmio (OsO_4), proporciona una adición de un grupo $-\text{OH}$, a cada uno de los carbonos del doble enlace. La reacción se lleva a cabo con estereoquímica *syn* y produce un 1,2-dialcohol, diol o simplemente un glicol. En esta reacción, no participa un carbocatión intermediario, se presenta a través de un osmato cíclico intermediario, el cual se cree que se forma en un solo paso por la adición de OsO_4 al alqueno (esquema 12). Finalmente, el osmato cíclico se rompe, gracias a la presencia de bisulfito de sodio NaHSO_3 acuoso (McMurry, 2012); sin embargo, para poder romper el éster ósmico cíclico, también se puede utilizar el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), este reactivo hidroliza el osmiato (éster) y reoxida al osmio a tetraóxido de osmio (Wade, 2004).



Esquema 12. Reacción de Hidroxilación con tetraóxido de osmio (OsO_4)

Fuente: Tomada y modificada (Wade, 2004, McMurry, 2012)

La hidroxilación se realiza por lo general utilizando una pequeña cantidad catalítica de OsO_4 , en presencia del N-óxido de N-metilmorfolina (NMO), que reacciona con rapidez con el osmato intermediario para producir el diol, más NMO y OsO_4 reoxidado el cual continúa hidrolizando a más moléculas de alqueno (Ríos, 2017). Los investigadores (Hueso y cols., 2010) realizaron esta reacción dando como producto al éster metílico del 16 α ,17-dihidroxi-*ent*-kaureno [13].



Éster metílico 16-eno-*ent*-
kaureno [6]

Éster metílico del 16 α ,17-dihidroxi-*ent*-kaureno [13]

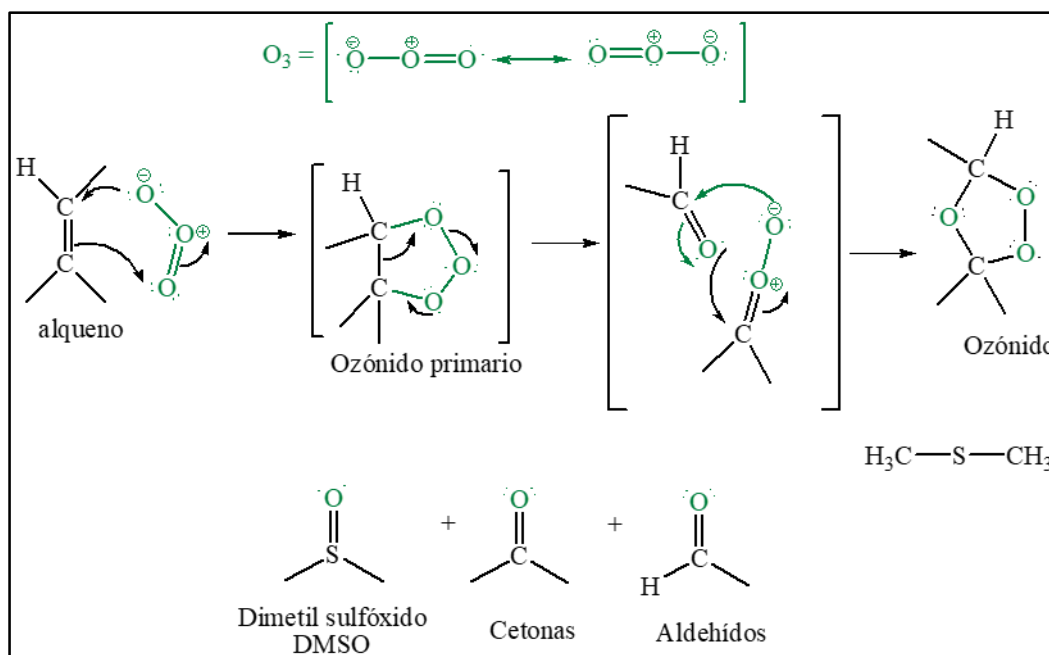
Las reacciones de oxidación tienden a tener condiciones un poco fuertes, y la mayoría de las veces se debe tomar ciertas prevenciones, para el uso de los reactivos. Por ejemplo, para las reacciones de los kaurenos, no se ha utilizado de cierta forma el permanganato de potasio (KMnO_4) ya que primero, si se requiere grupos hidroxilos en la molécula, se debe tener el permanganato en condiciones suaves (frío y diluido), para formar dichos productos; sin embargo, este reactivo en esa condición, da bajos rendimientos.

En condiciones fuertes el permanganato tiende a oxidar los alquenos a glicoles y de cierto modo automáticamente se rompen estos enlaces y principalmente se forman cetonas o aldehídos, hasta llegar a ácidos carboxílicos. Como el permanganato, el ozono (O_3) rompe los dobles enlaces para formar cetonas y aldehídos, pero en condiciones más suaves (Wade, 2004).

2.5.2.4 Reacción de ozonólisis O_3

El ozono O_3 es una forma de alta energía del oxígeno, se produce cuando la luz UV o una descarga eléctrica actúan en una atmósfera de oxígeno gaseoso. La estructura de Lewis del ozono, muestra que el átomo de oxígeno central soporta una carga positiva y cada uno de los átomos de oxígeno exteriores la mitad de la carga negativa. Una molécula de ozono reacciona con un alqueno, para formar un compuesto cíclico llamado ozónido primario, por lo que es bastante inestable ya que tiene dos uniones de peróxido ($-O-O-$), este se reordena rápidamente, incluso en temperaturas bajas para formar un ozónido (Wade, 2004).

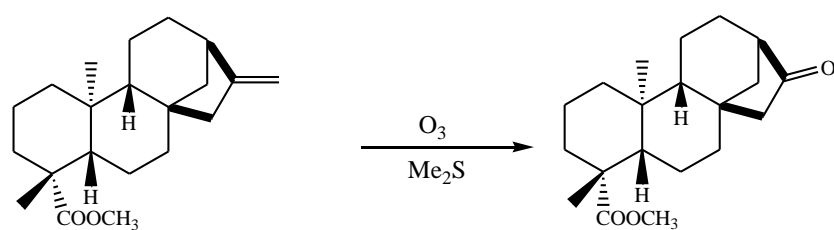
Los ozónidos no son muy estables y la mayoría de las veces se reducen inmediatamente con agentes reductores moderados como el zinc o el sulfuro de dimetilo. Como se puede observar en el esquema 13, los productos de esta reacción son cetonas y aldehídos.



Esquema 13. Mecanismo de ozonólisis

Fuente: Tomada y modificada (Wade, 2004)

El ácido *ent*-kaurénico [1] y algunos de sus derivados, también han sufrido reacciones de ozonólisis. Del mismo modo, los investigadores (Hueso y cols., 2011) realizaron esta reacción al éster metílico 16-eno-*ent*-kaureno [6] obteniendo al éster metílico 16-oxo-*ent*-kaureno [14].



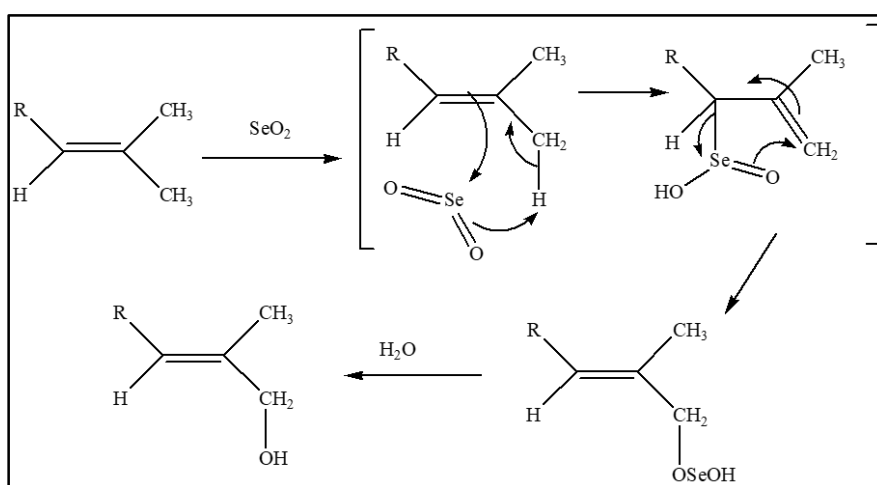
Éster metílico 16-eno-
ent-kaureno [6]

Éster metílico 16-oxo-*ent*-kaureno [14]

2.5.2.5 Oxidación con dióxido de selenio (SeO_2)

Existen muchas reacciones para adicionar un oxígeno a una molécula; no obstante, algunas de las condiciones que se utilizan para oxidar pueden ser tóxicas para el analista. El dióxido de selenio (SeO_2) es indicado como el reactivo más fiable para la inserción directa de un oxígeno, en un enlace carbono-hidrógeno alílico (Crich y cols., 2003). Para este tipo de reacción, existen una cierta serie de reglas para la hidroxilación selectiva de posiciones alílicas.

- En alquenos trisustituídos la hidroxilación ocurre en la posición α al carbono más sustituido del doble enlace
- Cuando el doble enlace está en un anillo, la oxidación transcurre dentro del anillo cuando sea posible, y la hidroxilación ocurre en el carbono α al carbono más sustituido del doble enlace.
- Tercero, el orden de facilidad en la oxidación es $\text{CH}_3 > \text{CH}_2 > \text{CH}$
- Finalmente, la oxidación de un doble enlace terminal genera un alcohol primario con migración alílica del doble enlace (Francis y cols., 1976).

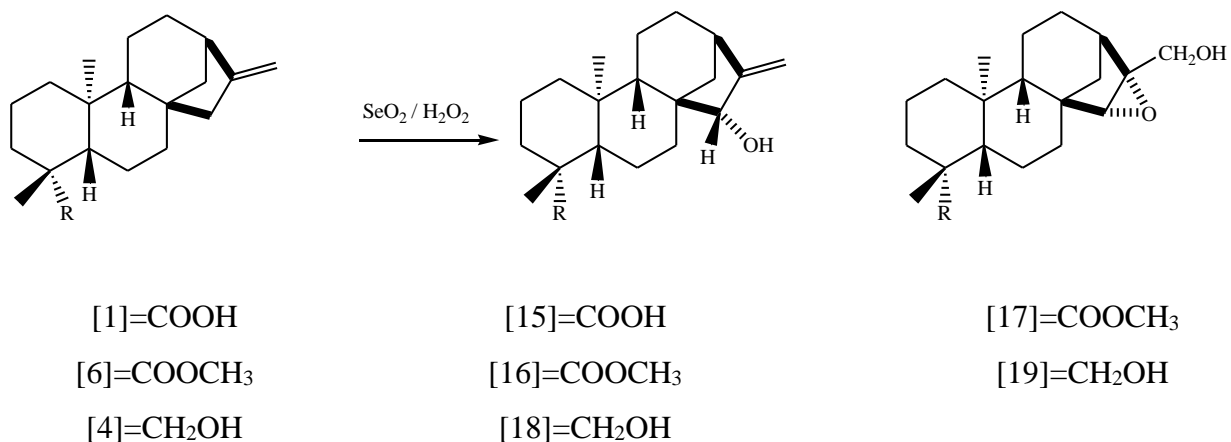


Esquema 14. Reacción de Hidroxilación con dióxido de selenio (SeO_2)

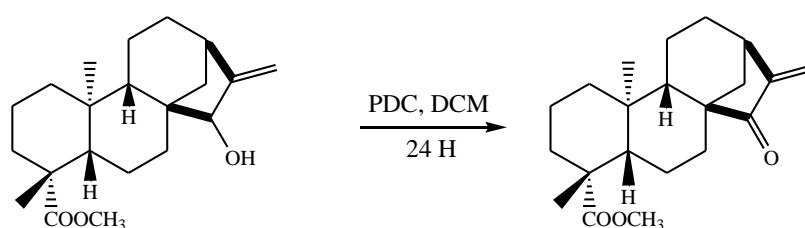
Fuente: Tomada y modificada (Smith, 2002).

Es importante que la reacción muestra una transformación general que parece ser una conversión directa de C-H a C-OH, pero la reacción está acompañada por dos migraciones del enlace π , como se muestra en el esquema 14 (Smith, 2002). En cuanto a la selectividad respecto a la posición más sustituida, se debe a que las adiciones tipo-énicas son electrofílicas y la densidad de carga positiva se estabiliza preferentemente en dicha posición (Ríos, 2017).

De manera similar, (Aparicio y cols., 2007) describieron la oxidación alílica del ácido *ent*-kaurénico [1], del éster metílico 16-eno-*ent*-kaureno [6] y el diterpeno *ent*-kaurenol [4] con $\text{SeO}_2/\text{H}_2\text{O}_2$. Las reacciones la llevaron a cabo, en una solución de dioxano a temperatura ambiente con una agitación durante 4 horas. El tratamiento del ácido *ent*-kaurénico [1] les proporcionó un 56 % de ácido 15 α -hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico [15]. Para el tratamiento del éster metílico 16-eno-*ent*-kaureno [6] obtuvieron dos productos, que fueron el metil 15 α -hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oato [16] con un 34 % de rendimiento, y el metilo 15 α ,16 α -epoxi-17-hidroxi-*ent*-kauran-19-oato [17] con un 59 % de rendimiento. Ahora, para el tratamiento del *ent*-kaurenol [4] obtuvieron dos productos que fueron, el 15 α ,19-dihidroxi-*ent*-kaur-16-eno [18] aproximadamente con un 57 % de rendimiento y el 15 α ,16 α -epoxi-17,19-dihidroxi-*ent*-kaurano [19] con un 34 % de rendimiento.



Los investigadores (Batista y cols., 2013) realizaron la misma reacción de hidroxilación, pero cambiando un poco las condiciones de los reactivos y el tiempo SeO_2 , $t\text{-BuOOH}$, CH_2Cl_2 , 45 min. Por otra parte, también los investigadores (Hueso y cols., 2010 y Peña y cols., 2014), realizaron la misma reacción cambiando un poco las condiciones. Las investigaciones que se han realizado luego de obtener el compuesto [14], en su mayoría como lo fue (Hueso y cols., 2010) oxidaron el compuesto [16] para producir la cetona α , β -insaturada metil 15α -oxo-*ent*-kaur-16-en-19-oato [20], con un tratamiento de PDC, DCM, por 24 horas.

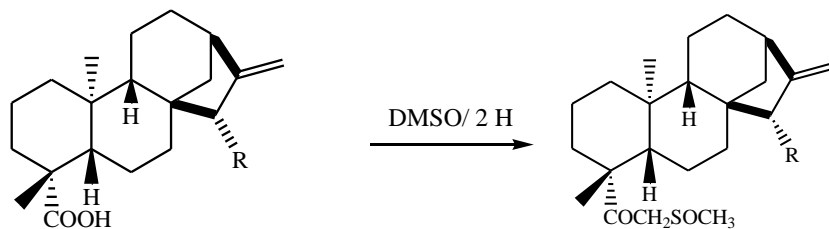


Metil 15α -hidroxi-*ent*-
kaur-16-en-19-oato [16]

α , β -insaturada metil 15α -oxo-*ent*-
kaur-16-en-19-oato [20]

Hasta ahora, las reacciones que se han estudiado la mayoría es para oxidar, ya sea la posición del carbono α , o modificar el doble enlace exocíclico del kaureno. Los investigadores (Peña y cols., 2015) ensayaron la posible oxidación del grupo hidroxilo del ácido 15α -hidroxi-*ent*-kaur-16-eno-19-oico [15]. Este compuesto al igual que el ácido *ent*-kaurénico [1], el ácido 15α -acetoxi-*ent*-kaur-16-eno-19-oico [21] y el ácido 15 -oxo-*ent*-kaur-16-eno-19-oico [22], fueron disueltos (por separado) en DMSO y los llevaron a reflujo por 2 horas. En lugar de obtener los derivados deseados, obtuvieron nuevos compuestos. Para obtener el compuesto [21], realizaron una acetilación al compuesto [15] con anhídrido acético y piridina. Ahora, para la obtención del compuesto [22], utilizaron el [21] con complejo de ácido crómico/piridina, durante 24 horas bajo agitación continua a temperatura ambiente.

Finalmente, los derivados de kaurenos en presencia de DMSO son: del compuesto [1], se sintetizó el 19-oxo-*ent*-kaur-16-en-19-metilen-metil-sulfóxido [23], del derivado [15] se obtuvo el 15 α -hidroxi-19-oxo-*ent*-kaur-16-en-19-metilén-metil-sulfóxido [24], del [21], el 15 α -acetoxi-19-oxo-*ent*-kaur-16-en-19-metilén-metil-sulfóxido [25], y del [22] el 15,19-dioxo-*ent*-kaur-16-eno-19-metilén-metil-sulfóxido [26].



[1] R=H

[23] R=H

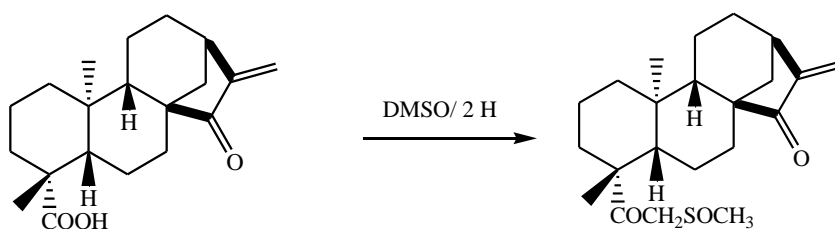
[15] R=OH

[24] R=OH

[21] R=OCOCH₃

[25] R=OCOCH₃

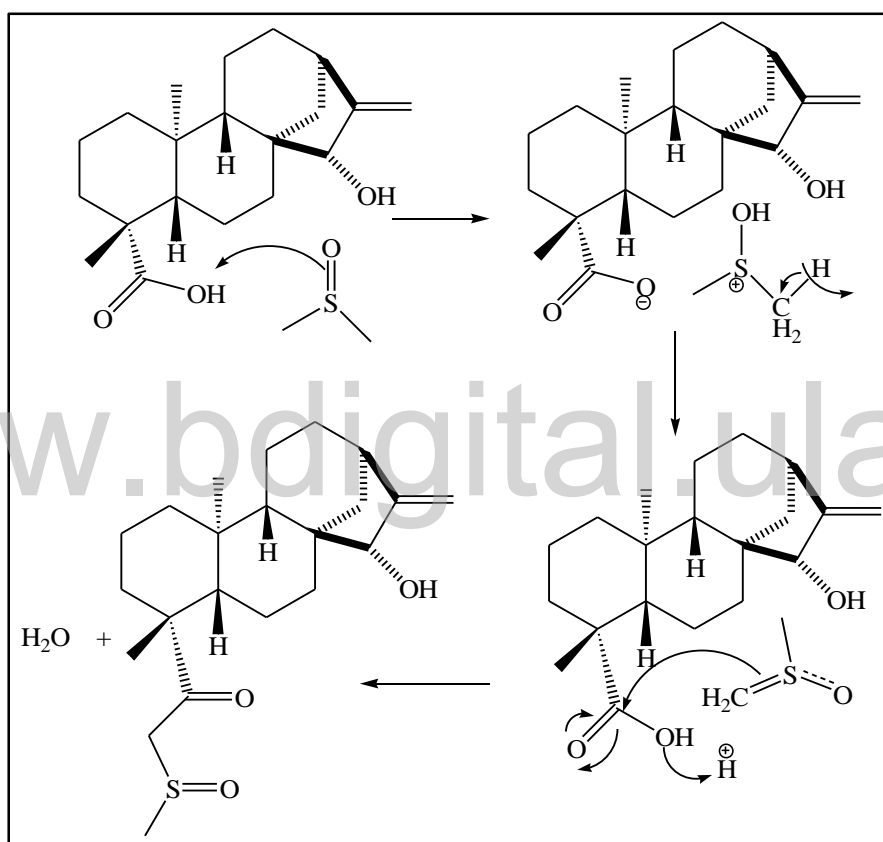
www.bdigital.ula.ve



Ácido 15-oxo-*ent*-kaur-16-eno-
19-oico [22]

15,19-dioxo-*ent*-kaur-16-eno-19-metilén-
metil-sulfóxido [26]

Los investigadores concluyeron que probablemente la presencia de un medio débilmente ácido como el grupo carboxílico del ácido *ent*-kaurénico [1], o el de algunos de sus derivados oxigenados, actúen como activadores del DMSO promoviendo la formación de un iluro de azufre; dándole así la capacidad de comportarse como un nucleófilo, atacando de esta manera al carbono del grupo carboxílico y luego con pérdida de una molécula de agua formar el sulfóxido, como se puede observar en el esquema 15.



Esquema 15. Reacción de DMSO

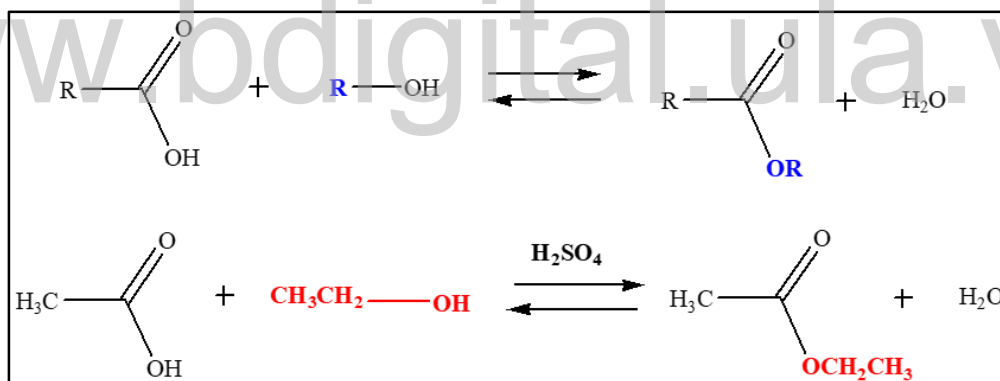
Fuente: Tomada y modificada (Peña y cols., 2015)

2.5.3 REACCIONES DE ESTERIFICACIONES

Los ácidos carboxílicos son los compuestos con gran variedad de reacciones, y en especial sus derivados tienden a ser más susceptibles a la formación de nuevos compuestos (Wade, 2004). Los ésteres comprenden una gran familia de compuestos orgánicos con aplicaciones en la medicina, la biología, la química y la industria farmacéutica.

2.5.3.1 Esterificación de Fischer

Una de las principales reacciones para la obtención de ésteres es la reacción de Fischer. En esta reacción se requiere de un ácido carboxílico, con un alcohol en presencia de un ácido fuerte (HCl ó H₂SO₄) (esquema 16) (Morais y cols., 2014).

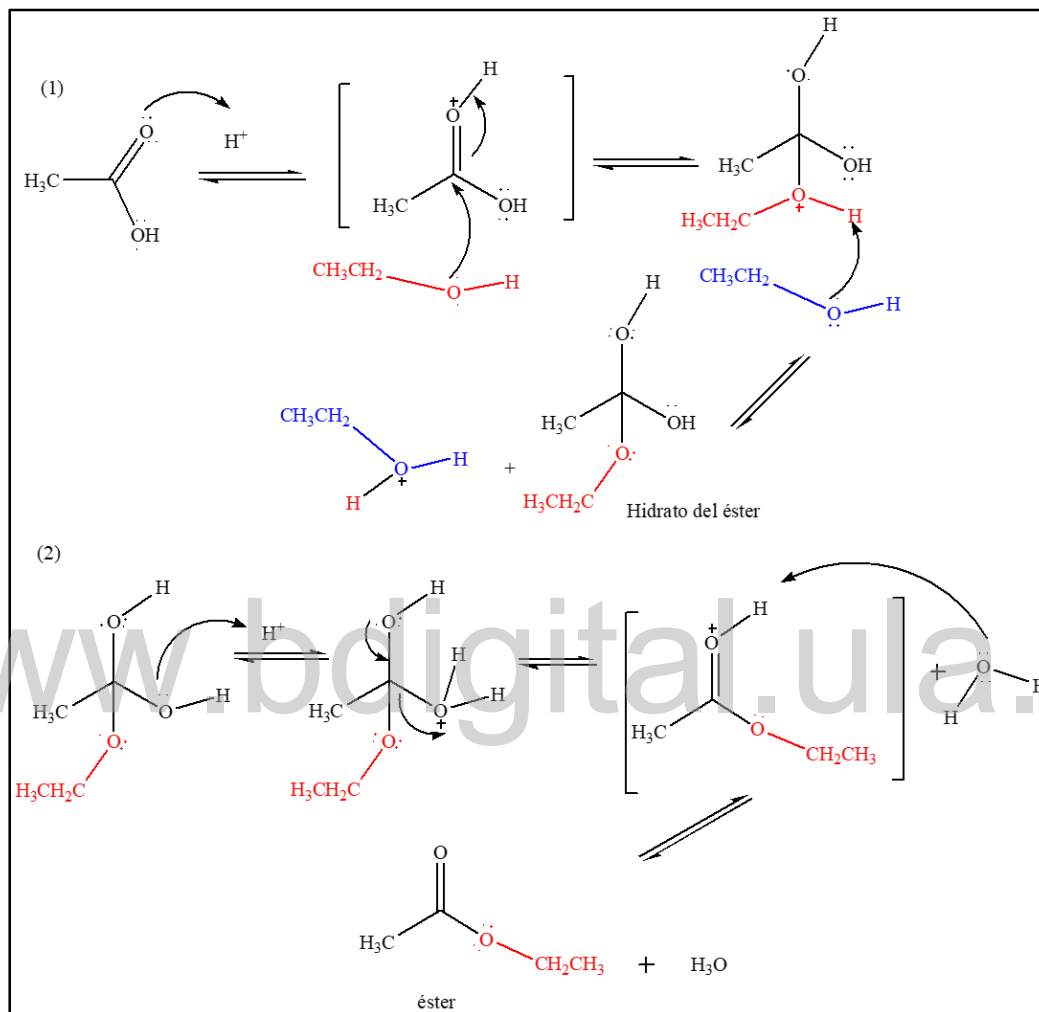


Esquema 16. Esterificación de Fischer

Fuente: Tomada y modificada (Wade, 2004)

Esta esterificación de Fischer consiste en una sustitución nucleofílica del grupo acilo. El inicio de esta reacción, el ácido mineral (H₂SO₄) protona el átomo de oxígeno del grupo carbonilo, tornando el ácido carboxílico mucho más reactivo al ataque nucleofílico del alcohol, dando origen a un intermediario tetraédrico (esquema 17) (Morais y cols., 2014). Posteriormente, la transferencia de un protón de un átomo de oxígeno a otro produce un segundo intermediario

tetraédrico y convierte el –OH en un buen grupo saliente (Wade, 2004) Finalmente, la pérdida de un protón y de agua regenera el catalizador ácido, originando un éster.



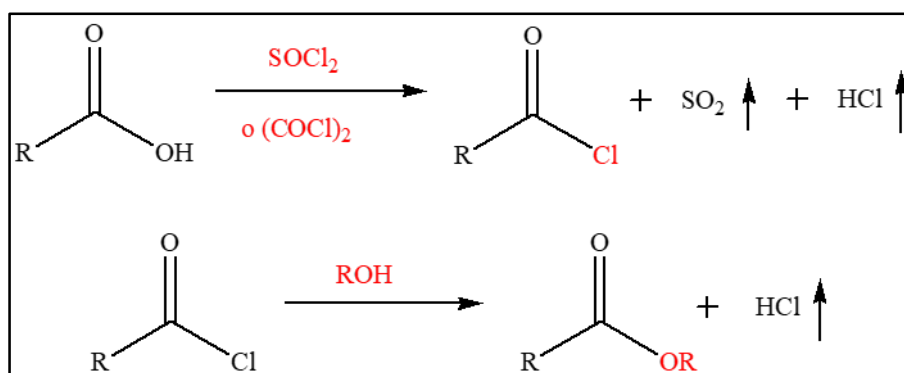
Esquema 17. Mecanismo de la reacción de una esterificación de Fischer

Fuente: Tomada y Modificada (Wade, 2004)

2.5.3.2 Síntesis de cloruros de ácido

Los cloruros de ácido, también son llamados cloruros de acilo, se sintetizan a partir de los ácidos carboxílicos correspondientes, utilizando una amplia variedad de reactivos. Los reactivos más utilizados para esta reacción es el cloruro de tionilo (SOCl_2) y el cloruro de oxalilo (COCl_2),

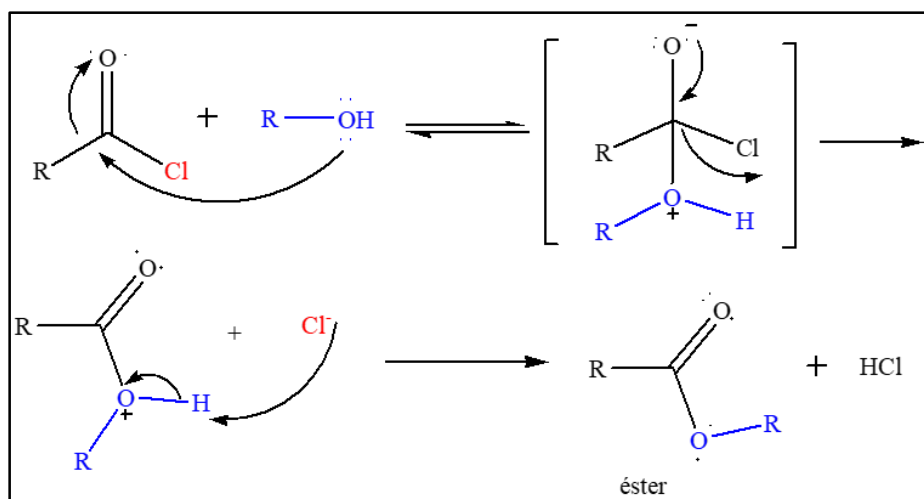
(Wade, 2004). El cloro es un inductivo más no un donador de electrones de resonancia, hay poca deslocalización de los pares de electrones del cloro en el sistema de un cloruro de acilo, el efecto inductivo de un sustituyente de cloro sin una compensación significativa, es el efecto liberador de electrones debido a la donación de un solo par por cloro. Este efecto inductivo del cloro, hace que el carbono del carbonilo, sea más susceptible al ataque del nucleofilo que de otros derivados del ácido carboxílico (Wade, 2004).



Esquema 18. Reacción para la obtención del cloruro de acilo

Fuente: Tomada y Modificada (Wade, 2004)

La mejor ruta sintética para obtener un éster, anhídrido o amida, suele incluir la utilización de un cloruro de acilo como intermediario. Los cloruros de ácido cuando reaccionan con alcoholes forman ésteres, esta reacción se debe a través de una sustitución nucleofílica del grupo acilo por el mecanismo de adición-eliminación. El ataque del alcohol al grupo carbonilo electrofílico da lugar a un intermediario tetraédrico; finalmente la pérdida del cloruro y la desprotonación, da lugar a un éster (esquema 19) (Hornback, 2006).

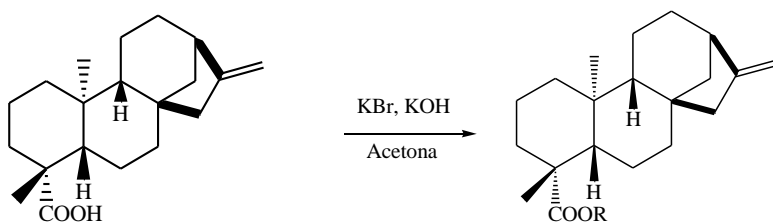


Esquema 19. Mecanismo para la obtención de un éster por medio de un cloruro de acilo

Fuente: Tomada y modificada (Hornback, 2006).

Por otro lado, se tiene otra reacción para preparar ésteres a partir de ácidos carboxílicos, que es por medio de una reacción S_N2 de un ion carboxilato, con un halogenuro de alquilo primario (McMurry, 2012). Esta reacción es sencilla, pero en algunos casos primero el ácido carboxílico se convierte a un cloruro de acilo. En este sentido, los investigadores (Boeck y cols., 2005) reportaron un método simple para la preparación de ésteres del ácido *ent*-kaurénico [1], sobre la base de una O-alkilación del grupo ácido, con un halogenuro de alquilo en presencia de KOH en acetona. Como resultado de la síntesis con halogenuros de alquilo, los investigadores obtuvieron 7 derivados a base de ésteres.

Del mismo modo, el investigador (Carrillo, 2011) realizó esta reacción al diterpeno ácido *ent*-grandiflorénico [2], utilizando los halogenuros 1,2-dibromoetano, (3-bromopropil) benceno, yoduro de metilo y 1,10-didromodecano. Por medio de los resultados obtenidos, le permitió obtener ésteres con buenos rendimientos; sin embargo, a pesar de los buenos rendimientos, recomendó utilizar halogenuros de alquilo primarios que no tengan fuerte impedimento estérico.



Ácido *ent*-kaurénico [1]

[6] R=CH₃

[27] R=CH₃CH₂CH₂CH₂

[28] R=PhCH₂

[29] R=4-ClPhCH₂

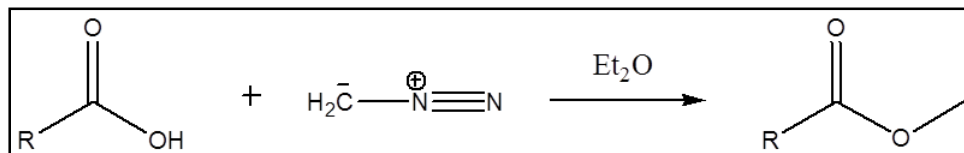
[30] R=4-BrPhCH₂

[31] R=4-FPhCH₂

[32] R=4-NO₂PhCH₂

2.5.3.3. Esterificación con diazometano

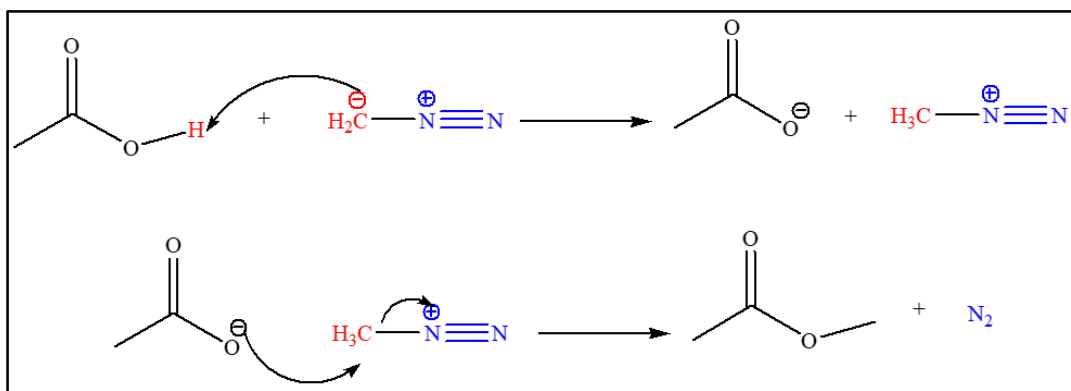
Existe otra reacción para la obtención de ésteres y se ha utilizado frecuentemente para la preparación de ésteres metílicos, es mediante la reacción de ácidos carboxílicos con diazometano (CH₂N₂) (esquema 20). Esta reacción permite obtener ésteres en condiciones más suaves; aunque, es poco utilizada debido a la elevada toxicidad del diazometano (McMurry, 2012).



Esquema 20. Reacción de esterificación con diazometano

Fuente: Tomada y modificada (McMurry, 2012)

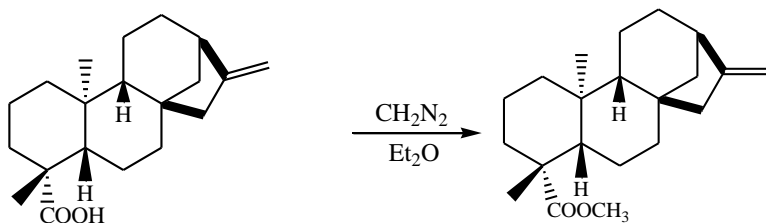
La reacción ocurre en dos pasos (esquema 21), el primero es la protonación del diazometano por el ácido carboxílico para producir el ión metildiazonio (CH_3N_2^+) y un ión carboxilato, y el segundo es la reacción del ión carboxilato que ataca al carbocatión, que se produce con CH_3N_2^+ (McMurry, 2012).



Esquema 21. Mecanismo general de una esterificación con diazometano

Fuente: Tomada y modificada (McMurry, 2012)

La mayoría de los derivados del ácido *ent*-kaurénico [1], como se pudo observar anteriormente, se esterifican antes de la modificación del doble enlace, de los carbonos C_{16} y C_{17} , de modo que la mayoría de los derivados de los kaurenos son ésteres. En consecuencia, los investigadores (Hueso y cols., 2010 y Batista y cols., 2013) sintetizaron ésteres a partir de esta reacción, utilizando en éter etílico $[(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{O}]$ obteniendo como producto el éster metílico *ent*-16-en-kaureno [6].

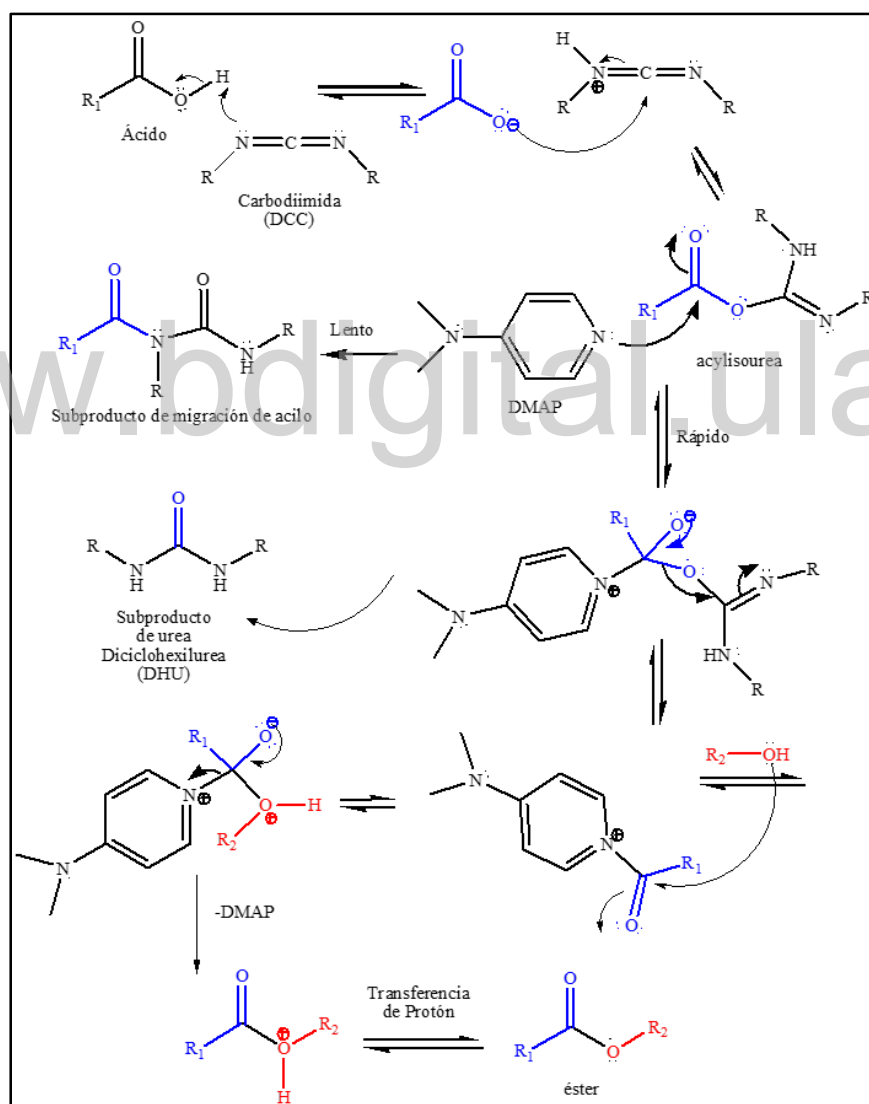


Ácido *ent*-kaurénico [1]

Éster metílico *ent*-16-en-kaureno [6]

2.5.3.4 Esterificación de Steglich

La esterificación de Steglich (esquema 22), es una reacción suave y no requiere altas temperaturas, se basa en activar un ácido y llegar a la formación de un éster, con los reactivos carbodiimida (DCC) y N-(dimetilamino) piridina (DMAP). El primer paso es la activación del ácido con el reactivo comúnmente llamado N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC), para formar un intermedio acylisourea (Fahim y cols., 2021).



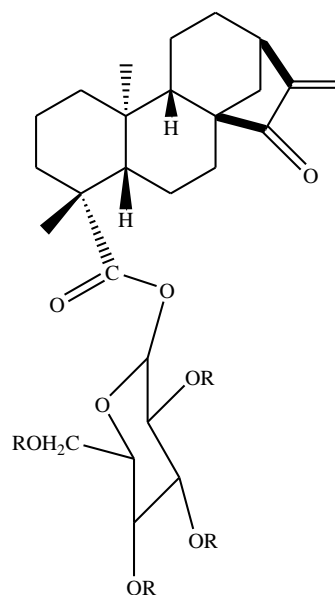
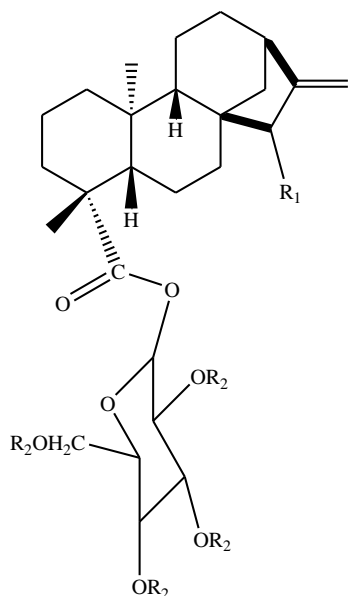
Esquema 22. Mecanismo de la esterificación de Steglich

Fuente: Tomada y modificada (Lutjen y cols., 2018)

El siguiente paso de la reacción, es la adición de N-(dimetilamino) piridina (DMAP), que es requerido para minimizar la formación del subproducto improductivo de migración de acilo, que es competitivo con el ataque nucleofílico del alcohol, en el intermedio acylisourea. Además, usando un exceso de DMAP se forma un intermedio de acil piridinio, que luego reacciona con el alcohol para regenerar el DMAP y formar el éster como producto final (Lutjen y cols., 2018). Las reacciones de acoplamiento de carbodiimida, a menudo se realizan en disolventes clorados anhidros o dimetilformamida (DMF), bajo una atmósfera de nitrógeno. Es necesario resaltar, que esta reacción es un método conveniente para la esterificación de ácidos carboxílicos con alcoholes, fenoles y tioles bajo condiciones suaves en presencia de carbodiimidas como lo es el 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDCI) y dicitclohexil carbodiimida (DCC) (Neisis y Steglich, 1978).

La obtención de los derivados de ésteres, el investigador (Carrillo, 2011) aparte de utilizar reacciones con halogenuros de alquilo, también modificó la estructura del ácido *ent*-grandiflorénico [2], con el éster metílico de la glicina en presencia de dicitclohexilcarbodiimida (DCC) y N,N-dimetilaminopiridina (DMAP) en CH₂Cl₂; sin embargo, pudo comprobar que acoplar el ácido *ent*-grandiflorénico [2] con otros ésteres de aminoácidos y otros compuestos, su impedimento estérico no permite el acoplamiento con compuestos más grandes que el éster metílico de la glicina. Del mismo modo, la investigadora (Ríos, 2017) utilizó la reacción de Steglich para la modificación del ácido *ent*-grandiflorénico [2], obteniendo 13 derivados de ésteres.

En efecto, el ácido *ent*-kaurénico [1] ha sufrido muchas reacciones, y una que podemos mencionar es la reacción para la obtención de derivados con glucósidos. Los investigadores (Villasmil y cols., 2014) obtuvieron nuevos ésteres glicosídicos, de los ácidos 15 α -hidroxi-*ent*-kaur-16-eno-19-oico [15], 15 α -acetoxi-*ent*-kaur-16-eno-19-oico [21] y el 15-oxo-*ent*-kaur-16-eno-19-oico [22]. Los ésteres se obtuvieron mediante reacción de las sales de plata de los ácidos con bromuro de tetra-acetato de α -D-glucopiranososa en benceno seco. Los ésteres carbohidrato que obtuvieron lo trataron con NH₃ en metanol libre de humedad para remover los grupos acetato.



[33] $R_1=OH$ $R_2=OCHOCH=(CH_3)_2$

[34] $R_1=OH$ $R_2=OH$

[35] $R_1=OAc$ $R_2=OAc$

[36] $R_1=OAc$ $R_2=OH$

[37] $R=OAc$

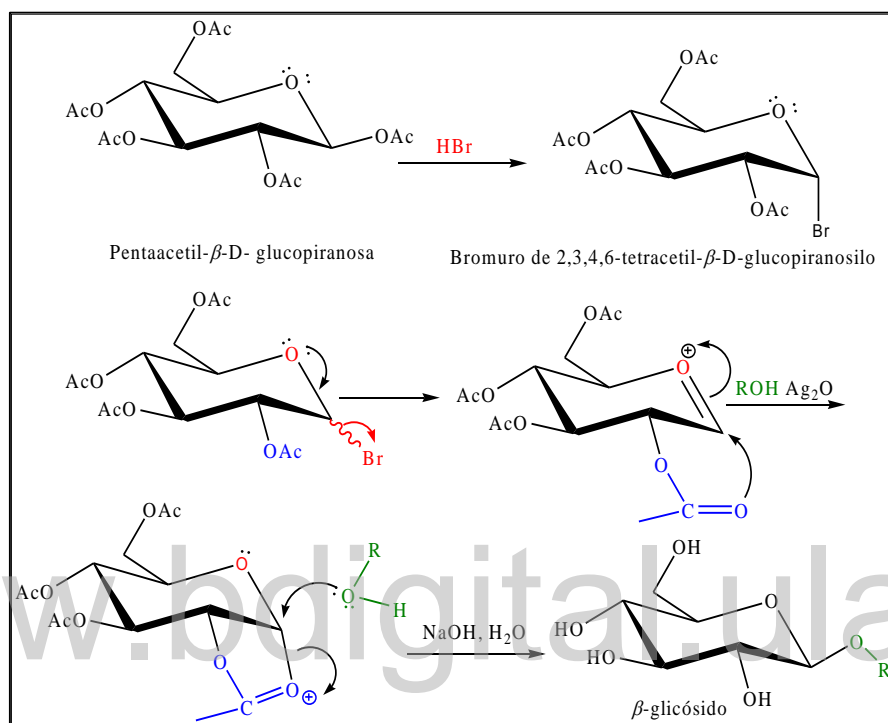
[38] $R=OH$

2.5.4. REACCIONES DE ADICIÓN

2.5.4.1. Reacción de Koenings Knorr

La reacción de Koenings Knorr, consiste en una sustitución nucleofílica SN_2 entre un alcohol y un 1-halomonosacarido. La ruta comienza con la reacción del pentaacetil- β -D-glucopiranososa con HBr para formar el bromuro de tetracetil- β -glucopiranosilo, luego el bromuro de piranosilo, tanto el anómero α o β , experimenta una pérdida espontánea parecida a una SN_1 del Br^- , seguida de una reacción interna con el grupo éster del carbono C_2 para formar un ion oxonio. Dado que el grupo acetato se encuentra en la parte inferior del anillo, el enlace C-O se forma en la parte inferior. El desplazamiento tipo SN_2 del ion oxonio, ocurre con la inversión usual de la configuración. La

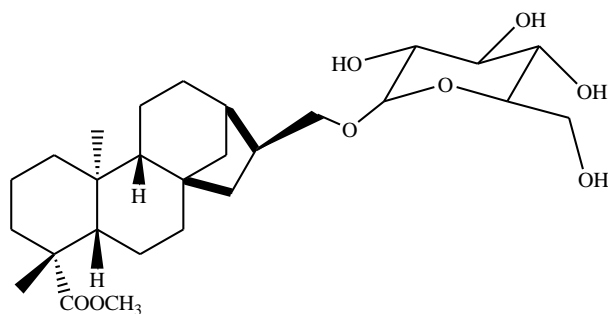
adición de una sal como el óxido de plata, permite la adición nucleofílica del alcohol elegido. Finalmente, como se puede observar en el esquema 23, se realiza una hidrólisis de los grupos acetal remanentes para forma el producto β -glucósido (Igarashi, 1977).



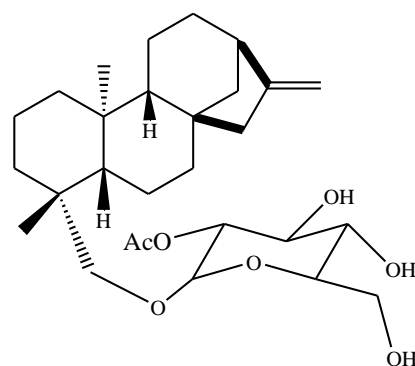
Esquema 23. Reacción de Koenings Knorr

Fuente: Tomada y modificada (Igarashi, 1977)

Los investigadores (Batista y cols., 2007) obtuvieron nuevos glucósidos de kaurenos mediante la reacción de Koenigs-Knorr entre los alcoholes C_{17} y C_{19} de los derivados kaurenos con bromuro de 2,3,4,6-tetra- O -acetil-glucopiranosilo, seguido de una hidrólisis de los acetatos. A continuación, se mostrará los productos mayoritarios que obtuvieron que son *ent*-19-metoxi-19-oxo-16 α -kauran-17-il α -D glucopiranosido [39] y el *ent*-kaur-16-en-19-il 2- O -acetil- α -D-glucopirano [40]



Ent-19-metoxi-19-oxo-16 α -kauran-17-il α -D
glucopiranosido [39]



Ent-kaur-16-en-19-il 2-*O*-acetil- α -D
glucopirano [40]

Es necesario resaltar otro grupo importante para la modificación del C₁₉ del ácido carboxílico, son las amidas. El método clásico para la síntesis de amidas es la reacción de ácidos carboxílicos con aminas a altas temperaturas; no obstante, esta reacción es difícil debido a que las aminas son bases que convierten a los grupos carboxilos ácidos en sus aniones carboxilatos no reactivos, en tal sentido lo más común es la conversión del ácido carboxílico en un grupo funcional más reactivo como lo es el cloruro de acilo (Shaabani y cols., 2007). Es por esta razón, que los investigadores (Vieira y cols., 2002) sintetizaron doce nuevos derivados a base del ácido *ent*-kaurénico [1] con cuatro amidas, cuatro aminas (tres hidroclocloradas) y cuatro oximas.

En líneas generales, se han realizado muchas modificaciones al ácido *ent*-kaurénico [1], para poder llegar a nuevos productos semisintéticos; por lo tanto, es un poco complejo, mostrar todas las modificaciones que se han realizado estos últimos años. Entre los objetivos de este trabajo se pretende realizar hemisíntesis del mismo, y se obtendrán compuestos que deben separarse y elucidarse; y para ello es necesario el uso de ciertas técnicas que abordaremos en la siguiente sección.

2.6 TÉCNICAS DE SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN

2.6.1 Cromatografía

En relación a la cromatografía, consta de un método físico de separación en donde los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una estacionaria, y la otra que se mueve en una dirección determinada que es llamada fase móvil (Marcano y Hasegawa, 2002). Para poder separar una mezcla, existen varios tipos de cromatografía, como lo son: la cromatografía de adsorción, de partición, de filtración con geles, y de intercambio iónico. Para esta investigación se utilizó la cromatografía de adsorción.

2.6.2. Cromatografía de adsorción

Esta técnica se basa en las distintas afinidades que tiene los componentes de la muestra, hacia la superficie de un sólido activo. Estas afinidades que ocurre con la muestra y la superficie, están dadas por la formación de uniones, dipolo o formación de puentes hidrógeno (Galagovsky, 2016). En efecto, si se trata de una mezcla de solutos, el más fuertemente atraído por el adsorbente, será el más difícil de eluir y será el que corre o se desplace menos. En la química orgánica, se utiliza esta cromatografía ya que permite identificar o aislar el analito a estudiar.

Dicho esto, para este trabajo de investigación, se utilizaron dos técnicas de separación para los productos de la hemisíntesis del ácido *ent*-kaurénico [1], y son la cromatografía de columna, cromatografía preparativa y capa fina.

2.6.2.1. Cromatografía de columna

En esta técnica de separación, se caracteriza por tener la fase estacionaria dentro de una columna de vidrio, por la que se hace pasar una fase móvil ya sea líquida o gaseosa. Este método de separación va depender según la afinidad de las moléculas por la fase móvil o la estacionaria. Para las hemisíntesis del ácido *ent*-kaurénico [1], se utilizará la cromatografía clásica en columna y la cromatografía preparativa. De este modo, (Galagovsky, 2016) afirma que la cromatografía analítica se realiza mediante una pequeña muestra, con el fin de poder cuantificar la proporción de los componentes de cualquier mezcla; en cambio, la preparativa separa los componentes de una mezcla para su procesamiento.

De igual forma, para que se pueda realizar una buena separación, se necesita tener condiciones adecuadas, con respecto al relleno de la columna. Los sólidos absorbentes más utilizados en la fase estacionaria son el gel de sílice (SiO_2) y alúmina (Al_2O_3). La alúmina anhidra es el más activo de los dos, ya que retiene con más fuerza a los compuestos, y es por ello que se utiliza para separar compuestos relativamente apolares como lo son los (hidrocarburos, haluros de alquilo, éteres, aldehídos y cetonas); al contrario, el gel de sílice se utiliza para separar sustancias más polares como lo son los alcoholes, aminas y ácidos carboxílicos (Braithwalte y cols., 1996).

El proceso de adsorción de la fase estacionaria con el soluto, se debe a interacciones intermoleculares de tipo dipolo-dipolo o enlaces de hidrógeno; sin embargo, cuando hay gran densidad de relleno (empaquetamiento), es necesario aplicar presión para que el solvente fluya a través de la fase estacionaria. En este sentido, la mayoría de los casos, para generar presión durante la cromatografía se utiliza aire. Finalmente, para la preparación de la muestra que se quiere separar, se deposita en la parte superior de la columna y el resto de la columna se llena con el eluyente, que es el disolvente que constituye la fase móvil (Galagovsky, 2016).

2.6.2.2 Cromatografía en capa fina (CCF)

Por otra parte, la otra técnica de separación que es la cromatografía en capa fina, esta se usa a menudo para monitorear una reacción química, ya que permite conocer de manera rápida, cuantos componentes se encuentran en una muestra. Esta es una herramienta muy eficaz cualitativamente, y muy sencilla de realizar. Para esta cromatografía en capa fina (TLC), la fase estacionaria es una capa de partículas de unos milímetros de espesor, fijadas sobre un soporte sólido, que generalmente es de sílica gel.

El procedimiento de separación de esta técnica, consiste en que después de aplicar el analito cerca de la parte inferior de la placa seca (proceso de siembra, que pueden utilizarse tubos capilares), se coloca la placa en una cámara con el disolvente (fase móvil), y así empieza a producirse la separación. En consecuencia, la mancha en una placa de TLC se caracteriza por la distancia que recorre con relación a la distancia recorrida por la fase móvil. Por lo tanto, (Galagovsky, 2016) indica que el grado de retención en cromatografía plana de superficie, se expresa como el factor de retardación, o índice de retención (R_f) como se muestra a continuación:

$$R_f = \frac{\text{Distancia de desplazamiento de soluto}}{\text{Distancia de desplazamiento del disolvente}}$$

El “frente” del disolvente es el límite alcanzado por la fase móvil, en que éste se mide la distancia en que se ha desplazado. Finalmente, la detección y localización de las manchas (el soluto) en la placa de TLC, se hace observando los cambios en la fluorescencia, o absorción en el U.V., de un indicador que se incorpora a la fase estacionaria (Galagovsky, 2016).

En conclusión, luego de obtener la separación y la purificación de los derivados del ácido *ent*-kaurénico [1], se necesitan técnicas para la caracterización de estos derivados. En el área de la química orgánica, cuando se habla de caracterización, se necesita saber cómo están conectados los átomos, y como está conformada una molécula. Por esta razón, se necesitan técnicas de elucidaciones, como lo es la espectroscopía y la espectrometría.

2.7. TÉCNICAS DE ELUCIDACIÓN

Las técnicas de elucidación, son las más versátiles para poder identificar una estructura química, y son muy importantes en el área de la farmacéutica y medicina, ya que ayuda generar nuevos fármacos. En efecto, la definición de espectroscopia, es el estudio que ocurre con la interacción de la radiación electromagnética junto con la materia.

El espectro electromagnético, es el conjunto de todas las radiaciones electromagnéticas ordenadas por orden de frecuencia o de longitud de onda y se divide en distintas zonas. En la figura 5, podemos observar las distintas radiaciones del espectro electromagnético. En el lado derecho de la figura 5, se encuentran las frecuencias más bajas, junto con las longitudes de ondas más largas y energía más baja. En la parte izquierda se encuentran las frecuencias más altas, junto con las longitudes de ondas más cortas y la energía más alta (Wade, 2004).

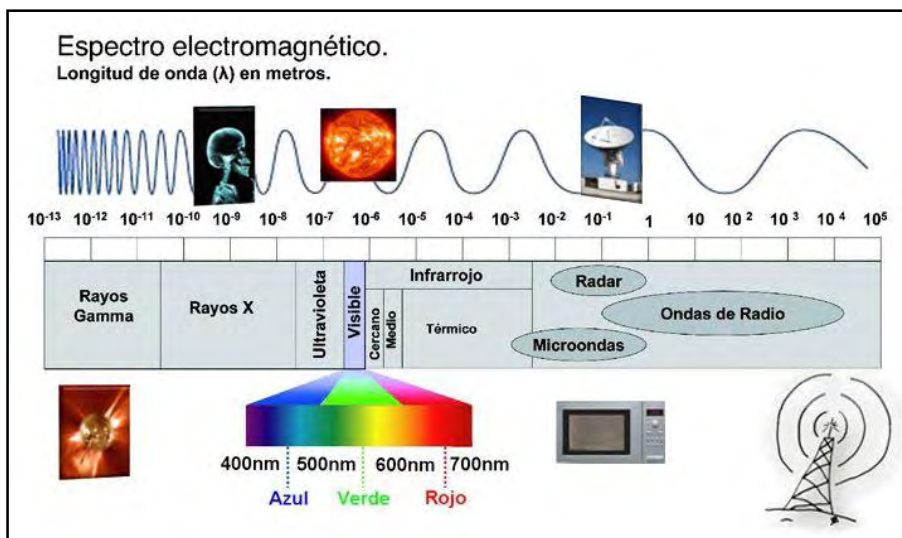


Figura 5. Espectro electromagnético

Fuente: Tomada y modificada Radiación electromagnética

<https://ar.pinterest.com/pin/365636063480560325/>

Por lo tanto, para caracterizar los derivados obtenidos de la hemisíntesis del ácido *ent*-kaurénico [1], se utilizaron dos técnicas espectroscópicas de absorción molecular que son la espectroscopía infrarroja (IR), la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectrometría de masas (EM).

2.7.1. Espectroscopia Infrarroja (IR)

Una de las ventajas de la espectroscopía infrarroja (IR), es la información que proporciona sobre los grupos funcionales que se encuentra en una molécula. Los grupos funcionales son aquellos átomos que hace que una molécula tenga diferentes propiedades químicas. Para poder identificar los grupos funcionales de los productos de la hemisíntesis del ácido *ent*-kaurénico [1], se utilizó esta técnica espectroscópica.

Las moléculas siempre están vibrando constantemente, y todos los movimientos de vibración de una molécula son una combinación de lo que se conoce como modos normales de vibración, que son $3N-6$ para las moléculas no lineales y $3N-5$ para las moléculas lineales, donde N es el número de átomos en la molécula. El fundamento de esta espectroscopía nos indica, cuando se irradia a una molécula luz infrarroja, y la frecuencia de ésta coincide con la frecuencia de vibración de alguno de los modos normales, se produce una absorción de energía, que se registra como una banda en el espectro del compuesto. Esto provoca que ese modo normal de vibración pase de su estado basal a un estado excitado, en el que la amplitud y energía cinética de dicha vibración son mayores que en el estado basal, pero la frecuencia de la vibración se mantiene constante (Olsen, 2016).

Es importante que la molécula a estudiar, tenga un momento dipolar distinto de cero, ya que el cambio del momento dipolar, hace que se produzca dos tipos de vibración los cuales son de estiramiento y flexión de enlace. Además, otras características que influyen son la masa de los átomos y la rigidez del enlace. Los átomos más pesados vibran más lentamente que los más ligeros, y los enlaces más fuertes generalmente más rígidos, requieren de más fuerza para alargarlos y comprimirlos (Wade, 2004). Como consecuencia, los enlaces más fuertes generalmente vibran más deprisa que los enlaces más débiles.

Por lo tanto, en la figura 6 se puede observar en el lado izquierdo del espectro, las tensiones C-H, O-H, y N-H, que son enlaces fuertes, ya que existe una gran diferencia de momento dipolar. Luego se encuentran los enlaces triples, que absorben alrededor de 2200 cm^{-1} , seguidos por los enlaces dobles hacia la derecha con una frecuencia de 1700 cm^{-1} . Asimismo, por debajo de 1400 cm^{-1} como se mencionó anteriormente, se encuentra la región de huella dactilar.

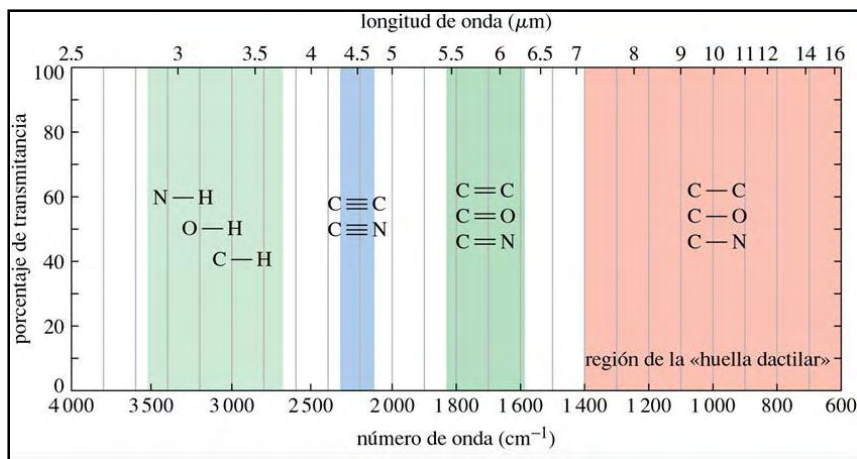


Figura 6. Región del Infrarrojo Medio

Fuente: Tomada y modificada (Wade, 2004)

2.7.2. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Una de las herramientas más poderosas para la determinación de una estructura orgánica, es la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN). Esta técnica se basa en el estudio de los núcleos de un átomo de ciertos isótopos que presenten un espín distinto de cero. Los isótopos más utilizados para esta técnica, son el núcleo de hidrógeno (^1H) y el núcleo de carbono (^{13}C). En consecuencia, esta espectroscopia se basa en la absorción de la radiación electromagnética, que se encuentra en la región de las radios frecuencias (figura 5).

Sabemos que las partículas que conforman el núcleo atómico son los neutrones y protones, que poseen una propiedad que se describe como momento angular de espín. Este momento angular de espín nuclear, resulta de la rotación del núcleo alrededor de su eje. Como se mencionó anteriormente, esta técnica solo puede estudiar núcleos atómicos, con un número atómico o número de masa impar. Por lo tanto, para poder obtener un espín nuclear preferiblemente igual a $1/2$, o distinto de cero, se da en los átomos de ^1H , ^{13}C , ^{19}F y ^{31}P . Estos tipos de núcleos son magnéticamente activos, ya que poseen espín igual que los electrones y poseen un movimiento de rotación sobre un eje, esta característica hace que se comporten como si fueran pequeños imanes (Weininger y Stermitz, 1988).

En consecuencia, cuando los espines se encuentran sin un campo magnético se encuentran rotando en su propio eje (al azar), como se puede observar en la figura 7, pero al colocarlos en frente de un campo magnético externo, los núcleos con espín positivo se orientan en la misma dirección del campo, en un estado de mínima energía denominado, “estado de espín α ”. Mientras que los núcleos con espín negativo se orientan en dirección opuesta a la del campo magnético, en un estado de mayor energía denominado, “estado de espín β ” (Wade, 2004).

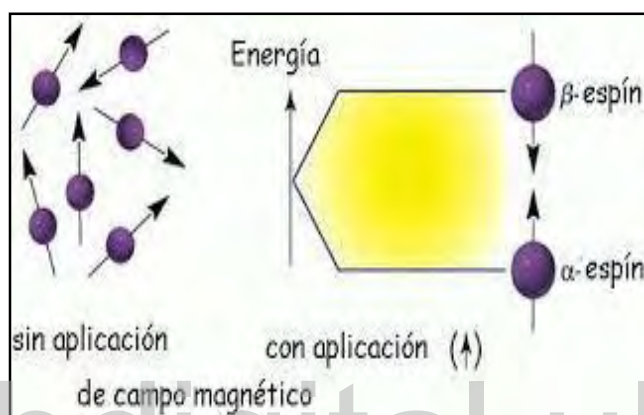


Figura 7. Estados de transición de los espines

Fuente: Tomada y modificada Instituto de Ciencias de Materiales de Madrid, Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear.

Por lo tanto, cuando una muestra es irradiada con fotones de radio frecuencias, por un pulsador intenso de radiación, los núcleos en el estado de espín α son promovidos al estado de espín β , y a su vez, los núcleos del estado β van a ser promovidos al estado de espín α . Cuando los núcleos vuelven a su estado inicial emiten señales cuya frecuencia depende de la diferencia de energía (ΔE) entre los estados de espín α y β . El término “resonancia” procede del hecho de que los núcleos están en resonancia con la radiofrecuencia o la radiación (Wade, 2004). Es decir, los núcleos pasan de un estado de espín a otro como respuesta a la radiación a la que son sometidos. El espectrómetro detecta estas señales y las registra como una gráfica de frecuencias frente a intensidad, que es el llamado espectro de RMN.

Finalmente, cuando se tiene el espectro de RMN se puede observar que la correlación entre los desplazamientos químicos de las señales tanto para ^1H y ^{13}C , es distinta. En protónica ^1H va tener un rango de (0-10) ppm (figura 8) y para el de carbono ^{13}C el rango es de (0-200) ppm (figura 9). Estos rangos dan información acerca de la naturaleza de hidrógenos (alifáticos, aromáticos, olefínicos, geminales o unidos a un heteroátomo) y para los carbonos (en dobles enlaces, aromáticos, carbonílicos, oxigenados, etc).

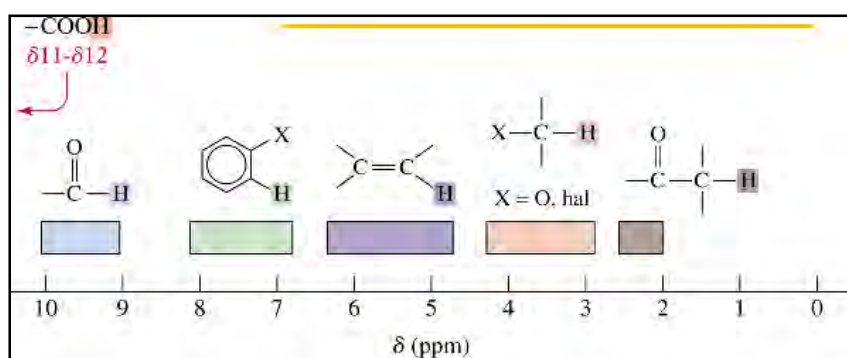


Figura 8. Desplazamientos químicos frecuente en el espectro de RMN de ^1H

Fuente: Tomada y modificada (Wade, 2004).

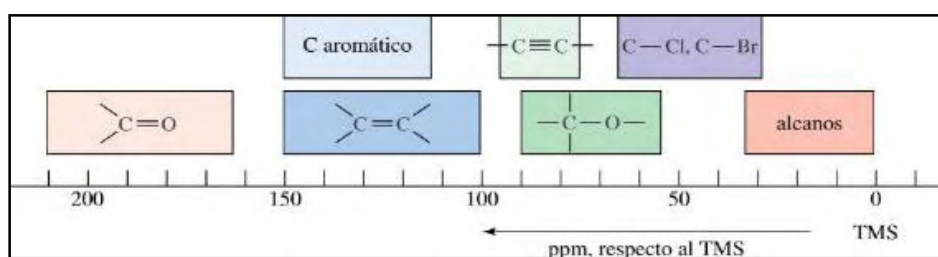


Figura 9. Desplazamientos químicos aproximados para el espectro de RMN de ^{13}C

Fuente: Tomada y modificada (Wade, 2004)

2.7.3. Espectrometría de Masas (EM)

La espectrometría de masas se puede enlazar con las anteriores, ya que complementa al estudio de un compuesto a caracterizar. Esta técnica estudia las masas de los átomos, moléculas o fragmentos de moléculas. El fundamento de esta espectrometría (Harris, 2003), nos indica que, para obtener un espectro de masas, las moléculas gaseosas o las especies se ionizan, los iones se aceleran en un campo eléctrico y seguidamente se separan según su relación (m/z). Existen diferentes tipos de ionización para esta técnica, y para este segmento se hablará brevemente sobre la ionización por impacto de electrones.

2.7.3.1 Ionización por impacto de electrones

Este tipo de ionización consiste en bombardear la muestra con un flujo de electrones acelerados de alta energía, y cuando incide un electrón sobre una molécula neutra, la molécula se ioniza desprendiendo un electrón adicional. Cuando una molécula pierde un electrón, adquiere una carga positiva y un electrón sin aparear, por lo tanto, el ión es un catión radical (Wade, 2004). Una vez de pasar a la ionización y la fragmentación, donde se han producido una mezcla de iones, estos iones se separan y se detectan. En la figura 10, se muestra un ejemplo de la ionización del metano.

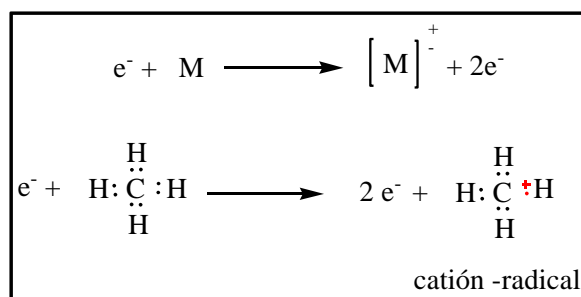


Figura 10. Ionización por impacto de electrones

Fuente: Tomada y modificada (Wade, 2004)

Ahora bien, para un espectro de masas de un compuesto se presenta de manera de una gráfica de barras, con las masas (valores de m/z) en el eje x, y la intensidad (cantidad de iones de cierta relación m/z que llega al detector) en el eje y, como se puede observar en el ejemplo de la figura 11. El pico más alto del espectro de masas, se le llama pico de base y se le suele asignar en forma arbitraria; sin embargo, el pico de base no corresponde necesariamente a la masa del ión molecular, simplemente es el pico más intenso (McMurry, 2012).

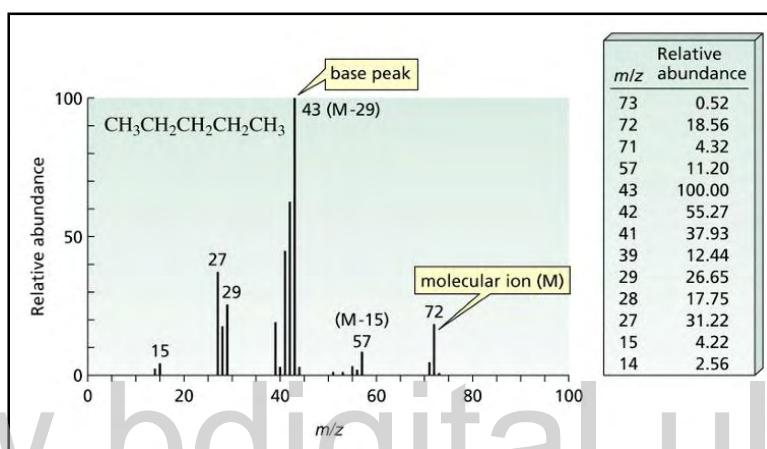


Figura 11. Espectro de masas

Fuente: Tomada y modificada chrome-

extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.ehu.eus/documents/1468013/5943652/EM

JUSTIFICACIÓN

Cuando se requiere modificar estructuralmente un compuesto conocido, con la finalidad de mejorar su actividad terapéutica o proteger algunos de sus grupos funcionales, se recurre a la hemisíntesis o semisíntesis. Mediante esta técnica se ha modificado la estructura del ácido *ent*-kaurénico, utilizando una amplia gama de reacciones químicas, tales como reacciones de oxidación, de reducción, de sustitución, de adición o de esterificación. Además, de conocer la gran variedad de efectos terapéuticos del ácido *ent*-kaurénico, que podrían aumentarse, se justifica la continuación de su estudio desde el punto de vista de su transformación química, ya que permitiría obtener nuevos derivados de ésteres de dicho ácido mediante la utilización de algunos dioles. La obtención de estos nuevos derivados, además, nos abriría la posibilidad de crear las bases para la producción de nuevas moléculas con actividad biológica mejorada.

www.bdigital.ula.ve

HIPÓTESIS

Estudios previos han reportado que el ácido *ent*-kaurénico ha sido modificado estructuralmente para obtener nuevos derivados, ya sea por medio de una reducción, oxidación, adición o esterificación. Es de esperar que mediante las reacciones de esterificación con el ácido *ent*-kaurénico y los dioles, se obtengan nuevos derivados.

De acuerdo a la hipótesis, se plantean los siguientes objetivos:

OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Realizar hemisíntesis del ácido *ent*-kaurénico con dioles vía reacciones de esterificación.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar hemisíntesis del ácido *ent*-kaurénico con etilenglicol y 1,3-propilenglicol.
- Purificar los derivados del ácido *ent*-kaurénico, mediante las técnicas de cromatografía de columna y cromatografía de capa fina.
- Caracterizar los compuestos obtenidos, utilizando las técnicas de elucidación como lo son la espectroscopia Infrarroja (IR), Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y la Espectrometría de Masas (EM).

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

El desarrollo de esta investigación, se llevó a cabo en el Laboratorio “A” de Síntesis del Instituto de Investigaciones “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro” en la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes (ULA). El estudio de la espectroscopia Infrarrojo (IR), se realizó en dicho Instituto, y el estudio de la espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (^1H , ^{13}C y bidimensional) (RMN) y espectrometría de Masas (EM), se realizaron en el departamento de Química de la Universidad Federal de São Carlos- Brasil.

5.1 ESPECIFICACIONES DE LAS TÉCNICAS Y EQUIPOS UTILIZADOS.

5.1.1 Cromatografía en columna: se utilizó gel de sílice 60 (0,04-0-06 mm). Las columnas se desarrollaron siguiendo las técnicas convencionales descritas en la literatura (Galagovsky, 2016; Marcano y Hasegawa, 2002).

5.1.2 Cromatografía en capa fina: se utilizaron placas de gel sílice 60 sobre soporte de aluminio de la casa Merck, WF 254^s (0,25 mm de espesor). Las placas se desarrollaron con los sistemas eluyentes adecuados y se rebelaron rociándolas con reactivo de ácido fosfomolibdico, luego se calentaron en una plancha de calentamiento por algunos minutos hasta poder visualizar las manchas de color característico (azul oscuro).

5.1.3 Cromatografía preparativa: para esta cromatografía se utilizó sílice 60, sobre una placa de vidrio (2-25 μg), con un espesor de 0,5 mm.

5.1.4 Espectroscopia de Infrarrojo: los compuestos fueron analizados por IR empleando un espectrofotómetro de infrarrojo marca Perkin Elmer, modelo SpectrumTwo en pastillas de KBr.

5.1.5 Espectroscopia de RMN ^1H , ^{13}C y bidimensional: se tomaron en un equipo Bruker Avance de 9,4 Tesla (400 MHz para frecuencia de hidrógeno) y (100 MHz para frecuencia de carbono) NanoBay, equipado con cambiador automático de muestra, sonda de 5 mm BBO. Se utilizó como disolvente deuterado CDCl_3 y TMS como referencia interna. Para el experimento de RMN- ^1H , en la tabla 3 se podrán ver más adelante las siguientes abreviaturas en los espectros de los compuestos.

Tabla 3. Abreviaturas de las señales para RMN- ^1H

RMN- ^1H	Abreviatura
Singlete	<i>s</i>
Doblete	<i>d</i>
Triplete	<i>t</i>
Cuarteto	<i>c</i>
Quintuplete	<i>q</i>
Septuplete	<i>sep</i>
Multiplete	<i>m</i>

5.1.6 Espectrometría de masas: se utilizó el espectrómetro de masas del cromatógrafo de gases Shimadzu GCMS-QP5000, acoplado con un cromatógrafo de Shimadzu GC-17A (columna de 30 m).

5.2 REACTIVOS

Los reactivos y solventes empleados para esta investigación fueron suministrados por el Laboratorio “A” de Síntesis del Instituto de Investigaciones “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro” en la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes (ULA). En la tabla 4, se encuentran todos los compuestos utilizados, que fueron de grado analítico y de ser necesario, purificados a través de métodos convencionales.

Tabla 4. Reactivos o solventes utilizados

Reactivo o solvente	Marca y pureza
Acetato de etilo	BDH ChemicalsLts
Acetona	Sigma-Aldrich
Diclorometano	Fisher Scientific
Diciclohexilcarbodiimida (DCC)	Merck, 99 % pureza
N,N-Dimetilaminopiridina (DMAP)	Merck, 99 % pureza
Hexano	Fisher Scientific
Etanol	Sigma-Aldrich
Etilenglicol	Merck, 99 % pureza
Metanol	Sigma-Aldrich
1,3-propilenglicol	Merck, 99 % pureza
Sulfato de Magnesio	Merck, 99 % pureza

5.3 RECOLECCIÓN, SECADO Y PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

La preparación del material vegetal, las hojas de la especie *Espeletia semiglobulata* fueron recolectadas en el Páramo de Piedras Blancas, en la Sierra de la Culata del estado Mérida-Venezuela. La especie fue identificada por el Profesor Pablo Meléndez del Herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis.

5.3.1 Obtención del ácido *ent*-kaurénico [1]

En la obtención del ácido *ent*-kaurénico [1], el primer paso es secar las hojas a temperatura ambiente durante varios días. Una vez secadas y molidas las hojas de la especie *Espeletia semiglobulata*, se obtiene un 3,5 kg del material vegetal y es sometido a una extracción continua sobre una columna abierta a temperatura ambiente, con una mezcla de 20 L de hexano/éter dietílico, en una relación (3:1). El extracto obtenido es concentrado a la cuarta parte de su volumen inicial; seguidamente el extracto es sometido a una extracción con una solución de NaOH al 0,5 N, para formar las respectivas sales de los ácidos kaurénicos.

Finalmente, para recuperar los ácidos se agrega HCl diluido hasta llegar a un pH 3.0 y se extrae nuevamente con hexano. El solvente restante es evaporado y el producto obtenido es llevado a purificación mediante cromatografía flash, sobre silica gel 60 (70-230 mesh), usando como eluyente hexano y mezclas de hexano/éter dietílico (9:1). Las fracciones que se obtienen de la columna (100 mL), son monitoreadas con cromatografía en capa fina (CCF). De las primeras fracciones se obtiene sustancias impuras y posteriormente las últimas fracciones son llevadas a cristalizar y se logra obtener 40,5 g del ácido *ent*-kaurénico [1].

5.4 DESARROLLO DE LAS HEMISÍNTESIS DEL ÁCIDO *ENT*-KAURÉNICO [1]

En esta etapa del procedimiento experimental, para la modificación estructural del ácido *ent*-kaurénico [1], se utilizó la reacción de Steglich con diferentes dioles. En consecuencia, para la obtención de nuevos derivados a base de ésteres, en la primera reacción se utilizó el diol etilenglicol y para la segunda reacción el 1,3-propilenglicol. Es necesario resaltar, que para ambas reacciones de esterificación, se utilizaron solventes y reactivos, tales como: diclorometano (CH_2Cl_2), diciclohexilcarbodiimida (DCC) y la N,N-dimetilaminopiridina (DMAP).

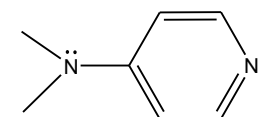
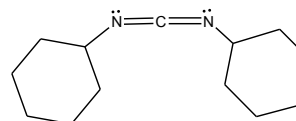
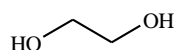
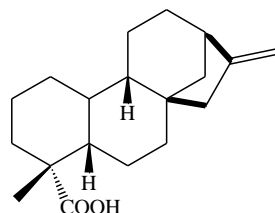
5.4.1 Procedimiento de la reacción del ácido *ent*- kaurénico [1] en presencia del etilenglicol

El primer paso para la reacción de esterificación de Steglich, se utilizó un equivalente de ácido *ent*-kaurénico [1] (200 mg), seguidamente se agregaron 3 equivalentes del compuesto diciclohexilcarbodiimida (DCC, 480 mg) y 3 equivalentes de la N,N-dimetilaminopiridina (DMAP, 240 mg). Estos sólidos fueron disueltos con una mínima cantidad de CH_2Cl_2 , bajo una atmósfera de argón, agitándose durante 30 min. Como segundo paso, se adicionó 3 equivalentes de etilenglicol (0,2 mL) y se dejó bajo agitación a temperatura ambiente durante 24 horas. Luego de haberse cumplido las 24 horas de la reacción, la mezcla se lava con H_2O (20 mL) y fue llevado a un proceso de extracción con CH_2Cl_2 (3 x 10 mL).

Por consiguiente, la fase orgánica obtenida por la extracción, se le adiciono una cantidad de sulfato de magnesio (MgSO_4), para que luego este desecante hidratado se filtrara por gravedad sobre un matraz. Finalmente, el producto es llevado a un rotavapor y de este modo, se obtuvo 0,865 g de la mezcla.

Tabla 5. Cantidades específicas, condiciones de la Hemisíntesis del ácido *ent*-kaurénico [1] con etilenglicol.

Compuesto



Condiciones Iniciales	ácido <i>ent</i> -kaurénico [1]	Etilenglicol	Diciclohexilcarbodimida	N,N-dimetilaminopiridina
Masa molecular (g/mol)	302	62,07	206,33	122,17
Cantidades (g)	0,2005	0,1230	0,4842	0,2462
Equivalentes	1	3	3	3
Densidad (g/mL)		1,113		
Cantidades (mL)		0,2		
moles (mol)	$6,639 \times 10^{-4}$	$1,98 \times 10^{-3}$		
Masa teórica (g)			0,228	

5.4.1.1 Separación de los productos de la primera reacción

El segundo paso viene dado por la separación de los productos obtenidos. Para este proceso de separación, se utilizó una columna de cromatografía sobre sílica gel 60 (70-230 mesh), y para la obtención de la cabeza de la columna, se combinaron los 0,865 g de la mezcla junto con 2,00 g de gel de sílice. Como resultado de la elución de la columna con el solvente adecuado, se recolectaron 30 fracciones con un volumen de 20 mL cada una, con una mezcla de hexano: AcOEt al 10 %. Es importante mencionar que las fracciones fueron monitoreadas por medio de cromatografía de capa fina (CCF). Ahora bien, de la reunión de las 30 fracciones, que va desde (4-13) se concentraron y se obtuvo un primer compuesto con un porcentaje de rendimiento aproximadamente de 13,86 %, con respecto a la mezcla.

Seguidamente, luego de obtener las primeras fracciones por medio de la cromatografía de columna, se aumentó la polaridad del eluyente con una mezcla de hexano: AcOEt al 20 %. Para el segundo lote, se obtuvo 30 fracciones de 20 mL cada una. La reunión de las primeras fracciones, que va desde la (4-6) se concentró y se obtuvo un segundo compuesto con un porcentaje de rendimiento de 7,32 %. Para las siguientes fracciones restantes, que van desde la (15-30) se concentraron y se obtuvo un tercer compuesto, con un porcentaje de rendimiento de 13,73 %. En la tabla 6, se puede observar los resultados de la separación de la hemisíntesis del ácido *ent*-kaurénico [1] con etilenglicol.

Tabla 6. Resultados de la Hemisíntesis del ácido *ent*-kaurénico [1] con etilenglicol.

Masa del producto obtenido de la reacción (g)	Fracción (4-13) Hexano: AcOEt al 10 %	Fracción (4-6) Hexano: AcOEt al 20 %	Fracción (15-30) Hexano: AcOEt al 20 %
0,86	0,0316 g	0,0167 g	0,0313 g
Masa experimental	31,6 mg	16,7 mg	31,3 mg
(%) Rendimiento	13,86	7,32	13,73

5.4.2 Reacción del ácido *ent*-kaurénico [1] con 1,3-propilenglicol

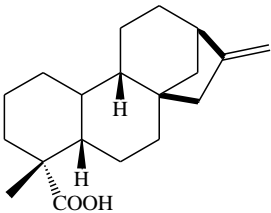
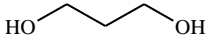
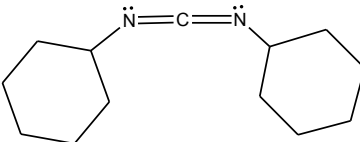
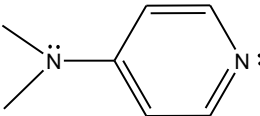
En el primer paso del procedimiento experimental, que corresponde a la segunda reacción de esterificación, del ácido *ent*-kaurénico [1] en presencia del 1,3-propilenglicol; se aplicó el mismo procedimiento de la primera reacción con etilenglicol, obteniendo 0,836 g de la mezcla.

5.4.2.1 Separación de los productos de la segunda reacción

La separación de la mezcla obtenida para esta segunda reacción, se utilizó el mismo procedimiento de la primera reacción como el etilenglicol. Se combinaron los 0,836 g de la mezcla con 2,00 g de sílice gel, para la cabeza de la columna cromatográfica, y como eluyente una mezcla de hexano: AcOEt al 10 %. Para la primera recolección, se obtuvo 50 fracciones de 20 mL, y de las primeras fracciones que corresponde de la (1-4), se realizó una cromatografía de capa fina preparativa, para poder separar los dos compuestos, que se observaron en la capa fina.

En el proceso de separación, de las fracciones 1-4 se tomaron 3 mL (174mg), para la preparación de la cromatografía preparativa. Como resultado de esta separación, se obtuvieron dos compuestos. El primer compuesto, tuvo un porcentaje de rendimiento aproximadamente de 7,72 %, y el segundo compuesto obtuvo un porcentaje de 19,20 %. Posteriormente, se tomaron otras fracciones que van desde la reunión de 27-37 y 38-50, al 10 % de hexano-AcOEt. Por medio de los resultados de la cromatografía de capa fina (CCF), al no observar ningún cambio para estas fracciones, se aumentó la polaridad del eluyente con hexano: AcOEt al 20 %. De esta polaridad del eluyente, se tomaron 40 fracciones de 20 mL cada una, pero al no observar ningún cambio en la cromatografía de capa fina, se aumentó la polaridad de la fase móvil, con una mezcla hexano y AcOEt al 30 %.

Tabla 7. Cantidades específicas y condiciones de la Hemisíntesis del ácido *ent*-kaurénico [1] con 1,3-propilenglicol.

Compuesto				
Condiciones Iniciales	ácido <i>ent</i> -kaurénico [1]	1,3-propilenglicol	Diciclohexilcarbodimida	N,N-dimetilaminopiridina
Masa molecular (g/mol)	302	76,09	206,33	122,17
Cantidades (g)	0,2002	0,1500	0,4844	0,2443
Equivalentes	1	3	3	3
Densidad (g/mL)		1,053		
Cantidades (mL)		0,2		
moles (mol)	$6,629 \times 10^{-4}$	$1,971 \times 10^{-3}$		
Masa teórica (g)			0,2364	

Finalmente, de esta concentración de eluyente hexano: AcOEt al 30 % se obtuvieron 30 fracciones de 20 mL cada una. De las fracciones que van desde la (101-106), se concentraron y se obtuvo un tercer compuesto, con un porcentaje de rendimiento de 11,97 %. En la tabla 8, se encuentran los resultados de la separación de la hemisíntesis del ácido *ent*-kaurénico [1] con 1,3- propilenglicol.

Tabla 8. Resultados de la Hemisíntesis del ácido *ent*-kaurénico [1] con 1,3- propilenglicol.

Masa del producto obtenido de la reacción (g)	Fracción (1-4) Compuesto 1 Hexano: AcOEt al 10 %	Fracción (1-4) Compuesto 2 Hexano: AcOEt al 10 %	Fracción (101-106) Compuesto 3 Hexano: AcOEt al 30 %
0,83	0,0176 g	0,0454 g	0,0283 g
Masa experimental	17,6 mg	45,4 mg	28,3 mg
(%) Rendimiento	7,72	19,20	11,97

En la siguiente sección, se podrá analizar los espectros tanto de espectroscopía de Infrarroja (IR), Resonancia Magnética Nuclear (RMN-¹H, RMN-¹³C) y Espectrometría de Masas (EM), para los 6 compuestos en total, que pertenecen a la reacción del ácido *ent*- kaurénico [1] con etilenglicol y 1,3-propilenglicol.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

En la presente discusión, se comenzará a estudiar los espectros de los compuestos obtenidos, por medio de la separación de cromatografía de columna. En la tabla 10, se podrá observar las fracciones de los compuestos obtenidos, y a su vez el código correspondiente para cada muestra.

Tabla 9. Códigos de las muestras de las hemisíntesis del ácido *ent*-kaurénico [1]

Fracciones	Eluyente	Código de Muestra
Reacción del ácido <i>ent</i>-kaurénico [1] con etilenglicol		
(4-13)	Hexano-AcOEt al 10 %	I
(4-6)	Hexano-AcOEt al 20 %	II
(15-30)	Hexano-AcOEt al 20 %	III
Reacción del ácido <i>ent</i>-kaurénico [1] con 1,3-propilenglicol		
Preparativa 1	Hexano-AcOEt al 10 %	IV
Preparativa 2	Hexano-AcOEt al 10%	V
Fracción (101-106)	Hexano-AcOEt al 30%	VI

A continuación, en la siguiente sección se analizarán los espectros del desarrollo sintético del ácido *ent*-kaurénico [1] con el etilenglicol, tanto para los compuestos I, II y III.

6. ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LA HEMISÍNTESIS DEL ÁCIDO *ENT*-KAURÉNICO [1] CON ETILENGLICOL.

6.1. Características físicas del compuesto [I]

El compuesto [I], fue un sólido blanco cristalino con un punto de fusión de 215-217 °C, y obtuvo un porcentaje de rendimiento de 13,86 %. A continuación, en la figura 13 se muestra el espectro de infrarrojo (IR) correspondiente al compuesto [I].

6.1.1. Espectroscopia Infrarroja (IR) del compuesto [I]

Por otro lado, al compuesto [I] se le realizó los estudios espectroscópicos de RMN-¹H y RMN-¹³C. A continuación, se podrá observar estos resultados en la figura 13 y 15.

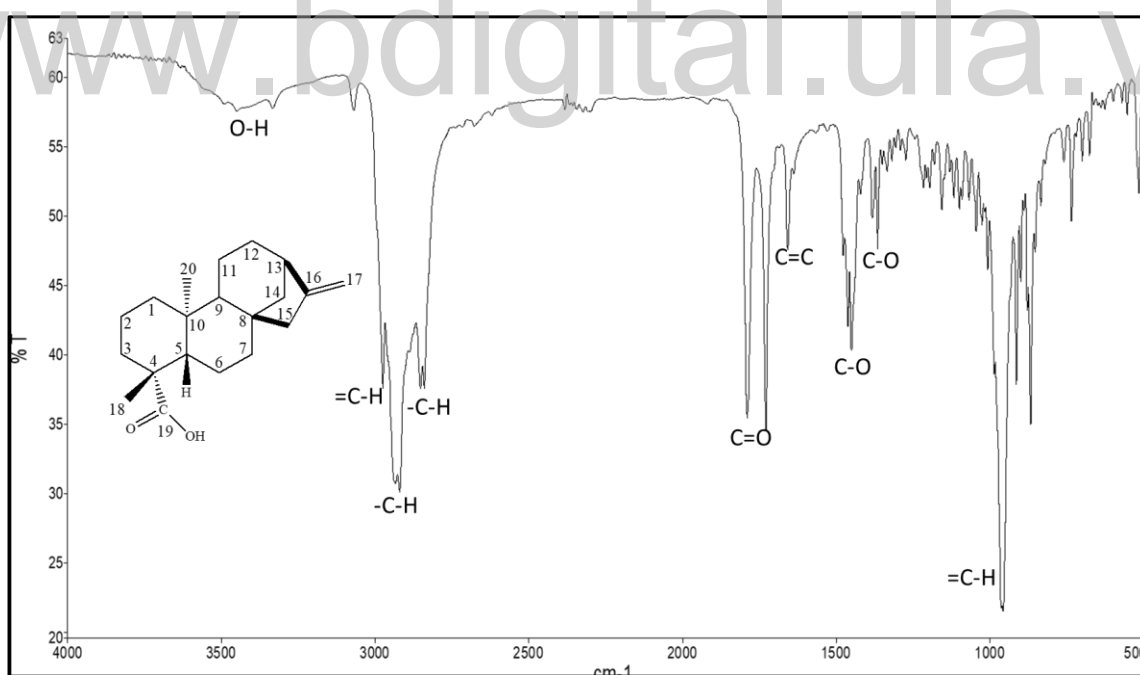


Figura 12. Espectro de infrarrojo del compuesto [I]

En el espectro de IR (figura 12) del compuesto [I], se muestran las bandas características del núcleo del ácido *ent*- kaurénico [1] (Peña, 2008; Carrillo, 2011), como lo son la vibración de tensión $\text{=C-H } \nu_{\text{máx}}: 2.974 \text{ cm}^{-1}$ que corresponde a un carbono con hibridación sp^2 C-17 del enlace exocíclico. Seguidamente, se tienen las vibraciones de tensión del metileno tanto asimétricas $\nu_{\text{máx}}: 2.920 \text{ cm}^{-1}$, como simétricas 2.840 cm^{-1} (C-H), y la vibración de tensión de un C-H con hibridación Sp^3 que se encuentra en los metilos de la posición C-18 y C-20. Además, se pueden observar la banda correspondiente a un grupo carbonilo de ácido $\nu_{\text{máx}}: 1.789 \text{ cm}^{-1}$ (C=O), junto con la banda ancha libre del (O-H) $\nu_{\text{máx}}: 3.413 \text{ cm}^{-1}$ y la vibración de tensión tanto asimétrica y simétrica del grupo C-O $\nu_{\text{máx}}: 1.462\text{--}1440 \text{ cm}^{-1}$. La presencia de estos tres últimos grupos, nos indica la presencia del ácido *ent*-kaurénico [1]. En la tabla 10, se describe cada vibración de tensión o flexión, con su grupo funcional que se encuentra en el espectro de (IR) del compuesto [I].

Tabla 10. Bandas de absorción en el espectro Infrarrojo (IR) del compuesto [I]

$\nu_{\text{máx}} (\text{cm}^{-1})$	3.413	2.974	2.920	2.852	2.840
Asignación	O-H	=C-H	-C-H	-C-H	-C-H
$\nu_{\text{máx}} (\text{cm}^{-1})$	1.789	1.675	1.462	1.440	957
Asignación	C=O	C=C	C-O	C-O	=C-H

6.1.2. Espectroscopia de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C del compuesto [I]

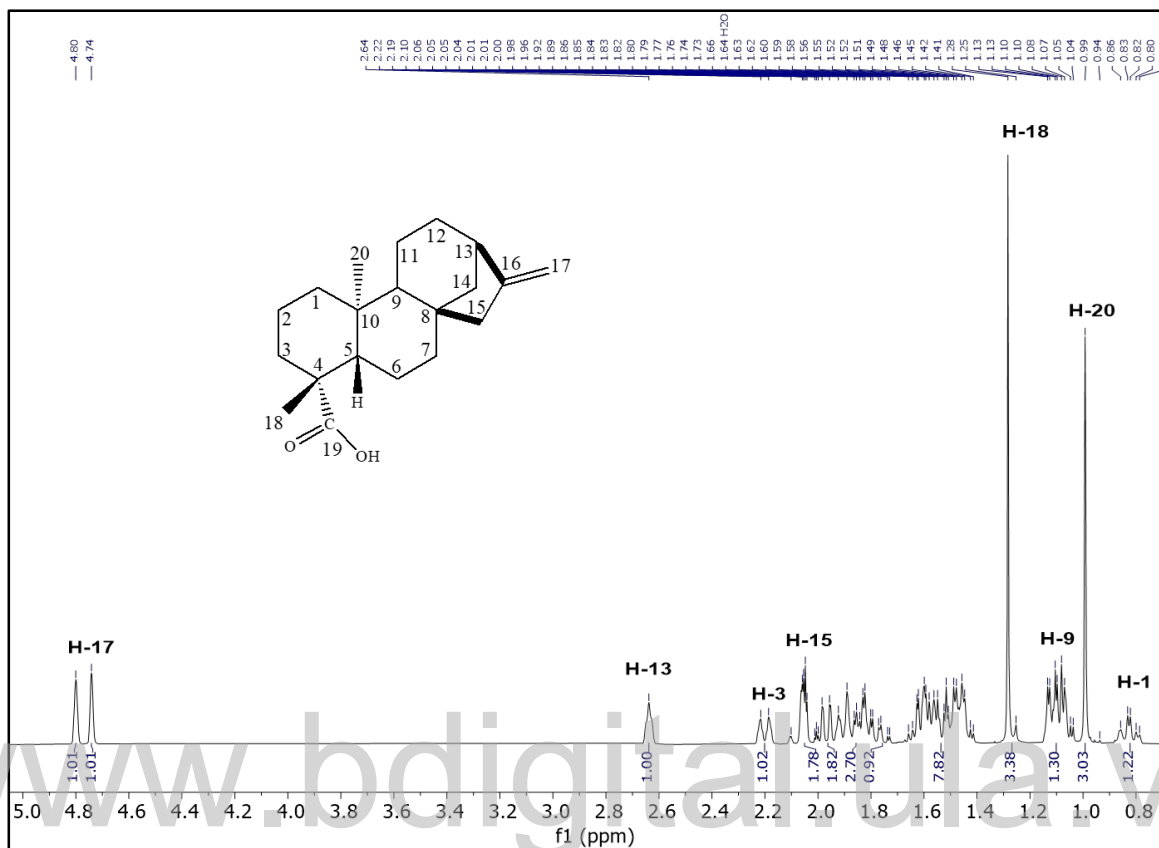


Figura 13. Espectro de RMN- ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto [I]

En el espectro de RMN- ^1H (figura 13) que corresponde al compuesto [I], la mayoría de las señales se ubican en la zona de campo alto, como se encuentran en el espectro de RMN ^1H del ácido *ent*-kaurénico [1] (Peña, 2008; Carrillo, 2011). Debido al acoplamiento de señales, en la figura 4 se pueden observar más detalladamente los protones correspondientes a estas señales. Por otra parte, en la zona de campo bajo, se encuentra un desplazamiento de $[\delta_{\text{H}}: 4,74\text{-}4,80]$ en forma de dos singlete, que provienen de los protones del enlace exocíclico H-17. La otra señal muy característica del núcleo del ácido *ent*-kaurénico [1] que se encuentra como un singlete a un desplazamiento de $[\delta_{\text{H}}: 2,64]$ es el protón del metino H-13. Este protón metino H-13 se diferencia de las demás (Cordero, 2012), ya que es un metino alílico y cabeza de puente de un biciclo.

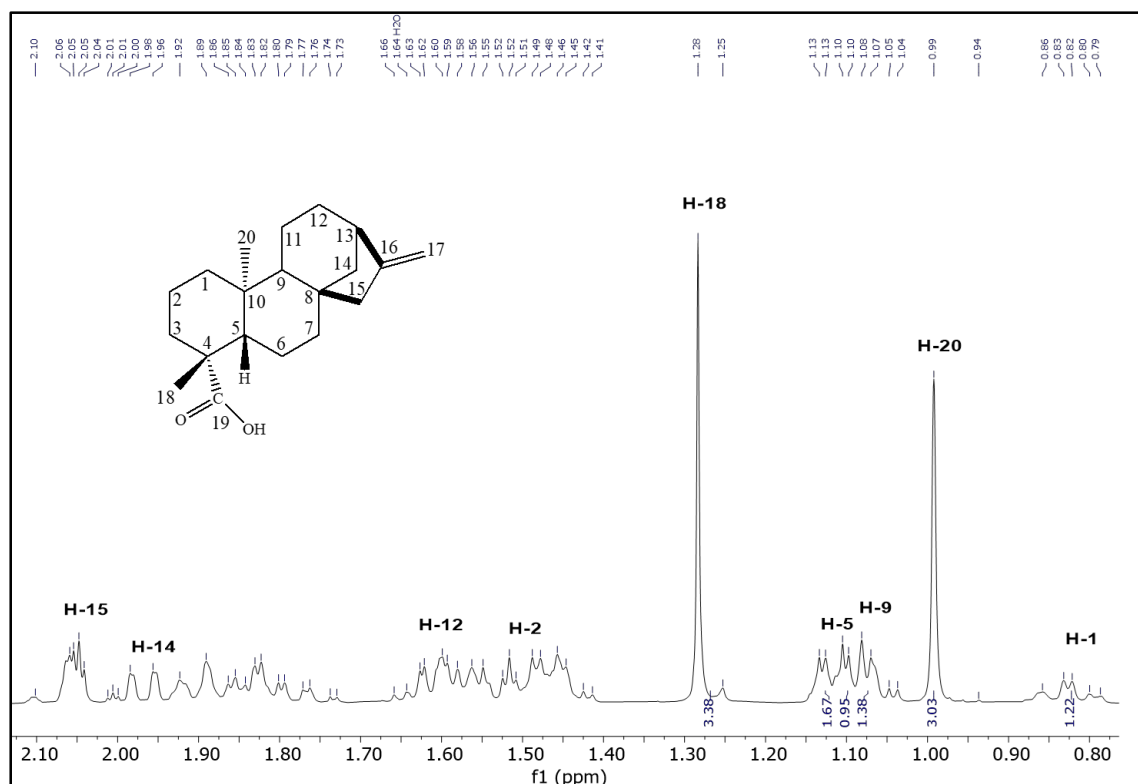


Figura 14. Ampliación del espectro de RMN- ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto [I]

En la figura 14, se observan los protones que se encuentran a campo alto, como lo son los metilos, metilenos y metinos. Los protones que más se distinguen en esta región, vendrían siendo el H-20 [δ_{H} : 0,99] que integra para tres protones, y a su vez el H-18 que se encuentra a un desplazamiento de [δ_{H} : 1,28], que también integra para tres protones. Estas dos señales están representadas como singuletes y corresponden a los dos metilos que se encuentran en el núcleo del ácido *ent*-kaurénico [1]. La otra señal que se puede identificar es el H-15, siendo este vecino de un carbono con hibridación sp^2 , hace que los protones del metileno H-15 estén más desapantallados. De igual forma, en la tabla 11 se pueden observar las demás señales que se identificaron en el compuesto [I].

Tabla 11. Desplazamientos químicos (δ) ppm en el espectro RMN- ^1H del compuesto [I]

H	H-1	H-2	H-3	H-5	H-9	H-12
δ (ppm)	0,83	1,52	2,20	1,10	1,08	1,60
m	<i>d</i>	<i>m</i>	<i>d</i>	<i>m</i>	<i>m</i>	<i>m</i>
J (Hz)	4,13		11,67			

H	H-13	H-14	H-15	H-17 α , β	H-18	H-20
δ (ppm)	2,64	1,96	2,05	4,74-4,8	1,28	0,99
m	<i>s</i>	<i>d</i>	<i>m</i>	<i>s</i>	<i>s</i>	<i>s</i>
J (Hz)		11,23				

La otra técnica de elucidación de RMN que se estudió para el compuesto [I] es el espectro RMN- ^{13}C . En la figura 15, se puede observar los desplazamientos de los carbonos que se encuentran en este compuesto.

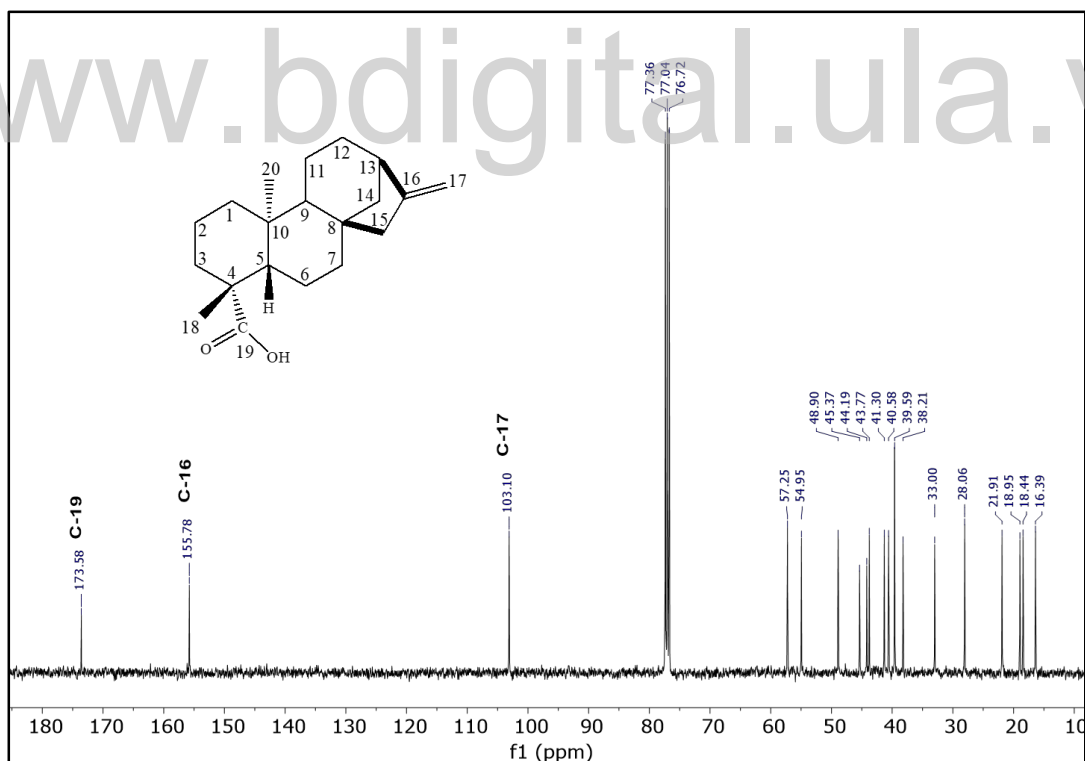


Figura 15. Espectro de RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) del compuesto [I]

En el espectro de ^{13}C (figura 15) del compuesto [I], se confirma la presencia de 20 carbonos que coincide al núcleo del ácido *ent*-kaurénico [1]. Una de las señales más importantes, para la identificación son las que se encuentran a campo bajo. En esta zona, se ubica el C-19 que representa al carboxilo de un ácido con un desplazamiento de [δ_{C} : 173,58 O=C-O-], y los dos carbonos del metileno, que corresponden a una hibridación Sp^2 se encuentran a un desplazamiento de C-16 [δ_{C} : 155,78 =C<] y C-17 [δ_{C} : 103,10 =CH₂].

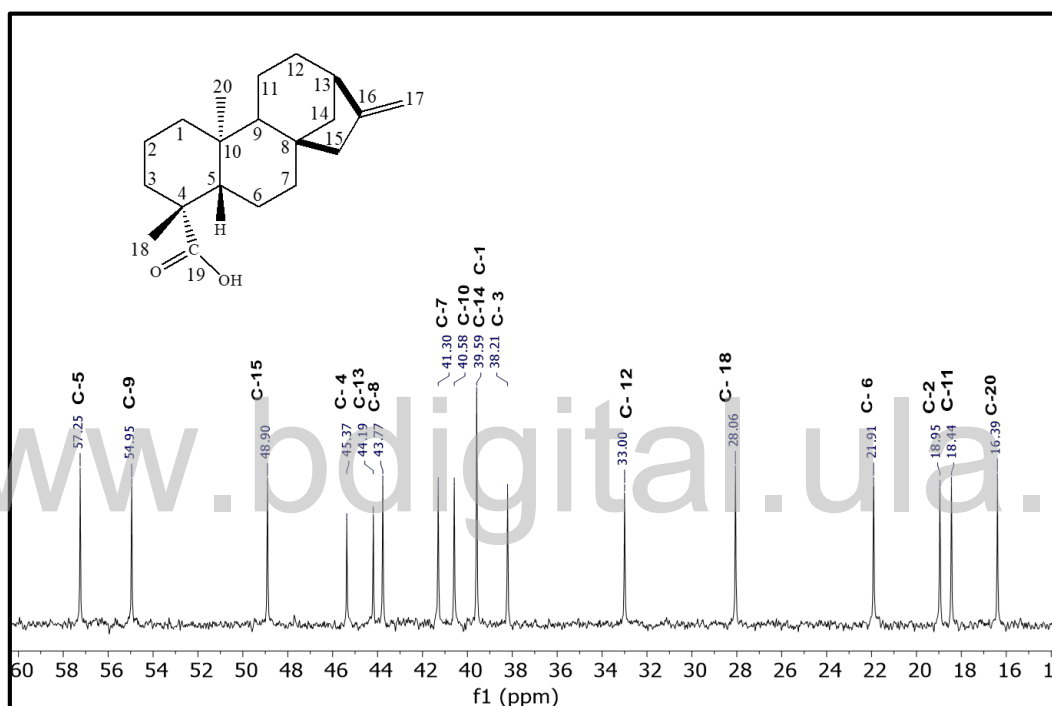


Figura 16. Ampliación del espectro de RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) del compuesto [I]

En esta zona del espectro (figura 16), se encuentran los diferentes tipos de carbonos, como lo son los tres grupos metinos C-5 [δ_{C} : 55,25 CH], C-9 [δ_{C} : 54,95 CH] y el C-13 [δ_{C} : 44,19 CH]. Seguidamente se tienen los tres carbonos cuaternarios, que se encuentran a un desplazamiento de C-4 [δ_{C} : 45,37 >C<], C-8 [δ_{C} : 43,77 >C<] y el C-10 [δ_{C} : 40,58 >C<]. Posteriormente, las otras señales corresponden a los nueve metilenos que se encuentran en el núcleo C-15 [δ_{C} : 48,90 CH₂], C-7 [δ_{C} : 41,30 CH₂], C-1 [δ_{C} : 40,58 CH₂], C-14 [δ_{C} : 39,59 CH₂], el C-3 [δ_{C} : 38,21 CH₂], C-12 [δ_{C} : 33,00 CH₂], C-6 [δ_{C} : 21,91 CH₂], C-2 [δ_{C} : 19,95 CH₂] y C-11 [δ_{C} : 18,44 CH₂]. Finalmente, se tiene las señales de los carbonos metilos que corresponde al C-18 [δ_{C} : 28,06 CH₃] y el C-20 [δ_{C} : 16,39 CH₃].

En la tabla 12, se encuentran las señales correspondientes al ^{13}C del compuesto [I], que se reflejaron en las figuras 15 y 16.

Tabla 12. Desplazamientos químicos (δ) ppm en el espectro RMN- ^{13}C del compuesto [I]

C	1	2	3	4	5	6	7
δ (ppm)	39,59	18,95	38,21	45,37	57,25	21,91	41,30
Tipo	CH_2	CH_2	CH_2	<C>	CH	CH_2	CH_2
C	8	9	10	11	12	13	14
δ (ppm)	43,77	54,95	40,58	18,44	33,00	44,19	39,59
Tipo	<C>	CH	<C>	CH_2	CH_2	CH	CH_2
C	15	16	17	18	19	20	
δ (ppm)	48,90	155,78	103,10	28,06	173,58	16,39	
Tipo	CH_2	$=\text{C}<$	$=\text{CH}_2$	CH_3	$\text{O}=\text{C}-\text{O}-$	CH_3	

La otra técnica que aporta gran información sobre un compuesto desconocido, es la espectrometría de masas. En el espectro de masas, se representa los diferentes tipos de iones, que se encuentran en el compuesto [I], con relación a la masa/carga de cada uno de ellos. Para esta investigación se utilizó un equipo de cromatografía de gases acoplado a masas. En el cromatograma de gases (figura 17), se refleja que este compuesto no se encontraba puro, ya que se observan varios picos. Al observar varios picos en un cromatograma, nos indica ciertas impurezas en el compuesto. Esto se debe a que el compuesto [I], fue la primera fracción tomada durante la separación por cromatografía de columna. Sin embargo, el pico más abundante del cromatograma tuvo un tiempo de retención de 27,125 min.

6.1.3. Espectro de masas del compuesto [I]

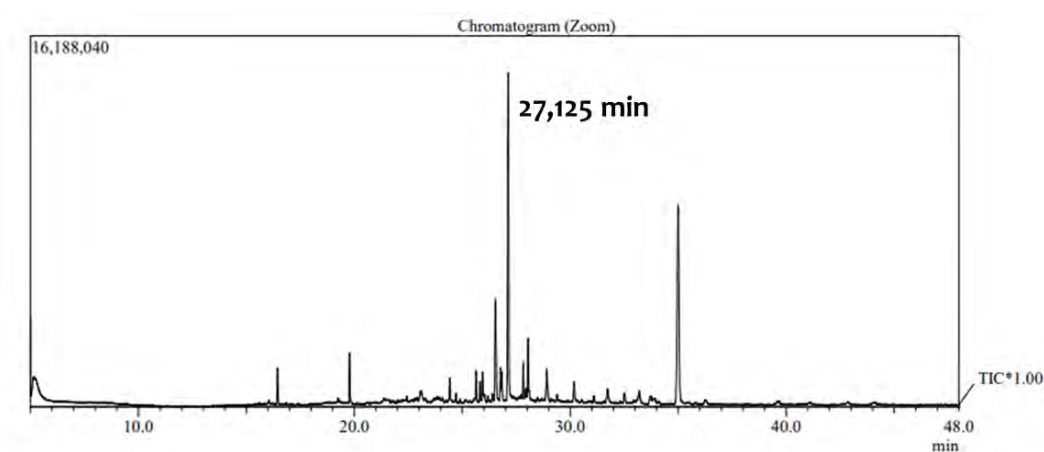


Figura 17. Cromatograma de gases del compuesto [I]

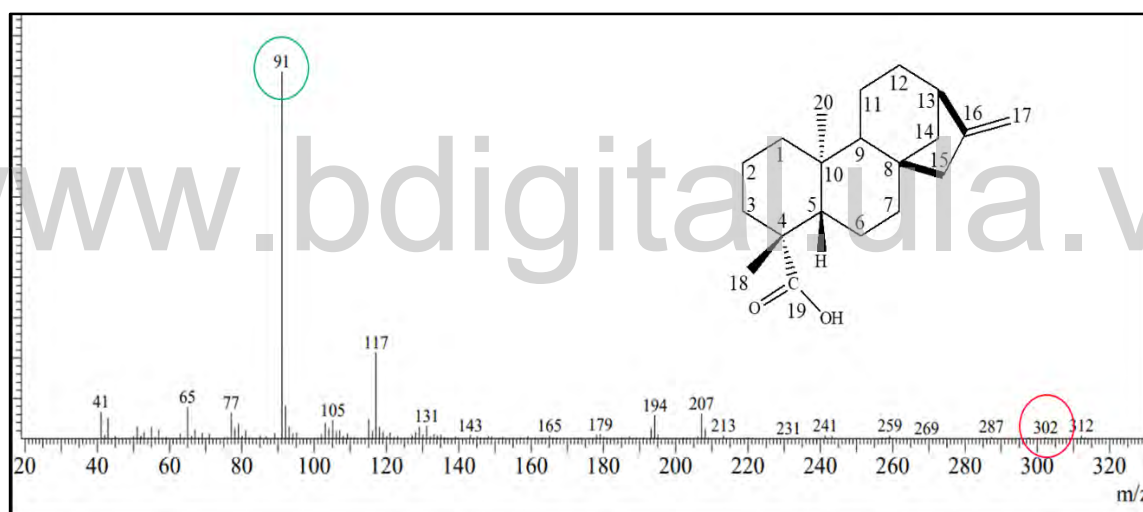


Figura 18. Espectro de masas del compuesto [I]

En el espectro de masas (figura 18) podemos observar las señales de los fragmentos, que se formaron en el compuesto [I], en especial el ion pico de base que tiene una señal de 91 m/z, que es la señal con mayor proporción en el espectro, y sobre todo el ion molecular que tiene una señal de (302 m/z), siendo similar a la masa molecular del ácido *ent*-kaurénico [1]. Dicho esto, por medio de los resultados que se obtuvo tanto de espectroscopia de infrarroja (IR), de RMN y de espectrometría de masas (MS), podemos concluir que el compuesto [I] es el ácido *ent*-kaurénico, el compuesto de partida que no sufrió reacción.

6.2 Características físicas del compuesto [II]

En la separación de la primera reacción, la fracción que corresponde a (4-6) con un eluyente de hexano-acetato de etilo al 20 %, se obtuvo un sólido viscoso de color blanco pálido, con un porcentaje de rendimiento 7,32 %. Debido a su característica viscosa, no se pudo determinar el punto de fusión. A continuación, para el compuesto [II] se podrá analizar los espectros de las técnicas de elucidación.

6.2.1. Espectroscopia Infrarroja (IR) del compuesto [II]

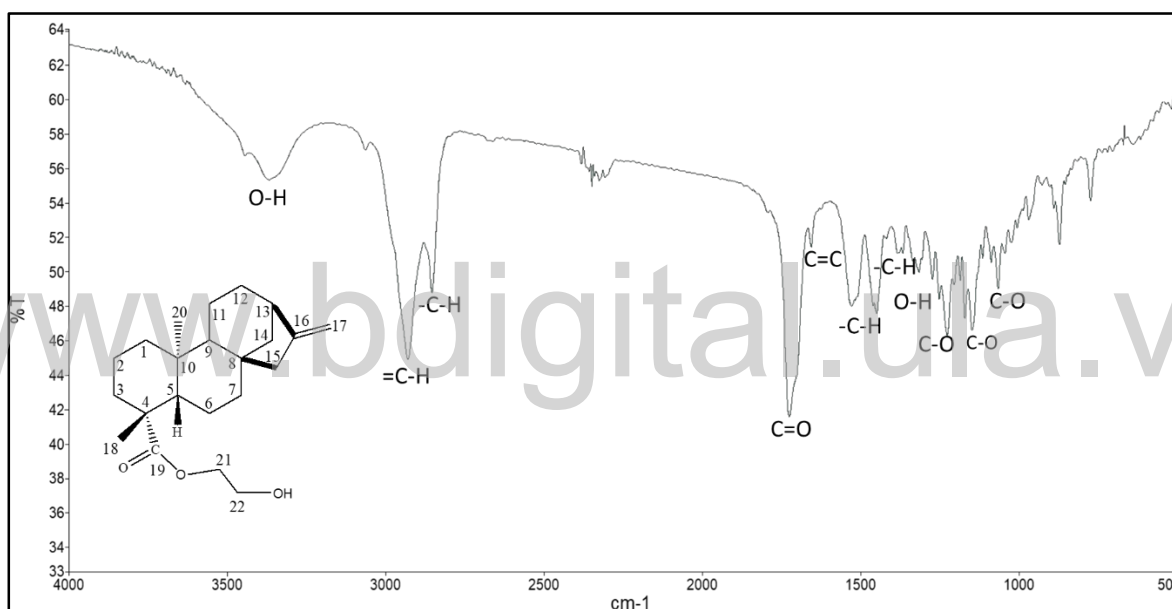


Figura 19. Espectro de Infrarrojo del compuesto [II]

En el espectro de IR del compuesto [II], (figura 19) se pueden observar un cambio de señales, con respecto al compuesto [I]. La banda del hidroxilo de la tensión de vibración del O-H $\nu_{\text{máx}}$: 3.362 cm^{-1} es más aguda, lo que nos indica la presencia de un alcohol en la estructura; por lo tanto, al igual que el compuesto [I], se encuentran las bandas de los grupos metilenos $\nu_{\text{máx}}$: 2.854 cm^{-1} (C-H), y la vibración de tensión $\nu_{\text{máx}}$: 2.975 cm^{-1} que corresponde al C-17 del doble enlace exocíclico (=C-H).

Otras señales que son considerables, con respecto a la hemisíntesis del ácido *ent*-kaurénico [1], junto con el etilenglicol, es la frecuencia del C=O $\nu_{\text{máx}}$: 1.725 cm^{-1} que proviene de la tensión de ésteres alifáticos, junto con la frecuencia $\nu_{\text{máx}}$: $1.274 - 1.066 \text{ cm}^{-1}$ de los grupos C-O. Además, en el espectro de IR, se encuentra una nueva frecuencia que corresponde a una tensión de alcoholes primarios que viene dada a $\nu_{\text{máx}}$: 1.227 cm^{-1} . En la tabla 13, se pueden observar las señales de vibración de tensión o de flexión correspondiente de cada grupo que se encuentra en el compuesto.

Tabla 13. Bandas de absorción en el espectro Infrarrojo (IR) del compuesto [II]

$\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1})	3.362	2.975	2.854	1.725	1.656	1.528
Asignación	O-H	=C-H	-C-H	C=O	C=C	C-H
$\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1})	1.450	1.384	1.316	1.274	1.227	1.066
Asignación	C-H	C-H	O-H	C-O	C-O	C-O

La otra técnica de elucidación que se utilizó para el compuesto [II] viene dada por la espectroscopía de RMN- ^1H . A continuación, se podrá analizar el espectro que corresponde a la figura 20.

6.2.2. Espectroscopia de RMN- ^1H del compuesto [II]

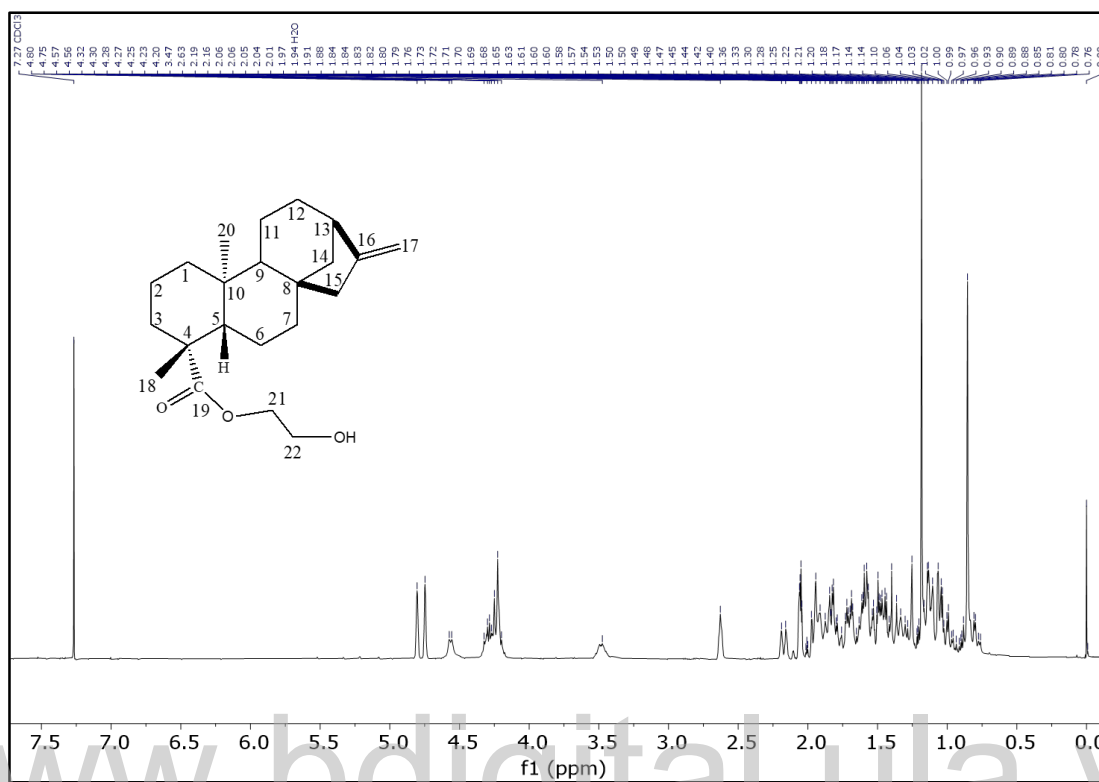


Figura 20. Espectro de RMN- ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto [II].

En el espectro de RMN- ^1H del compuesto [II], (figura 20) se observa un acoplamiento de las señales que corresponden al núcleo del ácido *ent*-kaurénico [1]; en consecuencia, es necesario ampliar las señales en la zona de 0,5-2,5 ppm (figura 21), para poder detallar los protones correspondientes a esa región. Por otra parte, a diferencia del compuesto [I], se observan nuevas señales en la zona del espectro de (3,5-4,5) ppm, que corresponden a los protones del producto de la hemisíntesis del ácido *ent*-kaurénico [1] con el etilenglicol; Por consiguiente, para esta zona se realizó una ampliación y se puede observar en la figura 22.

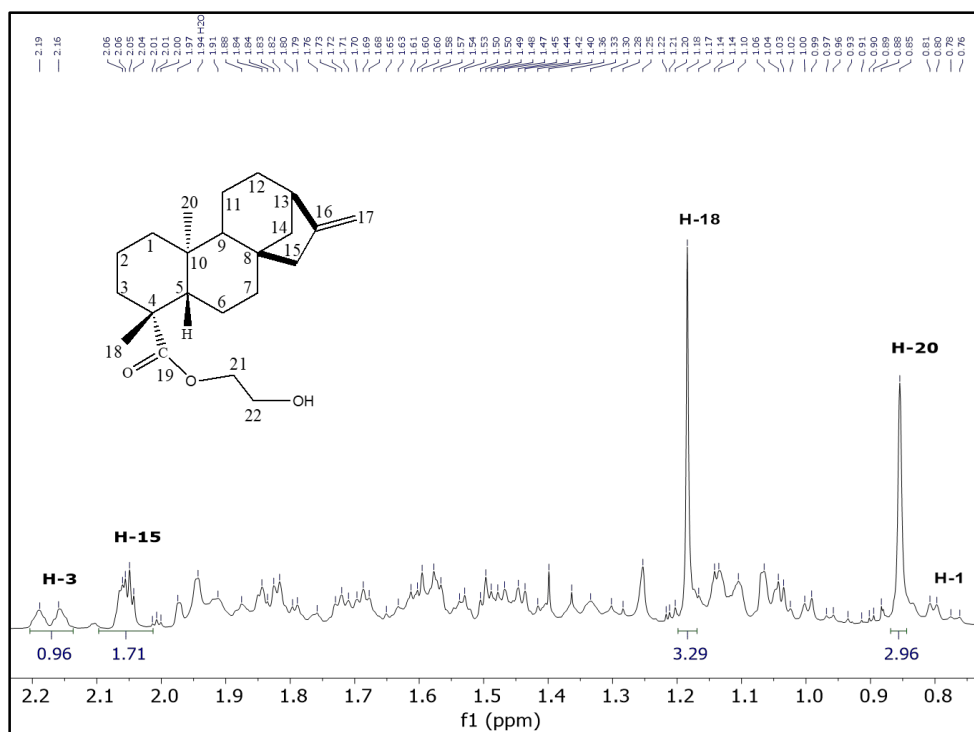


Figura 21. Ampliación A del espectro de RMN- ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto [II]

En el espectro de RMN- ^1H (figura 21), se observan los dos singuletes que corresponden a protones metilos del núcleo del ácido *ent*-kaurénico [1], que vendrían siendo H-20 [δ_{H} : 0,85] y H-18 [δ_{H} : 1,18]. Ahora, otras señales importantes que también se observan en el compuesto [II] son los protones H-3 [δ_{H} : 2,16] que se encuentra como un doblete, y H-15 [δ_{H} : 2,06] como un multiplete. Estos protones metilenos corresponden a esta señal, ya que son vecinos a grupos que hacen un desapantallamiento, como lo es para el H-3 que se encuentra cerca de un carbonilo de éster y el H-15 de un enlace insaturado.

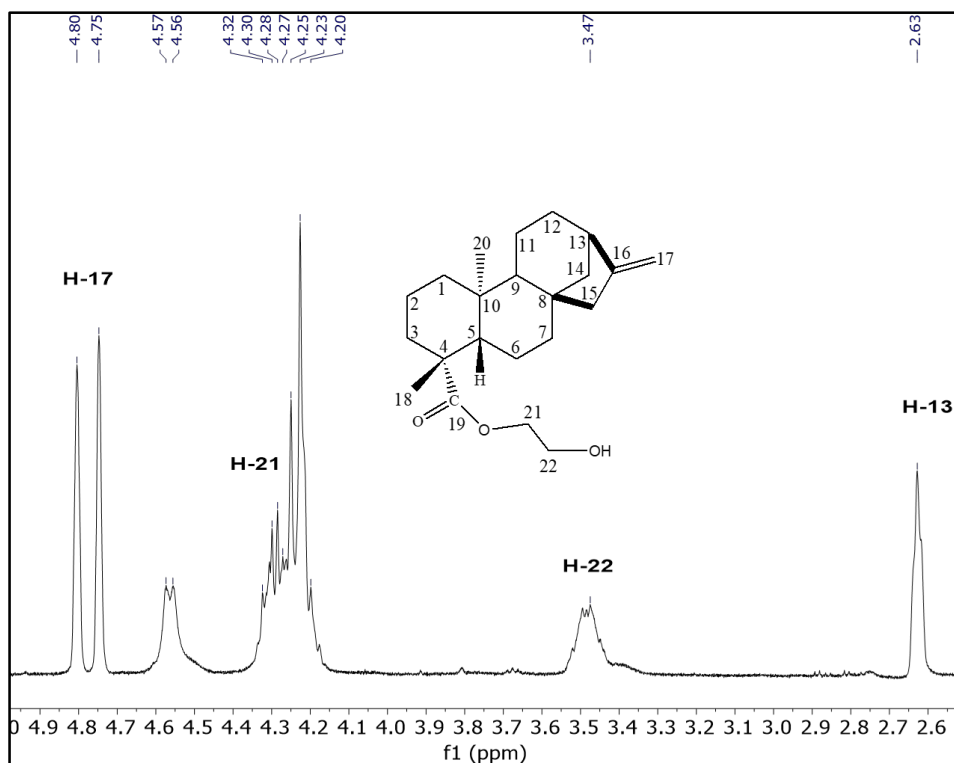


Figura 22. Ampliación B del espectro de RMN- ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto [II]

En la ampliación que corresponde a la figura 22, se observa el H-13 que corresponde a un singulete, y los protones H-17 del enlace exocíclico [δ_{H} : 4,75-4,80], como dos singuletes. Ahora bien, los nuevos protones que corresponde a la hemisíntesis del ácido *ent*-kaurénico [1] es el H-21 que se encuentran como un multiplete [δ_{H} : 4,23] y el H-22 que corresponde a un metileno, se puede observar como un triplete [δ_{H} : 3,47]. Este metileno se encuentra a este desplazamiento, debido al entorno del grupo hidroxilo, que produce un desapantallamiento a dichos protones. A continuación, en la tabla 14 se pueden observar las señales, desplazamientos y constantes de acoplamiento de los espectros correspondientes de las figuras 21 y 22.

Tabla 14. Desplazamientos químicos (δ) ppm en el espectro RMN- ^1H del compuesto [II]

H	H-1	H-3	H-13	H-15	H-17 α, β
δ (ppm)	0,81	2,16	2,63	2,06	4,75;4,80
m	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>s</i>	<i>m</i>	<i>s</i>
J (Hz)	4,26	12,63			
H	H-18	H-20	H-21	H-22	
δ (ppm)	1,18	0,85	4,23	3,47	
m	<i>s</i>	<i>s</i>	<i>m</i>	<i>t</i>	

De las evidencias anteriores, analizando los espectros de infrarrojo IR y de RMN- ^1H , se puede concluir que el compuesto [II], se empiezan a formar las señales, que se quieren obtener para el producto esperado de la hemisíntesis. Por lo tanto, aumentando la polaridad del eluyente en la columna cromatográfica, se puede obtener más puro el producto deseado de la primera reacción.

www.bdigital.ula.ve

6.3. Características del compuesto [III]

El compuesto [III] corresponde a la última fracción tomada (15-30), con un eluyente de hexano-acetato de etilo al 20 %. Para este compuesto se obtuvo un sólido claro, con un porcentaje de rendimiento aproximadamente de 13,73 %. Al igual que el compuesto [II], no se pudo determinar el punto de fusión, ya que presentaba cierta viscosidad. En la figura 23, se muestra el espectro de (IR) que corresponde para este compuesto.

6.3.1. Espectroscopia Infrarroja (IR) del compuesto [III]

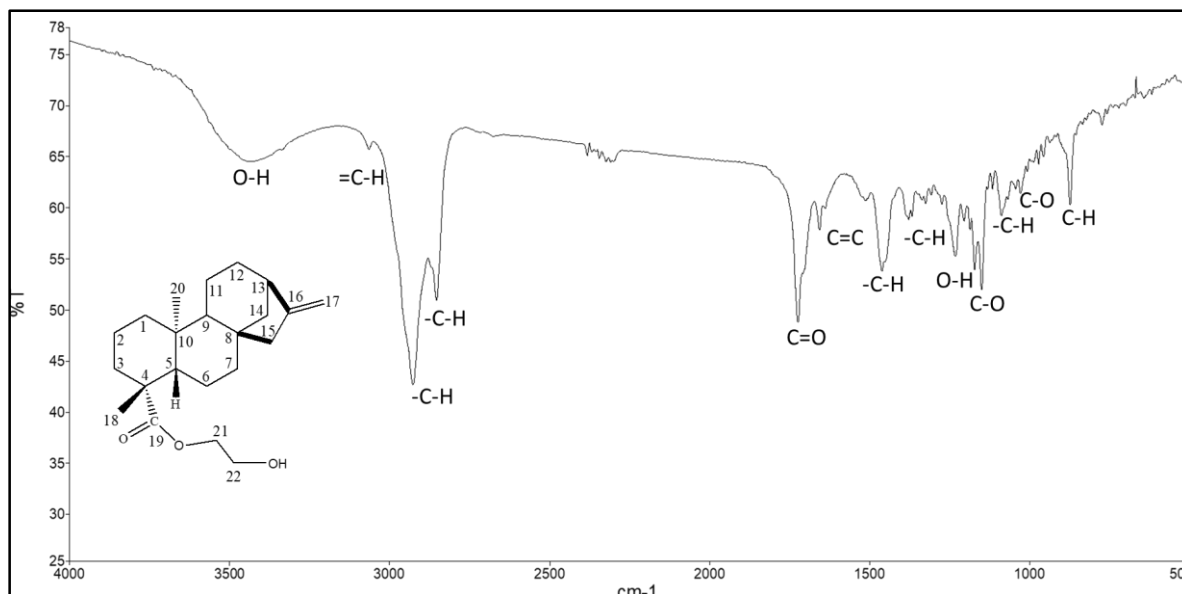


Figura 23. Espectro de Infrarrojo del compuesto [III]

En el espectro de IR del compuesto [III] (figura 23), se presentan las bandas características del núcleo del ácido *ent*-kaurénico [1]. Uno de los cambios que se puede observar en el espectro del compuesto [III], con respecto al compuesto [I], que es el ácido *ent*-kaurénico [1], es a la frecuencia $\nu_{\text{máx}}$: 3.432 cm^{-1} que proviene de una banda aguda, que pertenece para este compuesto una vibración de tensión O-H de un alcohol. De igual forma, se encuentran las frecuencias de tensión del metileno =C-H $\nu_{\text{máx}}$: 3.010 cm^{-1} que corresponde al grupo C-17, y la del metilo -C-H $\nu_{\text{máx}}$: 2.853 cm^{-1} , que vendría siendo los carbonos C-18 y C-20.

Seguidamente, el otro cambio de grupo con respecto al compuesto [I], es la vibración de tensión del C=O a una frecuencia de $\nu_{\text{máx}}$: 1.723 cm^{-1} que para este compuesto viene dado por un éster alifático, que lo acompaña junto con la señal de C-O $\nu_{\text{máx}}$: 1.204 cm^{-1} y 1.088 cm^{-1} . Además, al igual que el compuesto [II] se tiene la frecuencia del C-O $\nu_{\text{máx}}$: 1.171 cm^{-1} , que corresponde a la tensión de alcoholes primarios. La otra señal que se observa en la figura 23, es la frecuencia $\nu_{\text{máx}}$: 1.656 cm^{-1} que es la tensión C=C de los C-16 y C-17, que provienen del enlace exocíclico.

En la tabla 15, se podrá observar detalladamente las asignaciones de vibración de cada asignación que se encuentra en el compuesto [III].

Tabla 15. Bandas de absorción en el espectro Infrarrojo (IR) del compuesto [III]

vmáx (cm⁻¹)	3.432	3.010	2.927	2.853	1.723	1.656
Asignación	O-H	=C-H	-C-H	-C-H	C=O	C=C
vmáx (cm⁻¹)	1.461	1.378	1.232	1.204	1.149	1.088
Asignación	C-H	C-H	C-H	C-O	C-O	C-O

Del mismo modo, para este compuesto [III] se obtuvo el análisis espectroscópico de RMN-¹H, y RMN-¹³C; por consiguiente, como se realizó para los compuestos anteriores, se realizó una ampliación de las señales tanto en campo alto, como en campo bajo.

6.3.2. Espectroscopia de RMN-¹H y RMN-¹³C del compuesto [III]

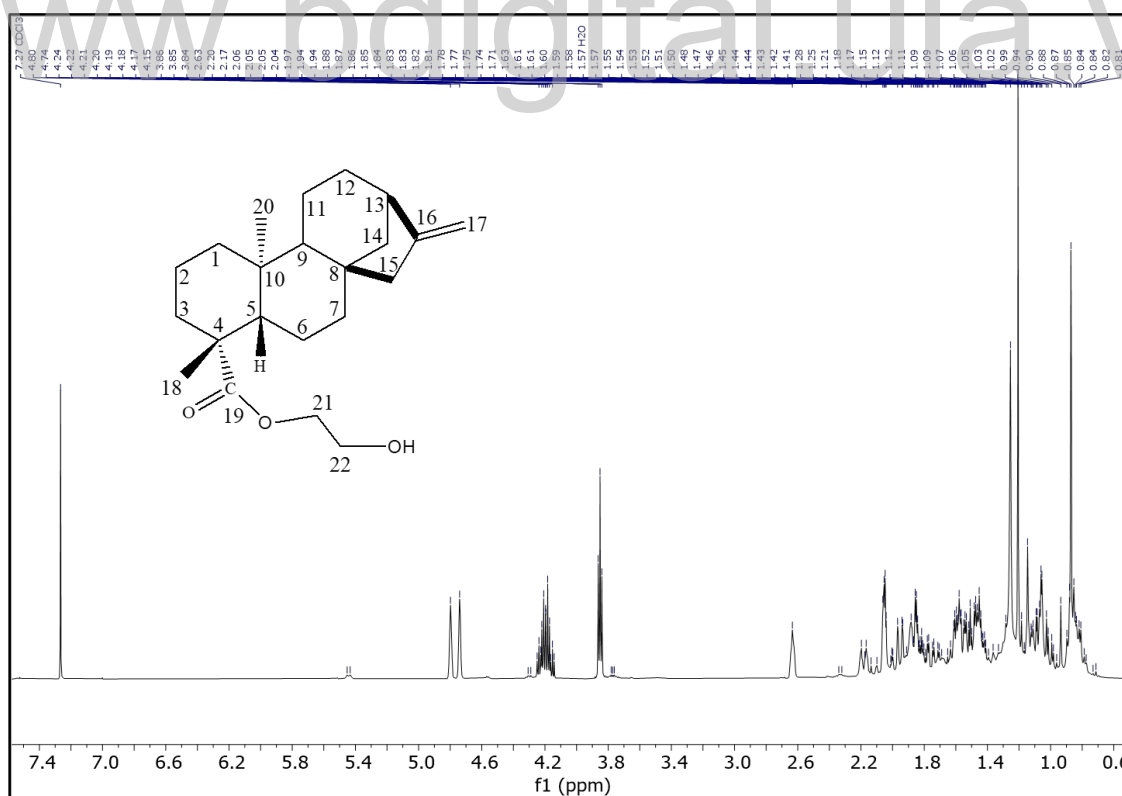


Figura 24. Espectro de RMN-¹H (CDCl₃, 400 MHz) del compuesto [III]

En el espectro de RMN- ^1H del compuesto [III] (figura 24), también se encuentran las señales correspondientes al núcleo del kaureno; en consecuencia, al igual que el compuesto [II] se encuentran las nuevas señales que corresponden a la hemisíntesis del ácido *ent*-kaurénico [1], con etilenglicol.

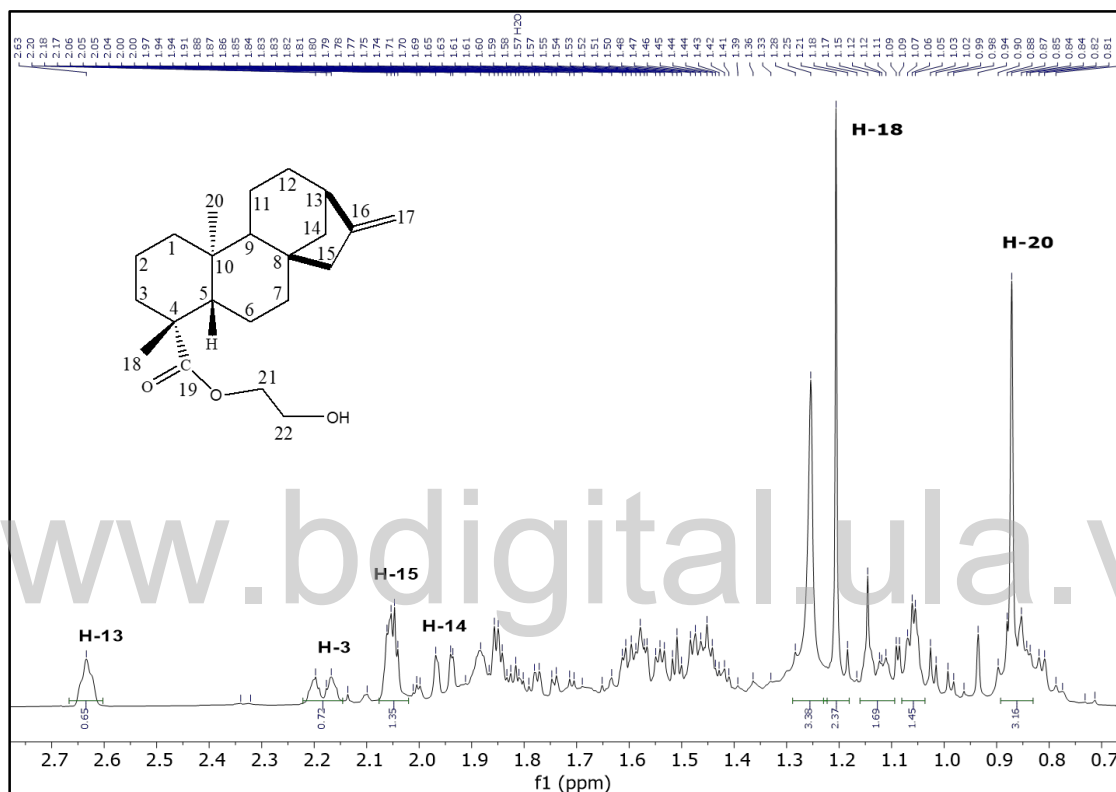


Figura 25. Ampliación A del espectro de RMN- ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto [III]

Ahora bien, en la ampliación que se realizó al espectro (figura 25), del compuesto [III] se observan los protones de los grupos metilos H-18 [δ_{H} : 1,21] y H-20 [δ_{H} : 0,87], en forma de singlete. Seguidamente, se tiene el H-13 que corresponden al grupo que se encuentra como cabeza de puente, y este a su vez se observa la señal como en los demás compuestos [I] y [II] como un singlete [δ_{H} : 2,63]. Otra señal muy característica del núcleo del ácido *ent*-kaurénico [1] y que se puede observar en el espectro, es asignable a H-15 [δ_{H} : 2,05] en forma de multiplete (*m*).

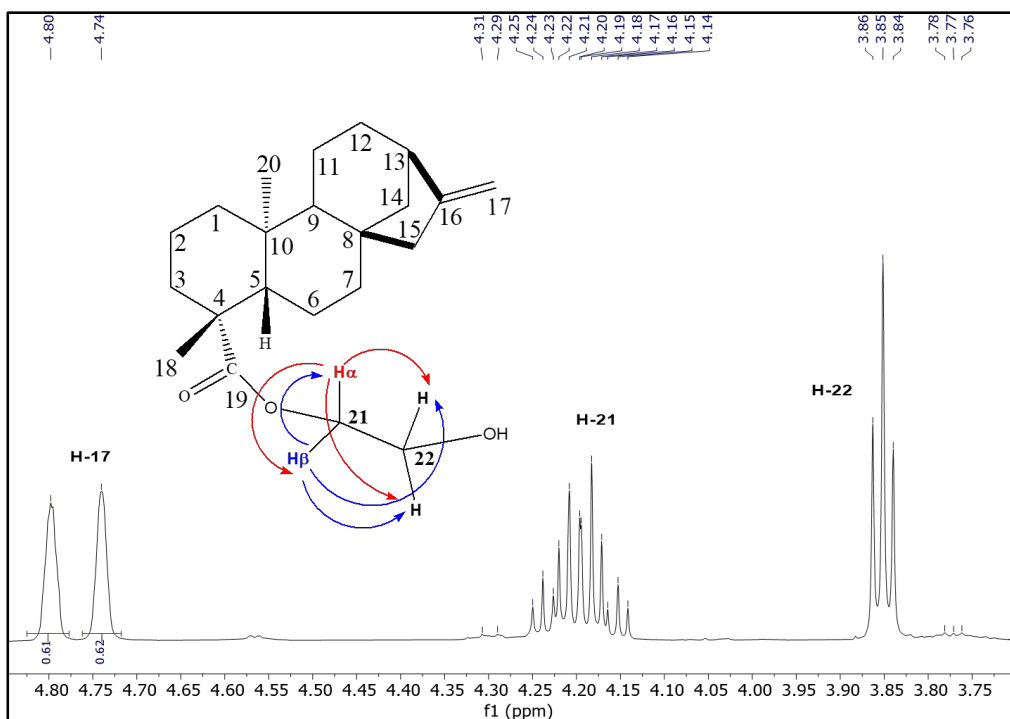


Figura 26. Ampliación B del espectro de RMN-¹H (CDCl₃, 400 MHz) del compuesto [III]

En la figura 26, podemos observar las nuevas señales del espectro de RMN-¹H del compuesto [III], que se ubican en el rango de 3,5-4,5 ppm en la zona de campo bajo del espectro. La primera señal proviene de los protones diasterotópicos que vendrían siendo H-21. Estos protones químicamente y magnéticamente no son equivalentes, y es por ello que se encuentra como señal de un multiplete, a un desplazamiento de [δ_H : 4,2]. El protón H- α va acoplarse con los dos protones vecinal (H-22) que se encuentran desapantallados, dando como señal un triplete (*t*). Ahora, siendo estos protones no equivalentes, H- α se va acoplar con los espines α y β de su protón geminal (H- β), dando como resultado un doblete (*d*) como señal. Ahora bien, el protón H- β tendrá el mismo comportamiento que H- α , y va acoplarse con los H-22 dando un triplete (*t*) y con los espines α y β de H- α dando a su vez un doblete (*d*) como señal.

La otra nueva señal que se puede observar, es a un desplazamiento de [δ_H : 3,85], que provienen de los protones H-22. Esta señal se debe, a que estos protones diasterotópicos siendo químicamente no equivalentes, pero magnéticamente iguales, solo se van acoplar con los dos protones vecinales desapantallados (H-21), dando de esta manera una señal como triplete (*t*). Además, de la misma manera que al estar de vecino con un átomo electronegativo, que vendría

siendo el grupo hidroxilo, estos protones van a estar desapantallados. En la tabla 16, se pueden observar las señales de los protones que corresponden a las figuras 25 y 26.

Tabla 16. Desplazamientos químicos (δ) ppm en el espectro RMN- ^1H del compuesto [III]

H	H-3	H-13	H-14	H-15	H-17α, β
δ (ppm)	2,18	2,63	1,95	2,05	4,74;4,80
m	<i>d</i>	<i>s</i>	<i>d</i>	<i>m</i>	<i>s</i>
J (Hz)	11,93		11,32		
H	H-18	H-20	H-21 α	H-21 β	H-22
δ (ppm)	1,21	0,87	4,17	4,23	3,85
m	<i>s</i>	<i>s</i>	<i>m</i>	<i>m</i>	<i>t</i>
J (Hz)					4,61; 4,68

Ahora bien, luego de obtener las elucidaciones del espectro de RMN- ^1H del compuesto [III], en la figura 27 se tiene el espectro de RMN- ^{13}C . En la figura 28, podemos encontrar el mismo espectro, pero con una ampliación en el rango de (65-15) ppm. Esto se debe, a que en ese rango se encuentra la mayoría de los carbonos que corresponde al compuesto [III].

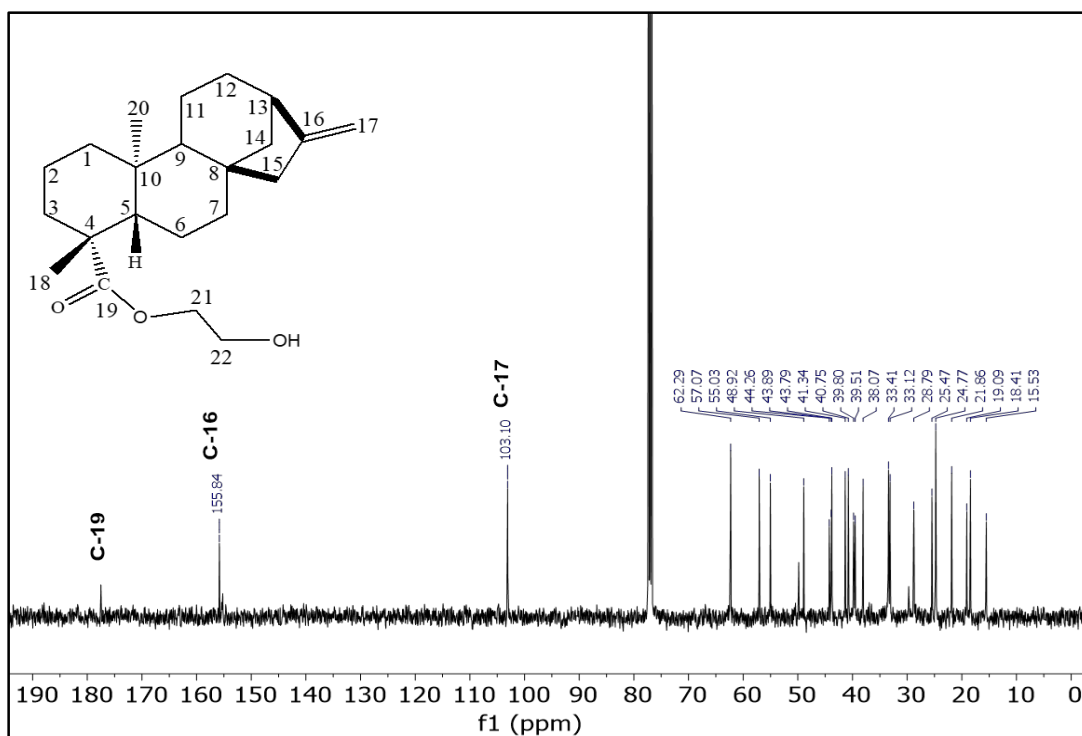


Figura 27. Espectro de RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) del compuesto [III]

En el espectro de ^{13}C del compuesto [III] (figura 27), se pueden confirmar más de 20 señales de carbonos que corresponde al producto de la hemisíntesis del ácido *ent*-kaurénico [1]. En campo bajo, el C-19 tuvo un desplazamiento, lo que nos indica un cambio de ese grupo, que para este compuesto es un éster con un desplazamiento de [δ_{C} : 178,00 O=C-O-], seguidamente se tienen los dos carbonos del exocíclico del kaureno, que corresponden a una hibridación Sp^2 C-16 [δ_{C} : 155,84 =C<], y C-17 [δ_{C} : 103,10 =CH₂].

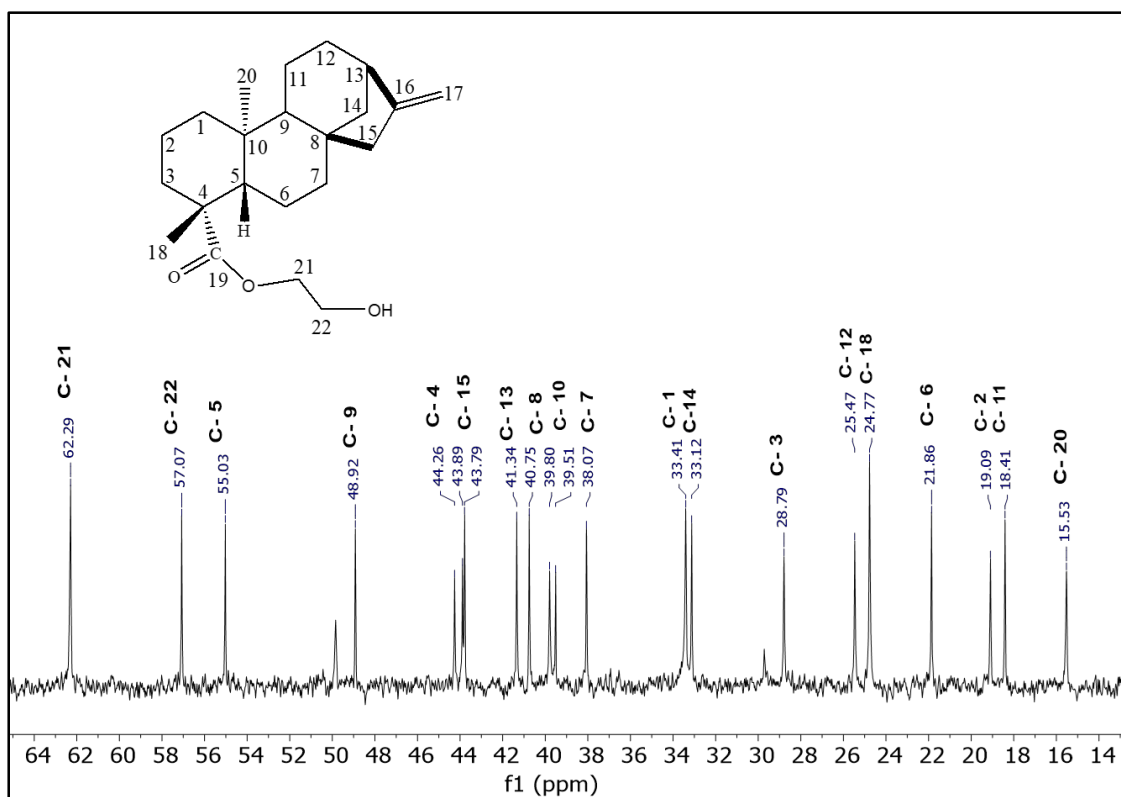


Figura 28. Ampliación del espectro de RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) del compuesto [III]

Al mismo tiempo, en la figura 28 del espectro de ^{13}C se encuentra dos nuevas señales que proviene del C-21 [δ_{C} : 62,29-O-CH $_2$ -], que está de vecino al grupo éster y el C-22 que corresponde de la señal [δ_{C} : 57,07-CH $_2$ -OH], este carbono se encuentra vecino al grupo hidroxilo O-H; por consiguiente, para este compuesto se encuentran las señales del núcleo del kaureno, como lo son los tres grupos metinos C-5 [δ_{C} : 55,06 CH], C-9 [δ_{C} : 48,92 CH], y el C-13 [δ_{C} : 44,34 CH], los tres carbonos cuaternarios C-4 [δ_{C} : 44,26>C<], C-8 [δ_{C} : 40,75>C<] y el C-10 [δ_{C} : 39,51>C<], y las otras señales corresponden a los nueve metilenos del ácido *ent*-kaurénico [1] que vendrían siendo el C-15 [δ_{C} : 43,89 CH $_2$], C-7 [δ_{C} : 38,07 CH $_2$], C-1 [δ_{C} : 33,41 CH $_2$], C-14 [δ_{C} : 33,12 CH $_2$], C-3 [δ_{C} : 28,79 CH $_2$], C-12 [δ_{C} : 25,47 CH $_2$], C-6 [δ_{C} : 21,86 CH $_2$], C-2 [δ_{C} : 19,09 CH $_2$] y el C-11 [δ_{C} : 18,41 CH $_2$]. Finalmente, se tiene las señales de los carbonos metilos que corresponde al C-18 [δ_{C} : 24,77 CH $_3$] y el C-20 [δ_{C} : 16,39 CH $_3$], que es la primera señal a campo alto.

Las señales que corresponden a las figuras 27 y 28, se pueden identificar en la tabla 17, como lo es los desplazamientos de los tipos de carbonos que se encuentran en este compuesto [III].

Tabla 17. Desplazamientos químicos (δ) ppm en el espectro RMN- ^{13}C del compuesto [III]

C	1	2	3	4	5	6
δ (ppm)	33,41	19,09	28,79	44,26	55,06	21,86
Tipo	CH ₂	CH ₂	CH ₂	<C>	CH	CH ₂
C	7	8	9	10	11	12
δ (ppm)	38,07	40,75	48,92	39,51	18,41	25,47
Tipo	CH ₂	<C>	CH	<C>	CH ₂	CH ₂
C	13	14	15	16	17	18
δ (ppm)	41,34	33,12	43,89	155,84	103,10	24,77
Tipo	CH	CH ₂	CH ₂	=C<	=CH ₂	CH ₃
C	19	20	21	22		
δ (ppm)	178,00	15,53	62,29	57,07		
Tipo	O=C-O-	CH ₃	-O-CH ₂ -	-CH ₂ -OH		

El tercer análisis de elucidación que corresponde para la espectrometría de masas, se puede observar en el cromatograma del compuesto [III] (figura 29). En este cromatograma se encuentran unas pequeñas impurezas; aunque, el pico más abundante tiene un tiempo de retención de 28,950 minutos. Luego de la obtención del cromatograma, seguidamente se obtiene el espectro de masas correspondiente al compuesto [III] (figura 30).

6.3.4. Espectros de Masas del compuesto [III]

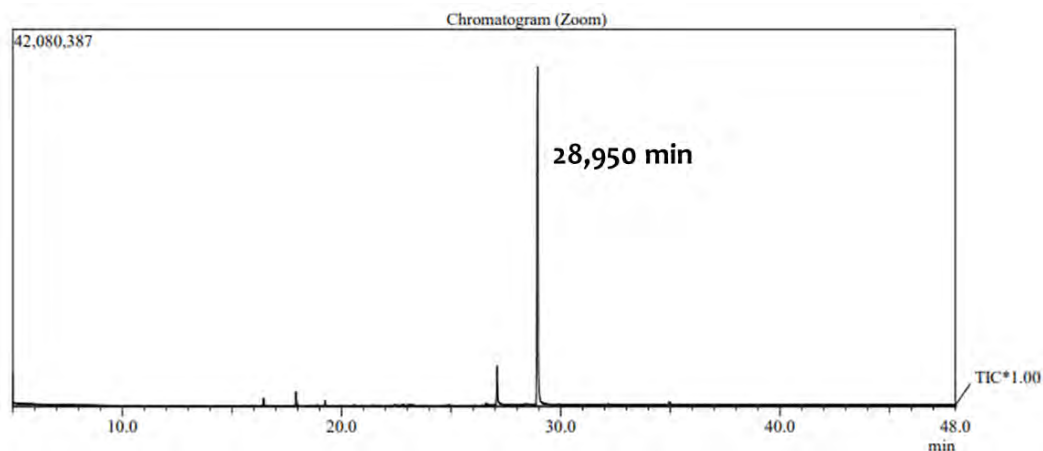


Figura 29. Cromatograma de gases del compuesto [III]

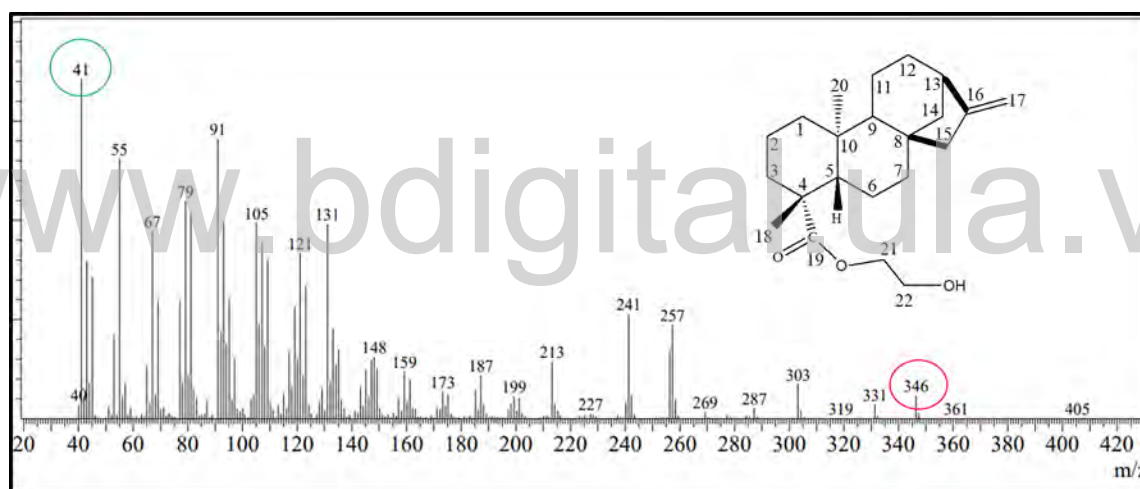


Figura 30. Espectro de masas del compuesto [III]

En el espectro de masas del compuesto [III] (figura 30) se puede observar una señal que corresponde al ion molecular $[C_{22}H_{34}O_3]^+$ que representa una señal en el espectro de 346 m/z. Esta señal de 346 m/z, es similar a la masa molecular del compuesto esperado para la reacción del ácido *ent*-kaurénico [1] con el etilenglicol; por lo tanto, este ion puede sufrir varias fragmentaciones en su estructura, y esto lo podemos observar en la figura 31.

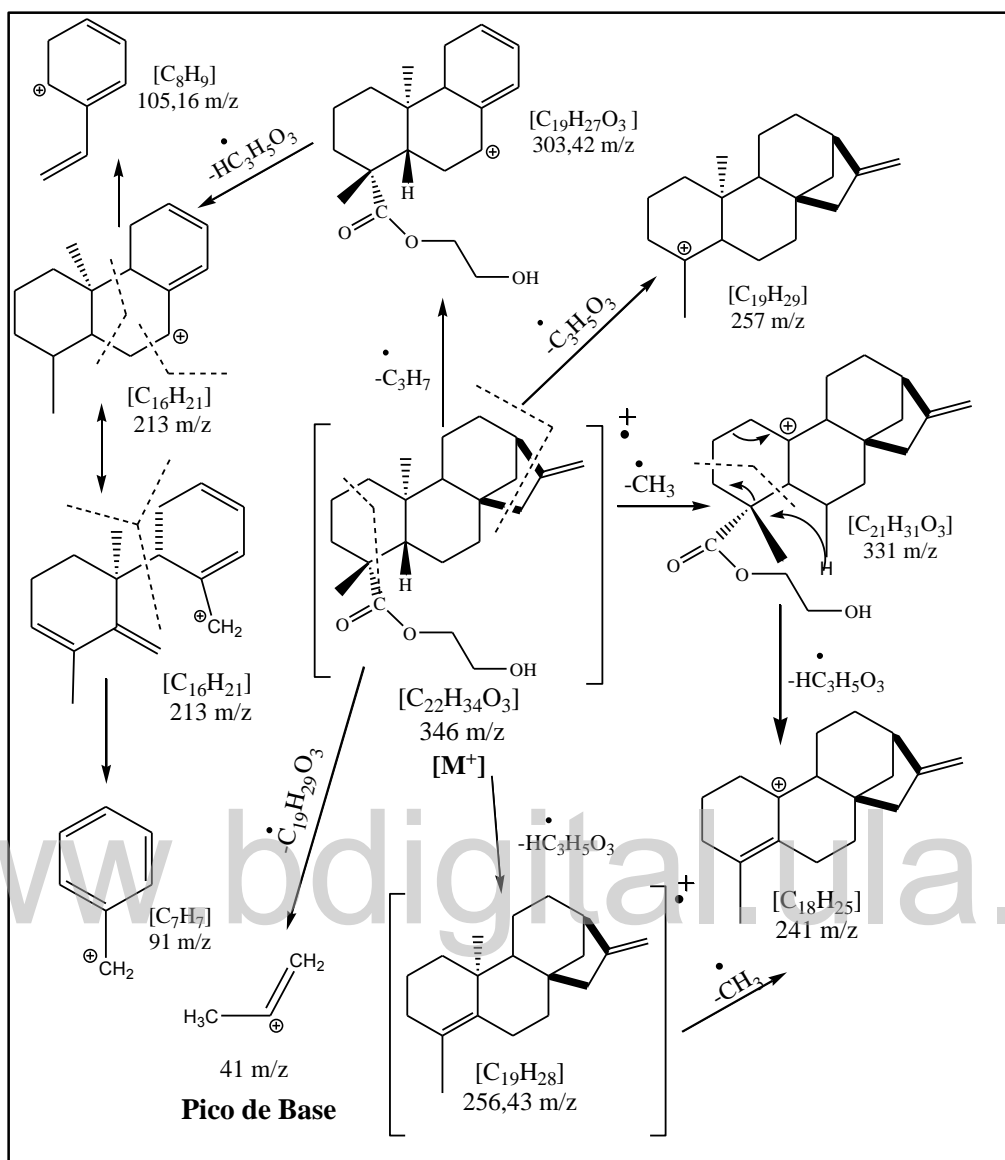
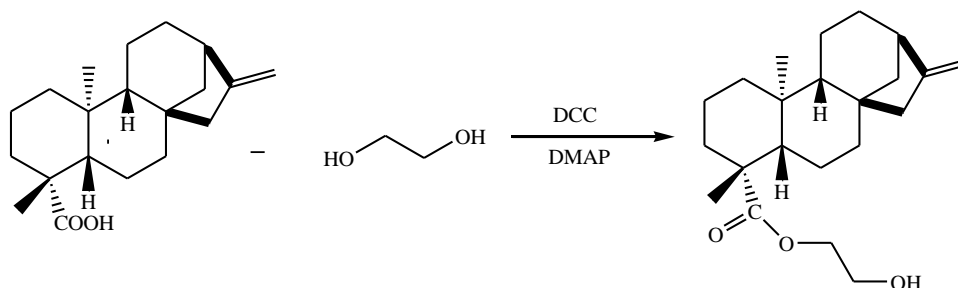


Figura 31. Fragmentación del compuesto [III]

La primera ruptura ocurre en el metilo que corresponde al C-20, dando una señal de 331 m/z que vendría siendo la estructura $[C_{21}H_{31}O_3]^+$. Para la segunda fragmentación, ocurre con la pérdida del enlace exocíclico y el ciclo pentano, que se encuentra en la estructura, presentando así una señal de 303 m/z $[C_{19}H_{27}O_3]^+$, que se encuentra en el espectro de masas.

Al mismo tiempo, para la tercera ruptura del ion molecular 346 m/z, proviene de la pérdida del grupo (C₃H₅O₃), obteniendo una señal de 257 m/z [C₁₉H₂₉]⁺. En la figura 30, se observa una señal a 256,45 m/z que corresponden a la misma pérdida de la señal 257 m/z, pero adicionando un protón. El fragmento que corresponde a la señal de 256,45 m/z, sufre una ruptura el metilo que corresponde al C-20, teniendo así la señal del ion 241 m/z. Ahora, del fragmento que corresponde a 303 m/z [C₁₉H₂₇O₃]⁺ sufre la pérdida del carboxilato, dando una señal de 213 m/z [C₁₆H₂₁]⁺. Seguidamente, este ion 213 m/z sufre una fragmentación, en el centro de los anillos, dando dos señales de iones que corresponden a 105 m/z [C₈H₉]⁺ y a 91 m/z [C₇H₇]⁺. En el espectro de masas (figura 30) se encuentra una señal con mayor intensidad, que viene dada por otra fragmentación del ion molecular, en una parte adyacente del ciclo se produce una ruptura donde se encuentra el C-19, dando de esta manera un ion de una señal de 41 m/z, que corresponde al ion pico de base [C₃H₅]⁺ en el espectro de masas del compuesto [III].

Finalmente, por medio de los resultados obtenidos, tanto para la espectroscopia de infrarroja IR, de RMN y de espectrometría de masas, podemos concluir que el compuesto [III] es el compuesto esperado de la primera reacción del ácido *ent*-kaurénico [1] junto con el etilenglicol. Dicho esto, se tiene como resultado que el compuesto [III] es el 2-hidroxietil kaurenato.



Ácido *ent*-kaurénico [1]

2-hidroxietil kaurenato [III]

Figura 32. Reacción de Steglich del ácido *ent*-kaurénico [1] con etilenglicol

Ahora bien, aparte de los espectros de unidimensionales que se observaron en la sección anterior. Para poder corroborar la formación de los nuevos enlaces, de la hemisíntesis del ácido *ent*-kaurénico [1] con el etilenglicol, se tienen los espectros bidimensionales. A continuación, para el compuesto [III] se podrán analizar los tres diferentes espectros de bidimensionales.

6.3.4. Espectros bidimensionales del compuesto [III]

El compuesto [III], que se obtuvo por medio de la hemisíntesis del ácido *ent*-kaurénico [1] junto con etilenglicol, se obtuvieron los espectros bidimensionales como lo son COSY ^1H - ^1H , HSQC y HMBC. Por medio de estos espectros, se pudo corroborar exactamente como están enlazados las nuevas señales ya sea los protones vecinos (^1H - ^1H - COSY) figura 33, los carbonos enlazados directamente con sus protones (HSQC) figura 34; por último, se tiene la correlación que corresponde a (HMBC) que corresponde a las correlaciones de carbonos con hidrógenos vecinos figura 35.

www.bdigital.ula.ve

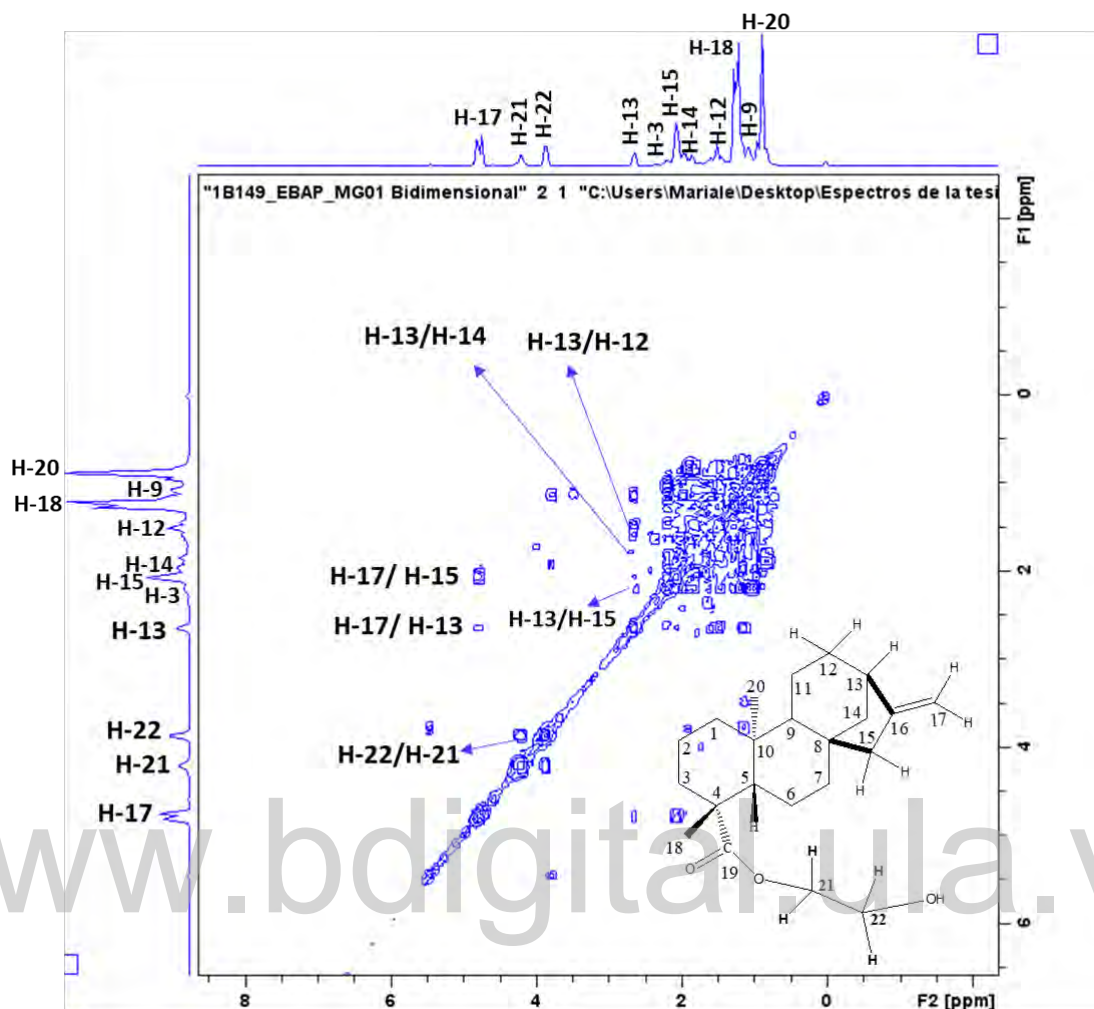


Figura 33. Espectro ^1H - ^1H - COSY (CDCl_3) del compuesto [III]

En el espectro COSY ^1H - ^1H (figura 33) se puede observar las correlaciones de los nuevos grupos que se formaron por la hemisíntesis, que corresponde a la correlación $\text{H-22} \leftrightarrow \text{H-21}$, siendo protones vecinales. Al mismo tiempo, en el núcleo del kaureno se tiene las correlaciones de los protones olefínicos (H-17) del doble enlace exocíclico, junto con H-13 y H-15. Seguidamente, se tienen las otras correlaciones del protón metino H-13 que proviene del carbono cabeza de puente. Este protón H-13 va tener correlación con los protones de los metilenos H-15, H-14 y H-12.

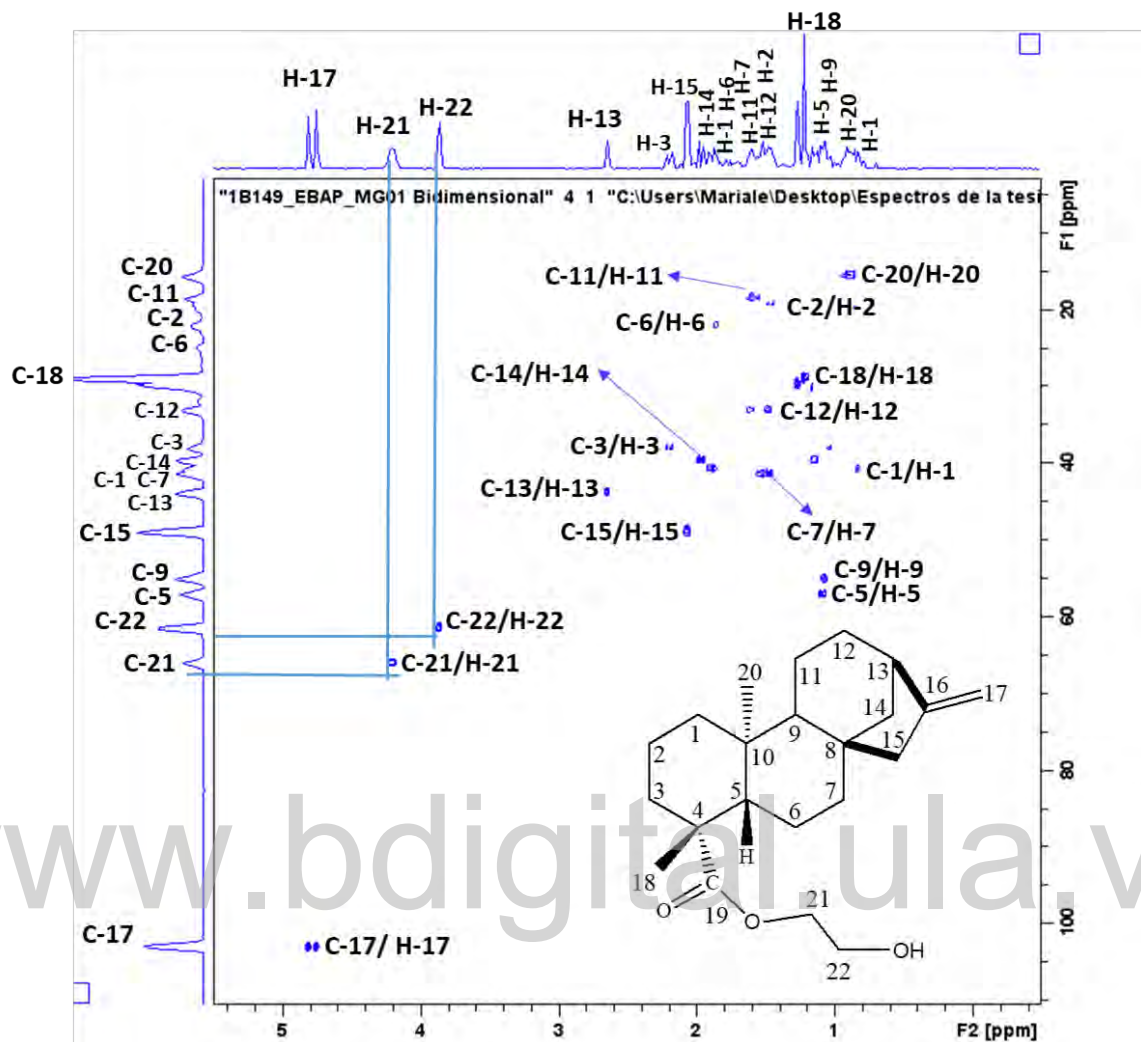


Figura 34. Espectro HSQC (CDCl_3) del compuesto [III]

El espectro bidimensional HSQC (figura 34), nos permite observar todas las correlaciones de los carbonos con sus respectivos hidrógenos, en especial la de los dos grupos nuevos de la hemisíntesis del ácido *ent*-kaurénico [1] con etilenglicol. En la tabla 18, se encuentran todas las correlaciones que corresponde al compuesto [III].

Tabla 18. Señales de ^{13}C y ^1H en el espectro de HSQC

Asignación	^{13}C (ppm)	^1H (ppm)	Asignación	^{13}C (ppm)	^1H (ppm)
1	40,8	0,80	13	43,9	2,65
2	19,4	1,45	14	39,6	1,98
3	37,9	2,17	15	48,9	2,07
5	57,2	1,09	17	103,1	4,8; 4,75
6	22,1	1,85	18	28,9	1,19
7	41,3	1,50	20	15,6	0,85
9	55,0	1,07	21	66,1	4,2
11	18,5	1,59	22	61,6	3,87
12	33,0	1,48			

www.bdigital.ula.ve

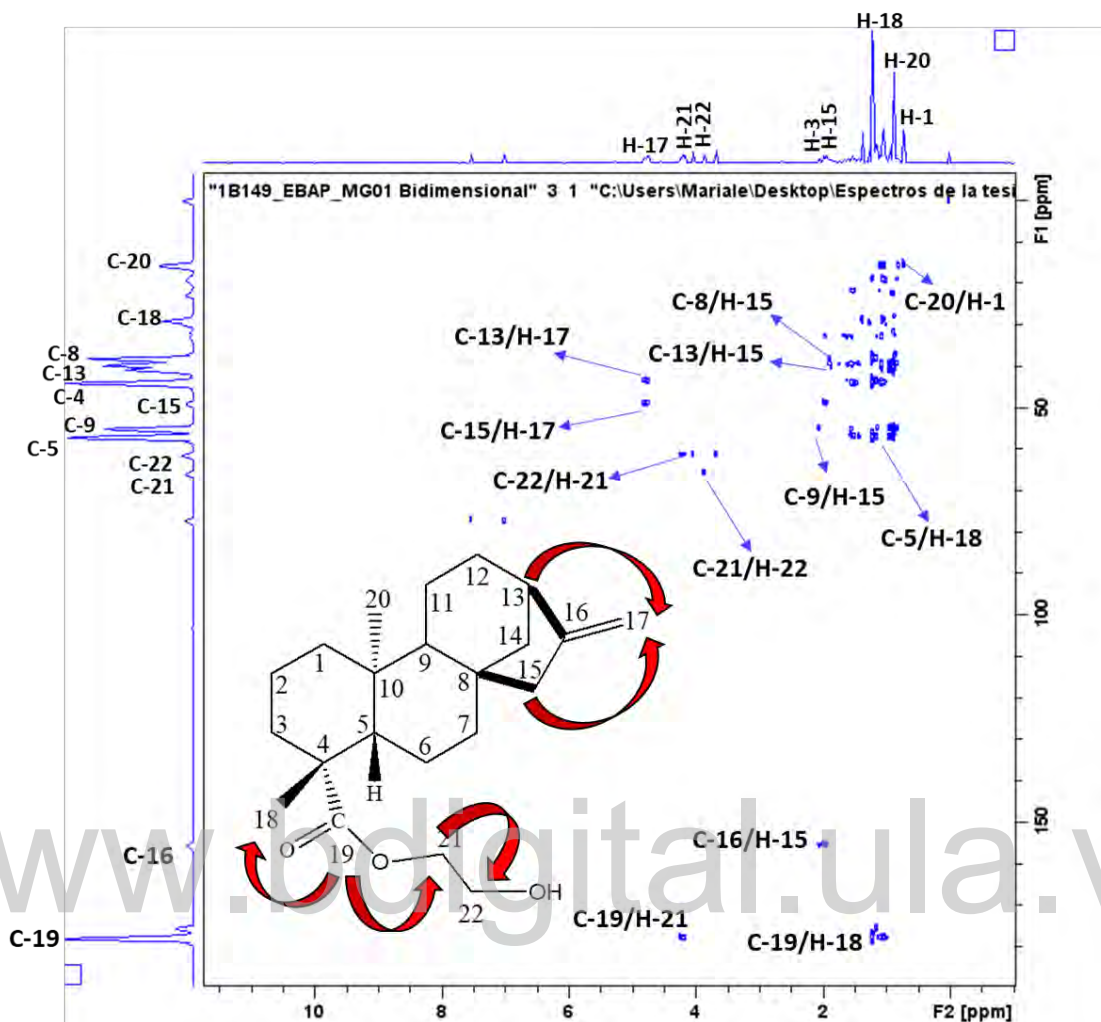


Figura 35. Espectro HMBC (CDCl_3) del compuesto [III]

En el análisis de HMBC (figura 35), se mostraron las correlaciones que corresponde a los carbonos con los hidrógenos vecinos, dejando claro el entorno de cada grupo sustituyente. Una de las principales es la del C-19 con los H-18 del grupo metilo y la nueva señal resultante de la hemisíntesis que son los H-21. Las otras correlaciones que nos indica la formación del producto de la hemisíntesis del ácido *ent*-kaurénico [1], son las correlaciones de $\text{C-21} \leftrightarrow \text{H-22}$ y $\text{C-22} \leftrightarrow \text{H-21}$. Por último, quedan establecidas las correlaciones que corresponde al núcleo del kaureno, que vendría siendo, los carbonos cuaternarios con una correlación $\text{C-16} \leftrightarrow \text{H-15}$ y $\text{C-8} \leftrightarrow \text{H-15}$; y los carbonos respecto a los hidrógenos del doble enlace exocíclico $\text{C-15} \leftrightarrow \text{H-17}$ y $\text{C-13} \leftrightarrow \text{H-17}$.

A continuación, para esta sección se estudiarán los compuestos que se obtuvieron por medio de la segunda reacción del ácido *ent*-kaurénico [1] junto con el diol 1,3-propilenglicol.

7. ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LA HEMISÍNTESIS DEL ÁCIDO *ENT*-KAURÉNICO [1] CON 1,3-PROPILENGLICOL.

En la segunda reacción de Steglich, para la hemisíntesis del ácido *ent*-kaurénico [1] con el 1,3-propilenglicol, se podrán analizar los tres compuestos obtenidos de este desarrollo sintético.

7.1 Características del compuesto [IV]

El compuesto [IV] fue un sólido blanco, con un punto de fusión de (226-228) °C y obtuvo un porcentaje de rendimiento de 7,72 %. Este compuesto corresponde a la separación de la cromatografía preparativa, que se extrajo a una polaridad de eluyente de hexano-acetato de etilo al 10%. Por medio de los resultados espectroscópico de IR, RMN-¹H, ¹³C, además teniendo el tiempo de retención del cromatograma de gases junto con el espectro de masas, se llegó a la conclusión que este compuesto [IV] es el ácido *ent*-kaurénico [1].

7.2 Características del compuesto [V]

El compuesto [V] fue el segundo producto obtenido luego de la cromatografía preparativa, no se le pudo determinar el punto de fusión debido a su característica de viscosidad, pero se obtuvo un porcentaje de rendimiento de 19,20 %. A continuación, para este compuesto [V] se podrán observar los espectros de IR, RMN-¹H, RMN-¹³C y masas (EM).

7.2.1. Espectroscopia Infrarroja (IR) del compuesto [V]

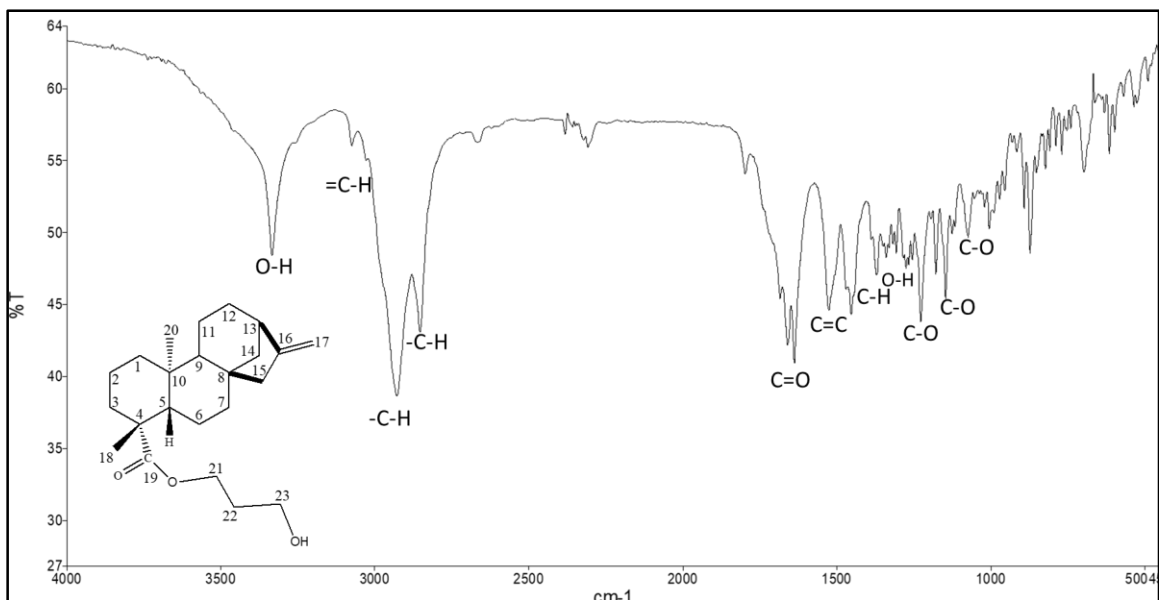


Figura 36. Espectro de Infrarrojo del compuesto [V]

En el espectro de IR del compuesto [V] (figura 36), se observa la intensidad de una banda aguda que se encuentra a una frecuencia de $\nu_{\text{máx}}$: 3.333 cm^{-1} , a diferencia del compuesto [IV] esta banda para este compuesto representa la vibración de tensión libre de un hidroxilo (OH) que pertenece a un alcohol. Otra banda en particular es la del C=O que tiene aproximadamente una frecuencia de $\nu_{\text{máx}}$: 1.659 cm^{-1} , que junto con las dos bandas que corresponde a los grupos C-O $\nu_{\text{máx}}$: 1.275 cm^{-1} y C-O $\nu_{\text{máx}}$: 1.178 cm^{-1} es la presencia de un éster en la molécula. En la tabla 19, podemos observar todas las vibraciones de tensión de flexión de los grupos funcionales que corresponde al compuesto [V].

Tabla 19. Bandas de absorción en el espectro Infrarrojo (IR) del compuesto [V]

$\nu_{\text{máx}} (\text{cm}^{-1})$	3.333	3.010	2.928	2.853	1.659	1.525
Asignación	O-H	=C-H	-C-H	-C-H	C=O	C=C
$\nu_{\text{máx}} (\text{cm}^{-1})$	1.453	1.371	1.340	1.275	1,227	1.178
Asignación	C-H	C-H	O-H	C-O	C-O	C-O

Ahora bien, para el compuesto [V] se pudo obtener los espectros de RMN- ^1H , y RMN- ^{13}C que pertenece a este compuesto.

7.2.2. Espectroscopia de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C del compuesto [V]

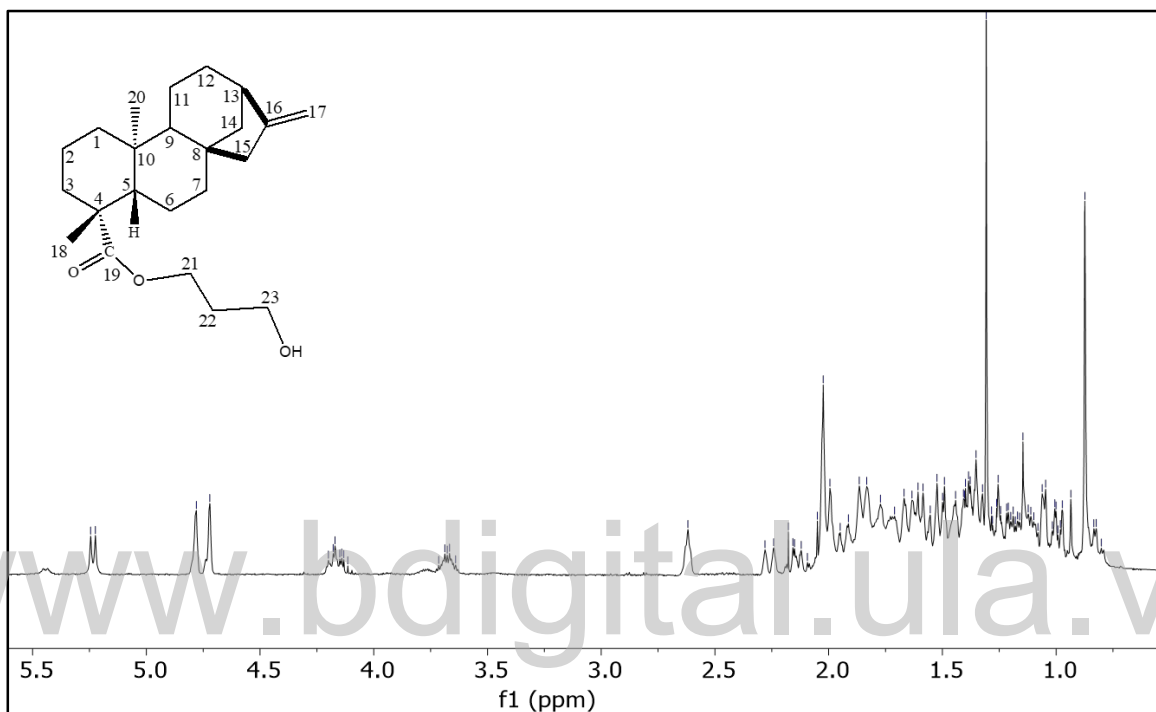


Figura 37. Espectro de RMN- ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto [V]

En el espectro de RMN- ^1H que corresponde al compuesto [V], se observan las señales correspondientes del núcleo *ent*-kaureno, y en la zona de campo bajo las nuevas señales, que vienen dadas por la hemisíntesis. En la figura 37, se encuentran las señales características de los protones metilos H-18 [δ_{H} : 1,31], H-20 [δ_{H} : 0,87] como singuletes, los protones metilenos como lo son H-1 [δ_{H} : 0,82], H-15 [δ_{H} : 2,02] y el protón metino que corresponde a H-13 [δ_{H} : 2,63] representando un singulete.

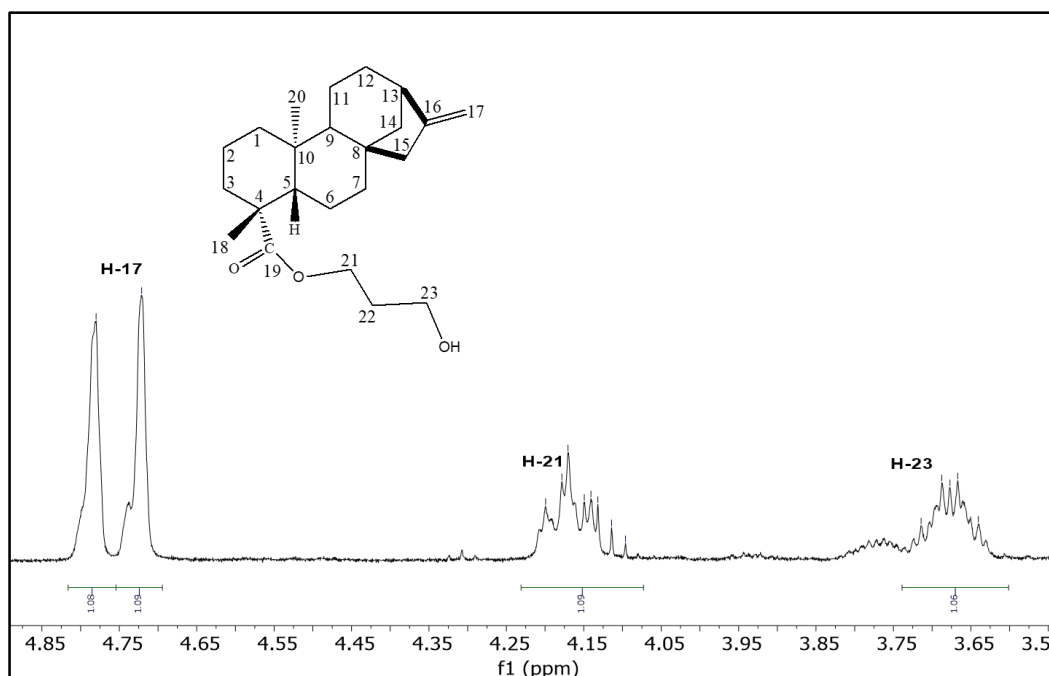


Figura 38. Ampliación del espectro de RMN- ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto [V]

Por otra parte (figura 38), en la zona de campo bajo como para los demás compuestos se observan los desplazamientos de los protones del enlace exocíclico H-17 a [δ_{H} : 4,74-4,80] como dos singletes. Además, hay que tomar en cuenta que las señales son similares al compuesto [II], ya que se encuentra los mismos desplazamientos como lo es la señal de los protones que están de vecinos al grupo carboxilato H-21 [δ_{H} : 4,17] y los protones que se encuentran de vecinos al grupo O-H que corresponde a H-23 [δ_{H} : 3,68], ambas señales se encuentran como multiplete (*m*). En la tabla 20, se pueden observar todos los desplazamientos del espectro RMN- ^1H

Tabla 20. Desplazamientos químicos (δ) ppm en el espectro RMN- ^1H del compuesto [V]

H	H-1	H-3	H-13	H-15	H-17 α , β
δ (ppm)	0,82	2,09	2,62	2,02	4,72;4,78
m	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>s</i>	<i>m</i>	<i>s</i>
J (Hz)	4,24	15,37			
H	H-18	H-20	H-21	H-23	
δ (ppm)	1,31	0,87	4,17	3,68	
m	<i>s</i>	<i>s</i>	<i>m</i>	<i>m</i>	

En el compuesto [V] se obtuvo el espectro de RMN- ^{13}C y los desplazamientos de todos los carbonos se pueden observar en la figura 46; en consecuencia, hay que tomar en cuenta, como se pudo observar en los compuestos anteriores de los espectros de ^{13}C , la mayoría de los carbonos que se encuentran en la estructura se ubican en la zona de campo alto.

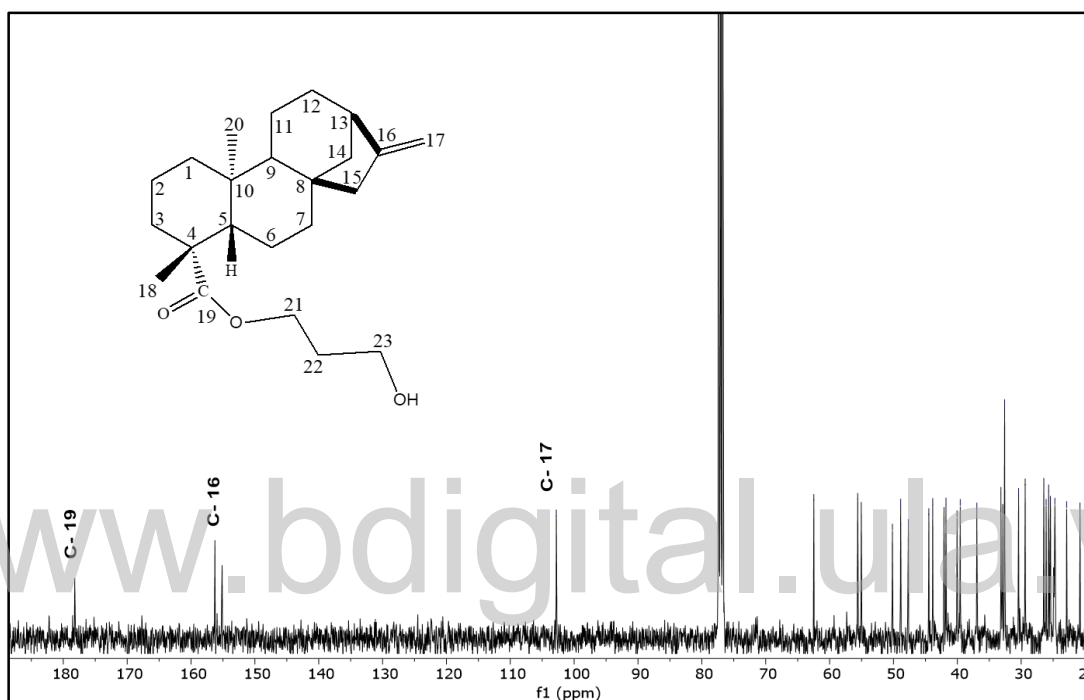


Figura 39. Espectro de RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) del compuesto [V]

En el espectro de ^{13}C para el compuesto (V) se confirman más de 20 señales de carbono, esto se debe a ciertas impurezas, que proviene de la separación. Sin embargo, se tiene señales particulares que se obtuvieron luego de la hemisíntesis del ácido *ent*-kaurénico [1] junto con el 1,3-propilenglicol. Dicho esto, como se puede observar en la figura 39, en la zona de campo bajo del espectro se tiene un desplazamiento del C-19 que representa para este compuesto un carbonilo de un éster [δ_{C} : 178, $\text{O}=\text{C}-\text{O}-$], seguidamente se tienen los dos carbonos del enlace exocíclico del ácido *ent*-kaurénico [1] que corresponden a una hibridación Sp^2 y se encuentran a un desplazamiento de C-16 [δ_{C} : 156,2 $=\text{C}<$], y C-17 [δ_{C} : 102,79 $=\text{CH}_2$].

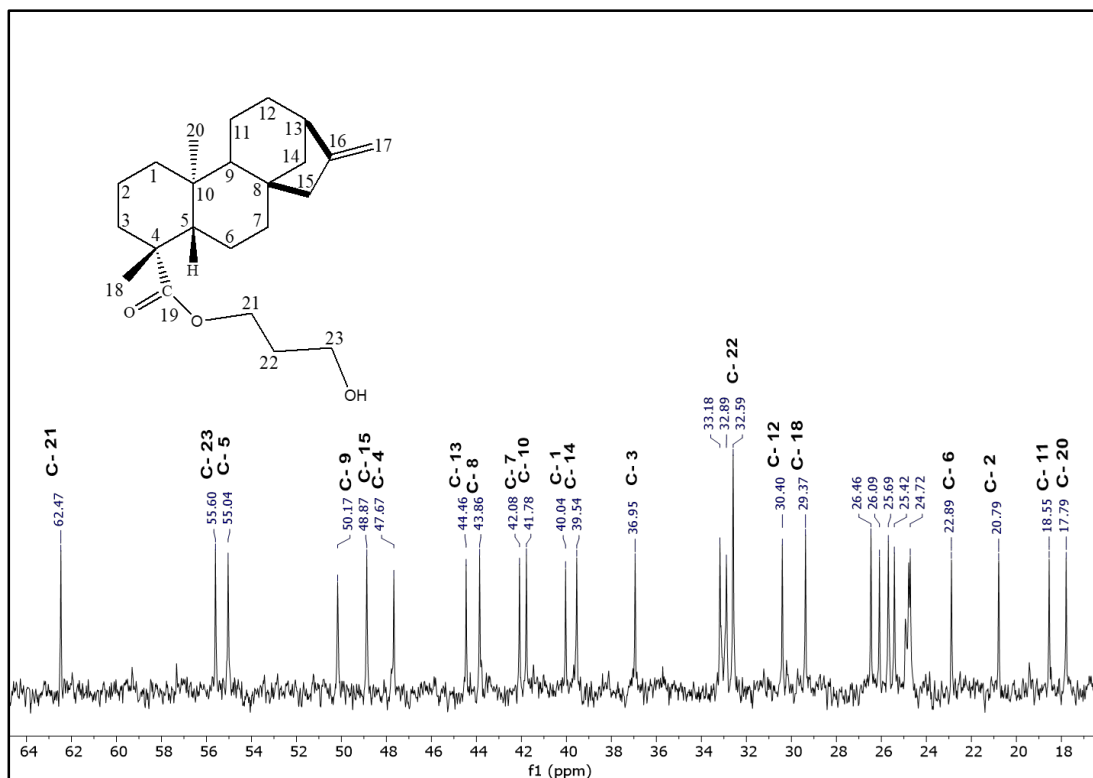


Figura 40. Ampliación A del espectro de RMN-¹³C (CDCl₃, 100 MHz) del compuesto [V]

Ahora bien, en la figura 40 del espectro se encuentran las señales nuevas que corresponden a la formación del nuevo producto por medio de la hemisíntesis; aun así, ciertas impurezas. Una de las primeras señales que podemos observar es la C-21 [δ_C: 62,47-O-CH₂-] que esta de vecino al carboxilato, y el C-22 [δ_C: 57,07-CH₂-OH] que se encuentra vecino a un grupo electronegativo, como lo es el oxígeno. Luego, se encuentran las señales correspondientes al núcleo del ácido *ent*-kaurénico [1], como lo son los tres metinos C-5 [δ_C: 55,04 CH], C-9 [δ_C: 50,17 CH], y el C-13 [δ_C: 44,46 CH].

Seguidamente, se observan las señales de los tres cuaternarios de C-4 [δ_C: 47,67>C<], C-8 [δ_C: 43,86>C<] y el C-10 [δ_C: 41,78>C<]. Las otras señales corresponden a diez metilenos, y en especial la señal del C-22 correspondiente a la modificación del ácido *ent*-kaurénico [1]. Las señales vendrían siendo el C-15 [δ_C: 48,87 CH₂], C-7 [δ_C: 42,08CH₂], C-1 [δ_C: 40,04 CH₂], C-14 [δ_C: 39,54 CH₂], C-3 [δ_C: 36,95 CH₂], la nueva señal que corresponde al C-22 δ_C: 32,59 CH₂];

seguidamente se tiene la señal del C-12 [δ_C : 30,40 CH₂], C-6 [δ_C : 22,89 CH₂], C-2 [δ_C : 20,79 CH₂] y el C-11 [δ_C : 18,55 CH₂]. Finalmente, se encuentran las dos señales de los metilos del núcleo del ácido *ent*-kaurénico [1] que corresponde a C-18 [δ_C : 29,37 CH₃] y C-20 [δ_C : 17,79 CH₃]. En la tabla 21, se encuentran todas las señales correspondientes de los desplazamientos de los carbonos que se encuentran en el espectro (figuras 39 y 40).

Tabla 21. Desplazamientos químicos (δ) ppm en el espectro RMN-¹³C del compuesto [V]

C	1	2	3	4	5	6
δ (ppm)	40,04	20,79	36,95	47,67	55,04	22,89
Tipo	CH ₂	CH ₂	CH ₂	<C>	CH	CH ₂
C	7	8	9	10	11	12
δ (ppm)	42,08	43,86	50,17	41,78	18,55	30,40
Tipo	CH ₂	<C>	CH	<C>	CH ₂	CH ₂
C	13	14	15	16	17	18
δ (ppm)	44,46	39,54	48,87	156,2	102,79	29,37
Tipo	CH	CH ₂	CH ₂	=C<	=CH ₂	-CH ₃
C	19	20	21	22	23	
δ (ppm)	178,5	17,79	62,47	32,59	55,60	
Tipo	O=C-O-	CH ₃	-O-CH ₂ -	CH ₂	-CH ₂ -OH	

Por medio de los resultados obtenidos, se puede concluir que el compuesto [V] se encontraba impuro, y además de estudiar las señales de los espectros de RMN-¹H nos indica la formación de los nuevos protones que se quieren obtener para la segunda reacción del ácido *ent*-kaurénico [1] con el 1,3-propilenglicol; sin embargo, en el espectro de RMN-¹³C que corresponde a este compuesto, se observan más señales de 23 carbono y nos confirma la impureza de dicho compuesto.

7.3 Características del compuesto [VI]

El compuesto [VI] es un sólido pálido, que obtuvo un porcentaje de rendimiento de 11,97 %. Esta muestra corresponde al aumento de la polaridad de la columna cromatográfica al 30 % de acetato de etilo-hexano. Para este compuesto se obtuvieron los espectros de IR, RMN- ^1H , y espectrometría de masas. A continuación, en la figura 40 se puede observar el espectro IR.

7.3.1. Espectroscopia Infrarroja (IR) del compuesto [VI]

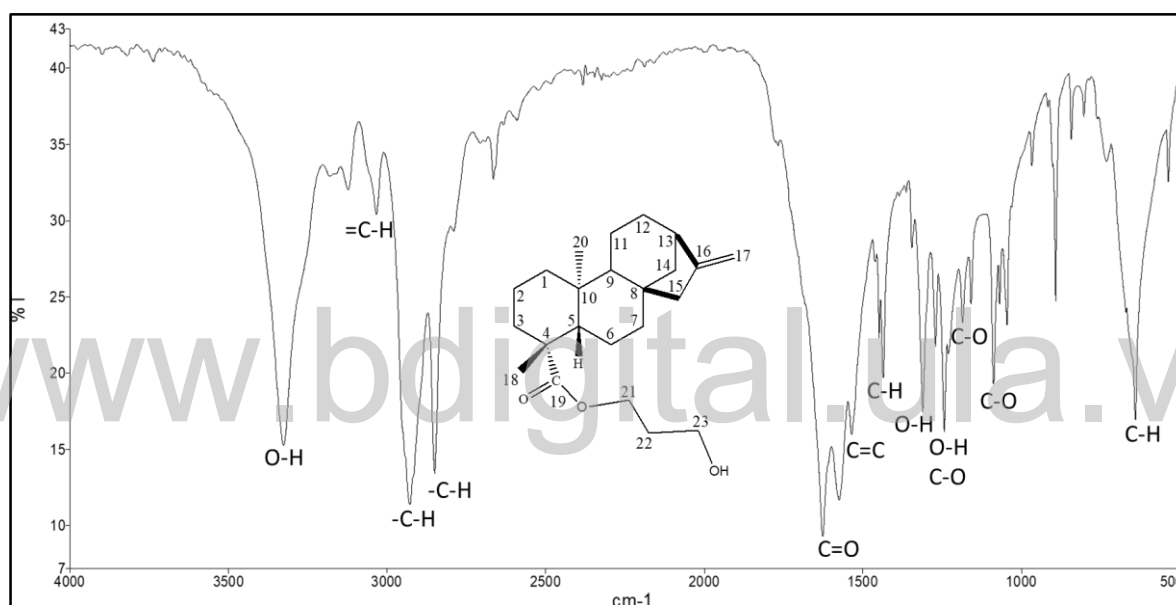


Figura 41. Espectro de Infrarrojo del compuesto [VI]

En el espectro de IR del compuesto [VI] (figura 41), al igual que los demás compuestos se presentan las señales correspondientes al núcleo del kaureno, como lo son la banda de vibración de tensión $=\text{C-H}$ $\nu_{\text{máx}}$: 3.010 cm^{-1} que corresponde al C-17, luego la vibración de tensión de los metilenos $\nu_{\text{máx}}$: 2.928 cm^{-1} , que se encuentran en todo el núcleo, la frecuencia de los metilos que corresponden a los grupos 18 y 20 $\nu_{\text{máx}}$: 2.8750 cm^{-1} . En consecuencia, a los resultados de la hemisíntesis del ácido *ent*-kaurénico [1] junto con el 1,3-propilenglicol, se encuentran nuevas señales, como lo es el cambio de la banda de O-H, que ahora pertenece a un hidroxilo de alcohol, y se encuentra $\nu_{\text{máx}}$: 3.326 cm^{-1} , como una banda intensa aguda. Seguidamente, a frecuencias

menores, se encuentra el segundo cambio a $\nu_{\text{máx}}$: 1.626- 1.574 cm^{-1} , una vibración de tensión tanto asimétrica y simétrica del C=O, que proviene de un grupo éster. El otro cambio de bandas, que podemos encontrar son las dos frecuencias $\nu_{\text{máx}}$: 1.271- 1.087 cm^{-1} , que pertenecen a una vibración de tensión asimétrica y simétrica de C-O.

La otra banda nueva se tiene a una de tensión $\nu_{\text{máx}}$: 1.229 cm^{-1} que corresponde a un alcohol primario. En la tabla 22, se pueden observar todas las señales de vibración y flexión de los grupos que se encuentran en el espectro IR para el compuesto [VI]

Tabla 22. Bandas de absorción en el espectro Infrarrojo (IR) del compuesto [VI]

$\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1})	3.326	3.010	2.928	2.850	1.626	1.535
Asignación	O-H	=C-H	-C-H	-C-H	C=O	C=C
$\nu_{\text{máx}}$ (cm^{-1})	1.448	1.435	1.311	1.229	1.087	640
Asignación	C-H	C-H	O-H	C-O	C-O	C-H

www.bdigital.ula.ve

7.3.2. Espectroscopia de RMN- ^1H del compuesto [VI]

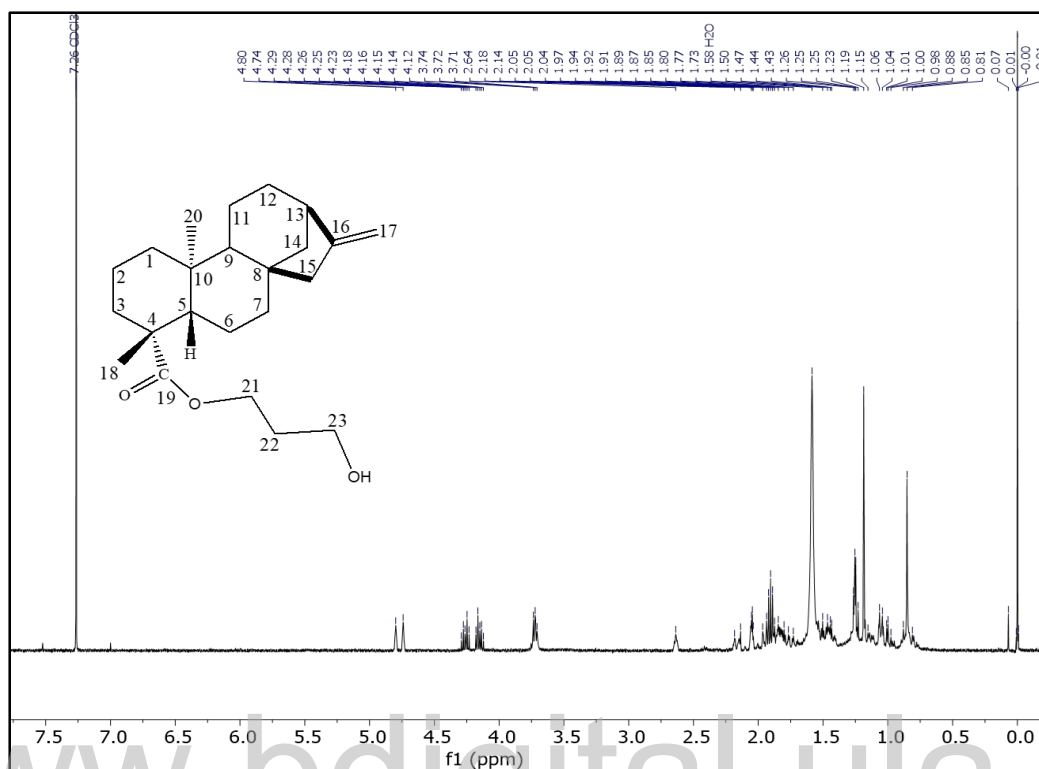


Figura 42. Espectro de RMN- ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto [VI]

En el espectro de RMN- ^1H para el compuesto [VI] (figura 42), a diferencia del compuesto [V] se puede observar con claridad (en la zona del campo bajo), las señales correspondientes a la hemisíntesis de la segunda reacción del ácido *ent*-kaurénico [1] junto con el 1,3-propilenglicol. En cambio, en la zona del campo alto, se observa las señales similares del núcleo del ácido *ent*-kaurénico [1].

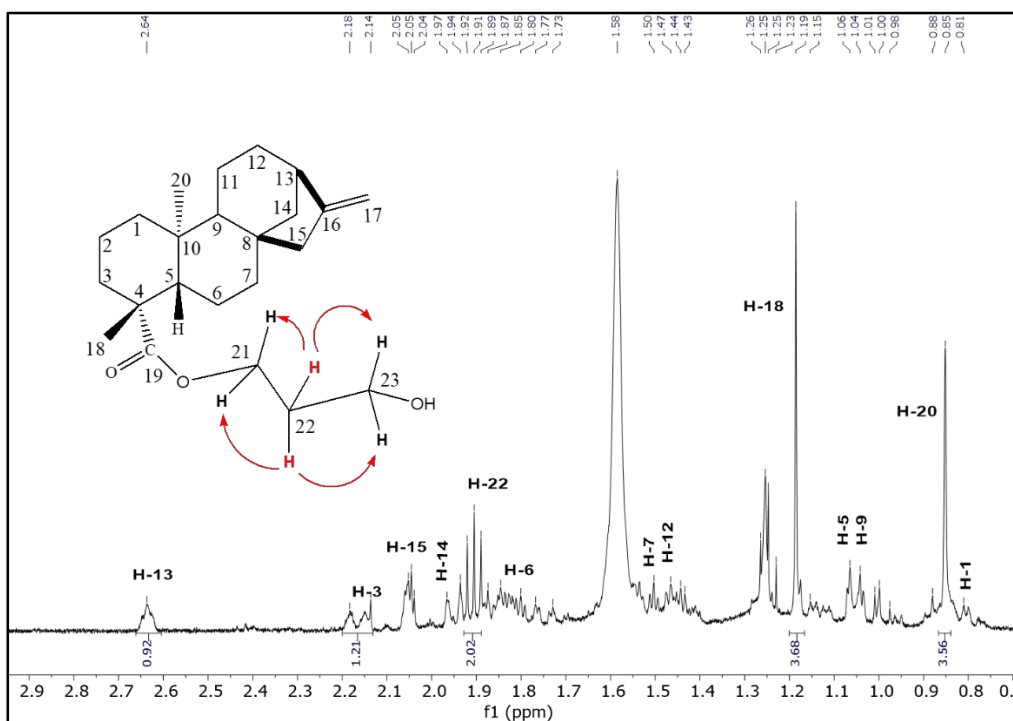


Figura 43. Ampliación A del espectro de RMN- ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del compuesto [VI]

En la figura 42, se realizó una ampliación en la zona de campo alto (figura 43), y se puede observar una nueva señal con un desplazamiento de $[\delta_{\text{H}}: 1,90]$, que corresponde a los protones H-22. Estos protones se van acoplar con los protones desapantallados de H-21 y los de H-23, dando de esta manera una señal como un multiplete (*m*); por otra parte, en el espectro del compuesto [VI] se detallan mejor las señales de los protones apantallados en esta zona de campo alto, como lo son los protones de los metilos H-18 $[\delta_{\text{H}}: 1,18]$, y H-20 $[\delta_{\text{H}}: 0,85]$ que se encuentran como singuletes y los protones que corresponden a los metilenos H-1 $[\delta_{\text{H}}: 0,81]$, H-12 $[\delta_{\text{H}}: 1,47]$, H-7 $[\delta_{\text{H}}: 1,50]$, H-14 $[\delta_{\text{H}}: 1,96]$, H-15 $[\delta_{\text{H}}: 2,05]$ y el H-3 $[\delta_{\text{H}}: 2,14]$. De manera similar, se observan los protones de los metinos H-5 $[\delta_{\text{H}}: 1,06]$, H-9 $[\delta_{\text{H}}: 2,05]$, y el H-13 $[\delta_{\text{H}}: 2,64]$ como en los demás compuestos, que se encuentra como un singulete.

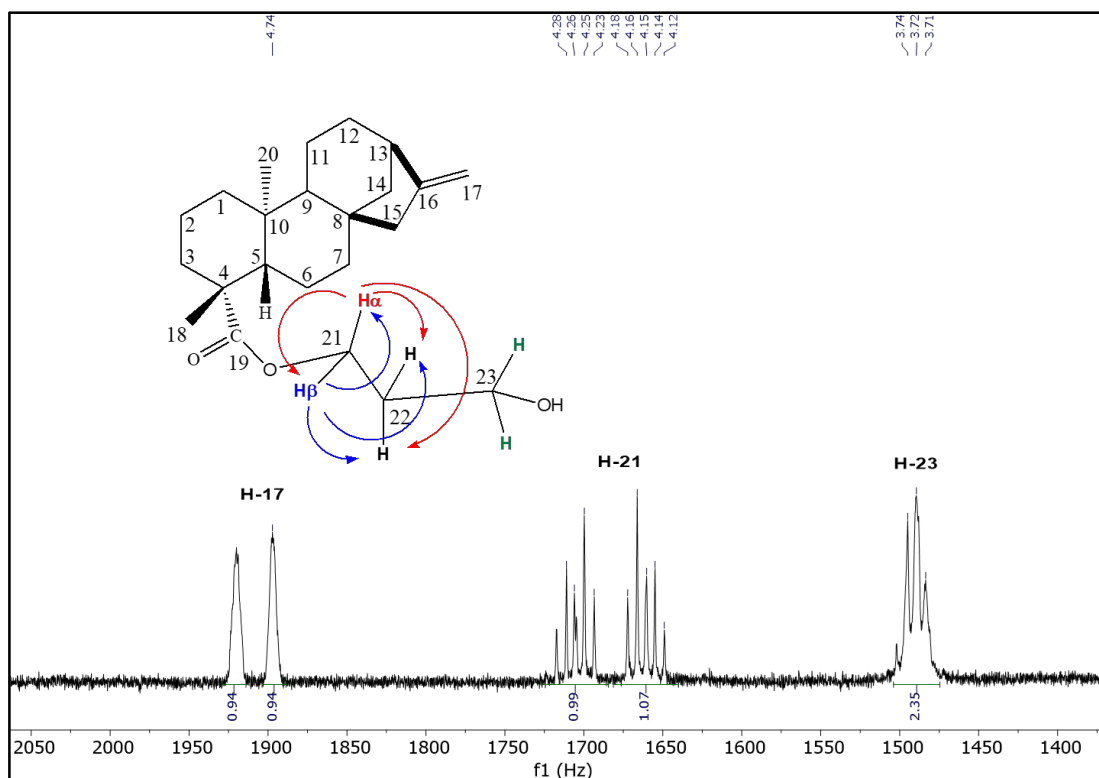


Figura 44. Ampliación B del espectro de RMN-¹H (CDCl₃, 400 MHz) del compuesto [VI]

En el espectro de RMN-¹H del compuesto [VI], se realizó una ampliación en la zona de campo bajo (figura 44), para poder estudiar detalladamente las nuevas señales que se encuentran en el rango (3,5-4,5) ppm. A un desplazamiento de [δ_H : 4,16-4,26] se observan dos nuevas señales que provienen de los protones H-21. Al igual que el compuesto [III], siendo estos protones diastereotópicos químicamente y magnéticamente no equivalentes, el protón H- α va acoplarse con los dos protones vecinales que se encuentran apantallados (H-22), dando de esta manera como señal un triplete (*t*) (5,88 Hz). A su vez, H- α también va acoplarse con su protón geminal (H- β) dando una señal de un doblete (*d*) (6,01 Hz); por consiguiente, H- α tendrá una señal correspondiente a un multiplete (*m*), como se puede observar en la figura 44. De la misma manera, el protón H- β también va acoplarse con los dos protones vecinal H-22, dando una señal de un triplete (*t*) (6,28 Hz) y con H- α , dando como señal un doblete (*d*) (6,40 Hz). Al igual que H- α , H- β tiene una señal final en 4,26 ppm como un multiplete (*m*)

Al comparar las señales resultantes de los protones H-21, del compuesto [III] y el compuesto [VI], podemos observar son diferentes. La diferencia se debe a que los protones H-21 del compuesto [VI] se acoplan con protones mucho más apantallados (H-22) que el compuesto [III]. Esto implica a que los electrones del oxígeno del grupo hidroxilo en el compuesto [III], influyen en el desdoblamiento de los acoplamientos de los espines.

Por otra parte, la otra nueva señal que proviene de la hemisíntesis del ácido *ent*-kaurénico [1] con el 1,3-propilenglicol, se encuentra a un desplazamiento de [δ_H : 3,72] y pertenece a los protones del H-23. Estos protones siendo magnéticamente iguales, se van a acoplar con los dos protones apantallados H-22, dando como señal como un triplete (*t*) (figura 44). Hay que tomar en cuenta, que estos protones se ubican en este rango, debido a que se encuentran con grupos vecinales como lo es el oxígeno del hidroxilo. En la tabla 23, se encuentran todos los desplazamientos las figuras 43 y 44.

Tabla 23. Desplazamientos químicos (δ) ppm en el espectro RMN- 1H del compuesto [VI]

H	H-1	H-3	H-5	H-7	H-9	H-12
δ (ppm)	0,81	2,18	1,06	1,50	1,04	1,47
m	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>m</i>	<i>t</i>	<i>m</i>	<i>m</i>
J (Hz)	18,69					
H	H-13	H-14	H-15	H-17 α, β	H-18	H-20
δ (ppm)	2,64	1,97	2,05	4,74; 4,80	1,18	0,85
m	<i>s</i>	<i>d</i>	<i>m</i>	<i>s</i>	<i>s</i>	<i>s</i>
J (Hz)						
H	H-21 α	H-21 β	H-22	H-23		
δ (ppm)	4,15	4,26	1,91	3,72		
m	<i>m</i>	<i>m</i>	<i>m</i>	<i>t</i>		
J (Hz)	6,01; 5,88	6,4;6,28		5,49;5,89		

Finalmente, para el estudio de espectrometría de masas, en la figura 45 se tiene el cromatograma de masas del compuesto [VI]. En este cromatograma, se puede visualizar un pico con mayor intensidad, que corresponde a un tiempo de retención de 30,33 minutos; por lo tanto, por medio de este resultado, se puede concluir que siendo el último compuesto de la fracción tomada al 30 % de hexano-acetato de etilo, se encontraban puro. Finalmente, en la figura 46 se tiene el espectro de masas del compuesto [VI], donde se encuentran las señales de los fragmentos formados.

7.3.3. Espectros de Masas del compuesto [VI]

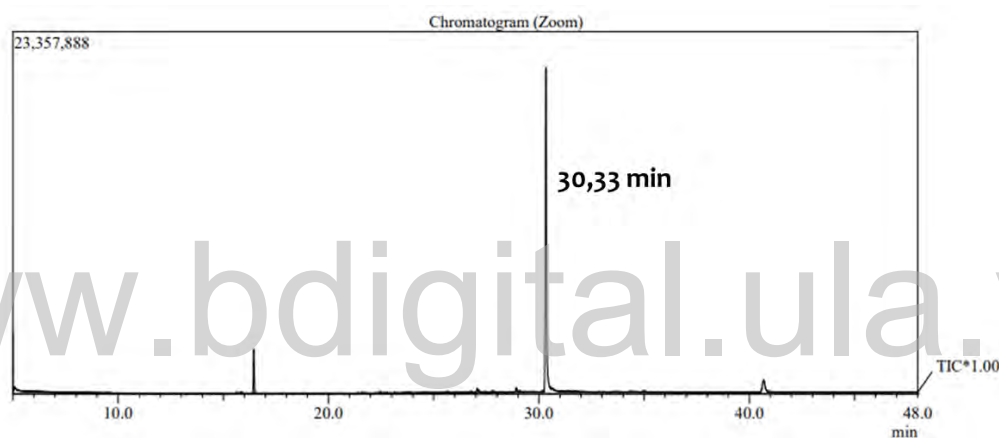


Figura 45. Cromatograma de gases del compuesto [VI]

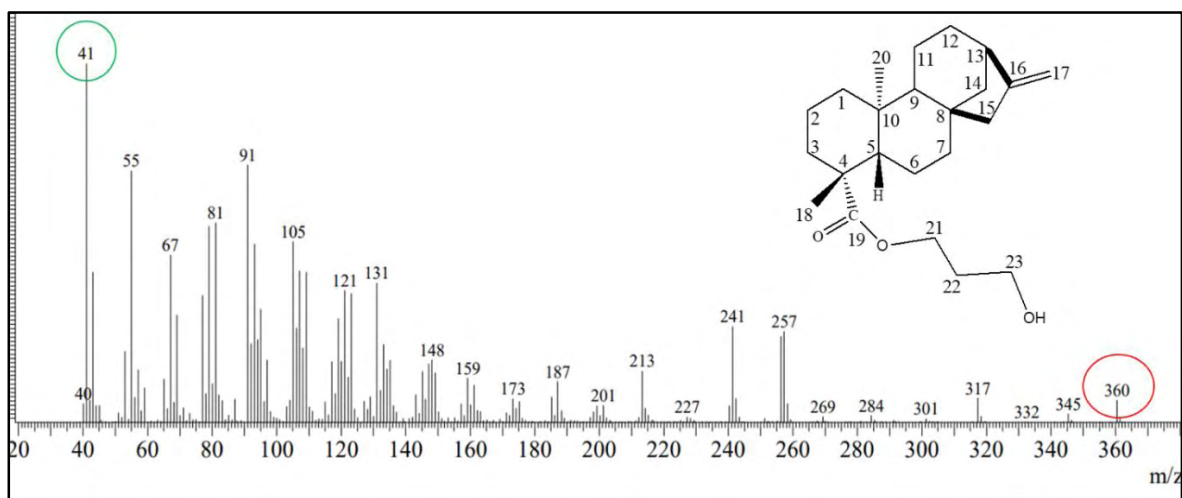


Figura 46. Espectro de masas del compuesto [VI]

En el análisis del espectro de masas del compuesto [VI], se encuentra una señal que corresponde al ion molecular $[C_{23}H_{36}O_3]^+$ y representa una señal de 360 m/z; por consiguiente, esta señal coincide con la masa molecular del compuesto esperado para la segunda reacción del ácido *ent*-kaurénico [1] con el 1,3-propiletilenglicol.

El compuesto [VI] puede sufrir varias fragmentaciones, como primera ruptura se tiene en la posición del metilo que se encuentra el C-20, dando así un fragmento de una señal de 345 m/z que se encuentra en el espectro de masas. La segunda ruptura que puede ocurrir (figura 54), con la pérdida del enlace exocíclico y el ciclo pentano, que se encuentra en la estructura, presentando así una señal de 317 m/z $[C_{20}H_{29}O_3]^+$. Para las demás fragmentaciones, son similares a las del compuesto [III], como el pico de base, que corresponde a la pérdida de una parte adyacente del ciclo donde se encuentra el C-19, dando una señal de 41 m/z.

www.bdigital.ula.ve

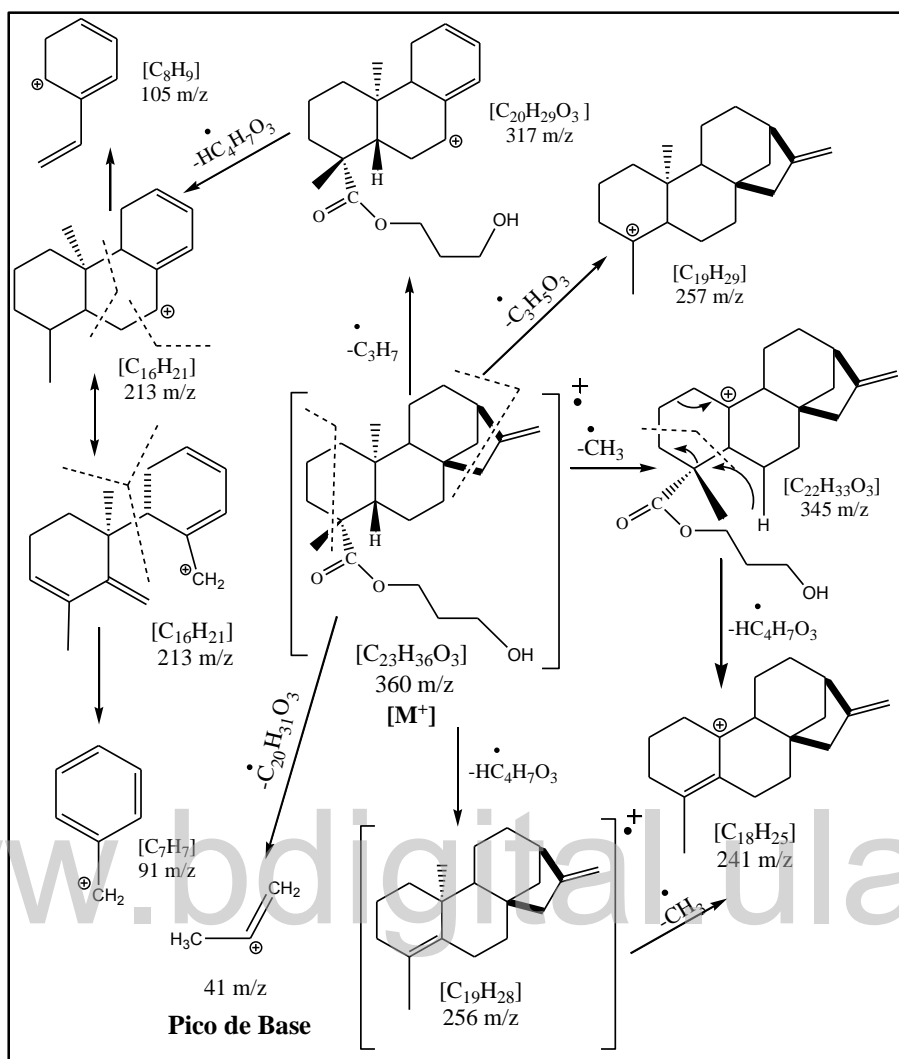
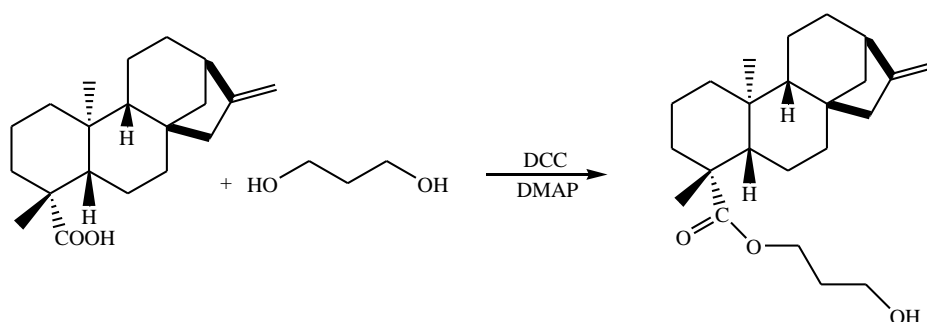


Figura 47. Fragmentación del compuesto [VI]

Finalmente, por medio de los resultados obtenidos tanto en los espectros de infrarrojo IR, RMN-¹H y espectrometría de masas, que pertenecen al compuesto [VI], se concluye que el producto esperado para la segunda hemisíntesis del ácido *ent*-kaurénico [1] junto con el diol 1,3-propilenglicol es el compuesto [VI]. Esto se debe, a que los espectros coincidieron con la información exacta como los grupos funcionales, donde se encontraba el grupo éster, el entorno químico de los protones formados H-21, H-22 y H-23, y además que el ion molecular del espectro de masas coincide con el compuesto [III] que es el 3-hidroxiopropil kaurenato.



Ácido *ent*-kaurénico [1]

3-hidroxiopropil kaurenato [VI]

Figura 48. Reacción de Steglich del ácido *ent*-kaurénico [1] con 1,3-propilenglicol

CONCLUSIONES

- Se logró realizar las hemisíntesis del ácido *ent*-kaurénico [1] con los dioles etilenglicol y el 1,3-propilenglicol por medio de la reacción de esterificación de Steglich.
- A partir de la primera reacción del ácido *ent*-kaurénico [1] con etilenglicol, se obtuvo el compuesto 2-hidroxietil kaurenato [III].
- De la segunda reacción del ácido *ent*-kaurénico [1] con el 1,3-propilenglicol, se obtuvo el compuesto 3-hidroxipropil kaurenato [VI].
- Se caracterizaron todos los compuestos sintetizados por medio de las técnicas instrumentales como lo son la espectroscopia Infrarroja (IR), Resonancia Magnética Nuclear (RMN-¹H-RMN-¹³C) y la Espectrometría de Masas (EM).

www.bdigital.ula.ve

RECOMENDACIONES

- Estandarizar la síntesis de la esterificación de Steglich; además, realizar otras esterificaciones alternas para poder comparar los productos obtenidos de ambas esterificaciones.
- Se sugiere la utilización de otros dioles, para la obtención de nuevos derivados del ácido *ent*-kaurénico [1].
- Se recomienda a próximos estudios realizar los espectros de RMN- ^{13}C y los bidimensionales para el compuesto el 3-hidroxipropil kaurenato [VI].
- Se recomienda el estudio biológico de los compuestos 2-hidroxietil kaurenato [III] y el 3-hidroxipropil kaurenato [VI], ya sea una actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, citotóxica entre otras.

www.bdigital.ula.ve

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdala, L.R. (2000). Flavonoids of *Tagetes stenophylla* Robinson (Asteraceae) as taxonomic markers. *Biochemical Systematics and Ecology*. Vol. 28, 717-718.
- Aparicio, R; Bahsas, A; Usubillaga, A. (2007). Allylic oxidation of *ent*-kaurenic acid *ent*-kaurenic acid methyl ester and *ent*-kaurenol. *Avances en Química*; Vol. 002, 3-8.
- Aparicio, R; Villasmil, T; Peña, A; Rojas, J, Usubillaga, A. (2013). Estudio fitoquímico de las hojas de *Espeletia semiglobulata* Cuatrec. Universidad de Los Andes. *Revista de la Facultad de Farmacia*; Vol. 55, 2-5.
- Avendaño C. (2001). Introducción a la Química Farmacéutica. 2a. Ed. Editorial McGraw- Hill- Interamericana. Madrid, España.
- Azcón, J; Talón, M. (2000). Fundamentos de Fisiología Vegetal. McGraw-Hill- Interamericana. Madrid, España.
- Badillo, M. (1997). Los géneros de las Compositae (Asterácea) de Venezuela. Clave para su determinación. *Ernstia*; Vol. 6, 51-168.
- Braithwalte, A; Smith, F. J. (1996). Chromatographic Methods. 5ta edition, Kluwer Academic Publishers, Universidad en Paisley, Escocia.
- Batista, R; Braga, F; Oliveira, A. (2005). Quantitative determination by HPLC of *ent*-kaurenoic and grandiflorenic acids in aerial parts of *Wedelia paludosa* D.C. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy*; Vol. 15,119-125.
- Batista, R.; Garcia, P; Castro, M; Del Corral, J; Feliciano, A; Oliveira, A. (2007) *iso*-kaurenoic acid from *Wedelia paludosa* D.C. *Journal of the Brazilian Chemical Society*; Vol. 18, 622-627.

- Batista, R; García, P; Castro, M; Miguel del Corral, J; Speziali; Varotti, F; Paula, R; García, L; Franscesch, A; San Feliciano, A; Oliveira, A. (2013). Synthesis, cytotoxicity and antiplasmodial activity of novel *ent*-kaurene derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*; Vol. 62, 168-176.
- Boeck, P; Saa, M; De Souza, B; Cercená, R; Escalante, A; Zachinob, S; Cechinel, V; Yunes, R. (2005). A simple Synthesis of Kaurenoic Esters and other Derivatives and Evaluation of their Antifungal Activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*; Vol.16, 1360-1366.
- Bohlmann, F; Le Van; N. (1978). Neue Kaurensaure-Derivate und Germacranolide aus *Montanoa Pteropoda*. *Phytochemistry*; Vol. 17, 1957-1960.
- Bohlmann, F; Ziesche, J; King, R; Robinson, H. (1981). Eudesmanolides and diterpenes from *Wedelia Trilobata* and an *ent*-kaurenic acid derivative from *Aspilia Parvifolia*. *Phytochemistry*; Vol. 20, 751-756.
- Camps, P; Vásquez S; Escolano, C. (2005). Fundamentos de síntesis de Fármacos. Departamento de Farmacología, Química Terapéutica. Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, España.
- Carrillo, F. (2011). Capítulo I. Síntesis y actividad de derivados de los diterpenos de la serie del *ent*-kaureno. Tesis Doctoral. Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.
- Cordero, Y. (2012) Estudio fitoquímico y farmacológico de *Coespeletia moritziana* (Asteraceae). Tesis Doctoral. Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.
- Cordero, Y; Lucena, M; Arajua, L; Usubillaga, A; Rojas, L; Moujir, L. (2017) Actividad antibacteriana de diterpenos del kaurano aislados de *Coespeletia moritziana* (Sch. Bip.ex Wedd.) Cuatrec. Universidad de los Andes. *Revista de la Facultad de Farmacia*; Vol 59, 03-07.
- Crich, D y Zou, Y. (2003). Catalytic allylic oxidation with a recyclable, fluoroseleninic acid. *Organic Letters*, 6,775-777

- Cuatrecasas, J. (1979). Growth forms of the *Espeletiinae* and their correlation to vegetation types of the high tropical Andes, in *Tropical Botany*, edited by Larsen, K. and L. B Holm-Nielsen. Academic Press, London, UK.
- Cuatrecasas, J. (1986). Speciation and radiation of the *Espeletiinae* in the Andes. En: Vuilleumier, F. y M. Monasterio (Eds). *High Altitude Tropical Biogeography*. 267-303.
- Cuatrecasas, J. (1995). New genus of the Compositae: *Paramiflos* (*Espeletiinae*) from Colombia. *Proceedings of the Biological Society of Washington*; Vol. 108, 748-750.
- Enríquez, R; Escobar, L; Romero, M; Chávez, M; Lozoya, X. (1983). Determination of grandiflorenic acid in organic and aqueous extracts of *Montanoa tomentosa* (Zoapatle) by reversed- phase hih-perfomance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*; Vol. 258, 297-301.
- Francis, M; Grant, P; Low, K; Weavers, R. (1976). Diterpene chemistry-VI-SeO₂/H₂O₂ oxidations of exocyclic olefins. *Tetrahedron*; Vol. 32, 95-101.
- Fahim, A; Mohamed, A; Ibrahim, M. (2021). Experimental and theoretical studies of some propiolate esters derivatives. *Journal of Molecular Structure*; Vol.1236, 130281.
- Fleming. S; Jones, M. (2004). Organic Chemistry. The conversion of acetyl coenzyme a to isopentenyl pyrophosphate. University Temple. Philadelphia, USA.
- Galagovsky, L. (2016). Química Orgánica. Fundamentos Teóricos-Prácticos para el laboratorio. Editorial Universitaria de Buenos Aires, Argentina.
- García, P; Braga, A; Batista, R. (2007). Ocurrence, Biological Activities and Synthesis of Kaurene Diterpenes and their Glycosides. *Molecules*; Vol. 12, 455-483.
- García, A; Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *REDUCA*; Vol. 2, 119-145.
- Ghisalberti EL (1997). The biological activity of naturally occurring kaurene diterpenes. *Fitoterapia*; Vol. 68; 303-325.
- Harris, D. (2003). Análisis Químico Cuantitativo. Tercera edición. Editorial Reverté.México.

Herz, W; Kulanthaivel, P. (1984). *Ent- kauranes and 10 α -methyl-eudesman-8A,12-olides from Wedelia Calycina and Wedelia Hispida*. *Phytochemistry*; Vol. 23, 2271-2275.

Hornback, J. (2006). *Organic Chemistry*, second edition. University of Denver, USA.

Hueso-Falcón I; Girón, N; Velasco, P; Amaro, Luis; M, Ravelo; A. De Lahera S, B; Hortelano S; and Estevez-Braun, A. (2010). Synthesis and induction of apoptosis signaling of *ent*-kaurane derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*; Vol. 18, 1724-1735.

Hueso-Falcón, I; Cuadrado, I; Cidre, F; Amaro, Luis; Estevez-Braun A; Heras B. and Hortelano, S. (2011). Synthesis and Anti-inflammatory Activity of *ent*-kaurene Derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*; Vol. 46, 1291-1305.

Ibáñez J. (2004). Estudio de la composición del aceite esencial y de la resina en el ciclo vital de la *Espeletia schulzii*, *Coespeletia moritziana*, *Ruilopezia atropurpurea*, y de un híbrido. Trabajo de grado, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

Igarashi, K. (1977). The Koenigs–Knorr Reaction. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. Vol. 34, 243-283.

Jeffrey, C. (2007). *Compositae: Introduction with key to tribes in families and Genera of Vascular Plants*, vol VIII. Flowering Plants, Eudicots, Asterales (J. W. Kadereit and C. Jeffrey, eds.). Springer-Verlag, Berlin, Germany.

Kadereit, J; Jeffrey, C. (2007). *The families and Genera of Vascular Plants. Flowering Plants, Eudicots, Asterales* (J. W. Kadereit and C. Jeffrey, eds.). Springer-Verlag, Berlin-Germany.

Katinas, L; Gutiérrez, D; Grossi, M; and Crisci, J. (2007) Panorama de la familia Asteraceae (Compositae) en la República Argentina. *Boletín de la sociedad Argentina de Botánica*; Vol. 42, 113-129.

Lambert, J; Mazzola, E. (2018). *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. Pearson Education. London, UK.

Laurella, S. (2017). *Resonancia magnética nuclear. Una herramienta para la elucidación de estructuras moleculares*. Universidad Nacional de la Plata. Buenos Aires, Argentina.

- Luteyn, J.L. (2000). Parámos. A Checklist of plant diversity, geographical distribution and botanical literatura, Memoirs of the New York Botanical Garden.
- Lutjen, A; Quirk, M; Barbera, A; Kolonko, E. (2018). Synthesis of (E)-cinnamyl ester derivatives via a greener Steglich esterification. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; Vol. 26, 5291-5298.
- Maldonado, H; Guzmán, E; Márquez, S; Tupayachi, A; Albán, J. (2012). Estudio de sapogeninas esteroidales de especies peruanas del género *Dioscorea*. *Revista de Sociedad de Química Peruana*; Vol. 78, 208-218.
- Marcano, D; Hasegawa, M. (2002). Fitoquímica Orgánica. Universidad Central de Venezuela. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Caracas, Venezuela.
- Mavárez, J. (2019). A Taxonomic Revision of *Espeletia* (Asteraceae). The Venezuelan Radiation. *Harvard papers in Botany*. Vol. 24, 131-244.
- McMurry, J. (2012). Química Orgánica. 8a Edición. México. Química Orgánica de las vías metabólicas. CENGAGE Learning Editores S.A.
- Meccia, G; Quintero, P; Rojas, L; Usubillaga, A; Carmona, J. (2010). Análisis de los ácidos kaurénicos presentes en *Espeletiopsis angustifolia* Cuatrec. de Los Andes venezolanos. *Avances en Química*; Vol. 5, 45-49.
- Mondolis, E; Morán, J; Rojas, F; López, J; Abad, A; Amaro, J; Guerrero, E. (2013). Vasorelaxant effects in aortic rings of eight diterpenoids isolated from three Venezuelan plants. *Revista Brasileira de Farmacognosia*; Vol. 23, 769-775.
- 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.
- Morais, M; Dworakowska, S; Reis, A; Gouveia, L; Matos, C; Bogdal, D; Lukasik, R. (2014). Chemical and biological-based isoprene production: Green metrics. *Catalysis Today*; Vol. 239, 38-43.

- Morarescu, O. (2019). Synthetic transformations of *ent*-kaurenic acid. *Icrrd High Index Research Journal*; Vol. 9021, 9-20.
- Moreno, J. (2002). Aislamiento, caracterización y estudio de algunas reacciones químicas de diterpenos del *ent*-kaurano, presentes en la *Espeletia schultzii wedd.* Tesis Magister. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.
- Neises, B; Steglich, W. (1978). Simple method for the esterification of carboxylic acids, *Angewandte Chemie*; Vol. 17, 522-524.
- Olsen, E. (2016). Métodos ópticos de análisis. Editorial Reverté. México.
- Ordaz, G; D'Armas, H; Yáñez, D; Hernández, J; y Camacho, A. (2009). Metabolitos secundarios, letalidad y actividad antimicrobiana de los extractos de tres corales y tres moluscos marinos de Sucre, Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, Vol. 58, 677-688.
- Peixoto, A; Melo, D; Fernandes, T; Fonseca, Y; Gusevskaya, E; Silva, A; Contreras, R; Reyes, M; Usubillaga, A; Dos Santos, E; Pereira, M; Bayón, J. (2008). Rhodium catalyzed hydroformylation of kaurane derivatives: A route to new diterpenes with potential bioactivity. *Applied Catalysis A: General*; Vol. 340, 212–219.
- Peña, A. (2008). Contribución al estudio de los ácidos kaurénicos aislados de *Coespeletia Moritziana*. Tesis de pregrado. Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela.
- Peña, A; Alarcón, L; Usubillaga, A. (2008). *Ent*-15 α -(3-methoxy-3-methyl-butanoyl)-kaur-16-en-19-oic acid a new *ent*-kaurenic acid derivative isolated from *Coespeletia moritziana* (Sch. Bip. ex. Wedd) Cuatrec. (Asterácea). *Avances en Química*; Vol. 3, 95-97.
- Peña, A; Alarcón, L; Baptista, J; Aparicio, R; Villasmil, T; Usubillaga, A. (2012). A Phytochemical Analysis of *Espeletia nana* Cuatrec. a Midget Espeletiinae from Paramo Ortiz, Venezuela. *Avances en Química*, Vol. 7, 187-192.
- Peña, A. (2012). Contribución al estudio de algunas especies del género, *Espeletia*, aislamiento de nuevos derivados Kaurénicos y ensayos de su actividad. Tesis Doctoral. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

- Peña, A; Alarcón, L; Aparicio, R; Rojas, J; Usubillaga, A. (2014). On the allylic hydroxylation of *ent*-kaurenic acid with SeO₂. *Avances en Química*; Vol. 9, 7-13.
- Peña, A; Usubillaga, A; Alarcón, L; Velasco, J; Aparicio, R. (2015). Obtención de derivados azufrados del ácido kaurénico y de otros kaurenos substituidos en la posición C-15 y su actividad antibacteriana. *Revista de la Facultad de Farmacia*; Vol. 57, 3-8.
- Piozzi, F; Sprio, V; Passannanti, S; Mondelli, R. (1968). Struttura dell'acido grandiflorolico. *Gazzetta Chimica Italiana*; Vol. 98, 907-910.
- Ríos, N. (2017). Hemisíntesis de derivados del ácido grandiflorénico y su posible actividad biológica. Tesis Doctoral. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.
- Ríos, N; Villalobos, D; Rojas, L; Aparicio, R; Usubillaga, A; Mitaine, A. (2017). Actividad antiinflamatoria in vivo del ácido grandiflorénico y ácido kaurénico obtenidos a partir de *Coespeletia moritziana* y *Espeletia semiglobulata*. *Revista de la Facultad de Farmacia*; Vol 59, 17-21.
- Romero, M. (2000). Análisis de los ácidos kaurénicos de varias especies de *Coespeletia* y *Ruilopezia*. Tesis Magister. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.
- Shaabani, A; Soleimani, E; Hossein, A. (2007). A novel approach for the synthesis of aryl amides. *Tetrahedron Letters*; Vol. 48, 6137-6141.
- Serrano, L. (2007). Hidroformilación asimétrica de olefinas con catalizadores de rodio y difosfitos metalamacrocíclicos. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona, España.
- Smith, M. (2002). Organic Synthesis. Second Edition, McGraw-Hill Higher Education. USA.
- Standley, P. (1915). The genus *Espeletia*. *American Journal of Botany*; Vol. 2, 468-486.
- Torrenegra, R; Téllez, A; García, G. (1994). Química de especies del Género *Espeletia killipii* - *Espeletia tunjana*. *Revista colombiana de Química*; Vol. 23, 29-35.
- Usubillaga, A; Morales. (1972). Kaurenic acids in *Espeletia* species. *Phytochemistry*; Vol. 11, 1856-1857.

Usubillaga, A; Capra, MC (1988). Chemical constituents of *Espeletia semiglobulata*. *Fitoterapia*; Vol. 59, 383-384

Usubillaga, A; Romero, M; Aparicio, R (2003). Kaurenic Acid in Espeletiinae. *Acta Hortoculturae*; Vol. 597, 129-130.

Vieira, H; Takahashi, J. A; De Oliveira, A. B; Chiari, E; Boaventura, A. D. (2002). Novel Derivatives of Kaurenoic Acid: Preparation and Evaluation of their Trypanocidal Activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*; Vol. 13, 151-157.

Villasmil, T; Peña, A; Aparicio, R; Usubillaga, A. (2014). Ésteres glicosídicos de algunos derivados del ácido *ent*-kaur-16-eno-19-oico. *Revista Facultad de Farmacia*; Vol. 56, 17-23

Wade, Jr. (2004). Química Orgánica 5ta edición. Editorial Pearson Prentice Hall. España.

Weininger, S; Stermitz, F. (1988). Química Orgánica. Editorial reverté, México.

www.bdigital.ula.ve

APÉNDICE I

DEFINICIONES

- **Antimicrobiano:** es una sustancia que mata o inhibe el crecimiento de microbios, tales como bacterias, hongos, parásitos o virus.
- **Angiospermas:** comúnmente llamadas plantas con flores o plantas florales, son las plantas con semilla cuyas flores tienen verticilos o espirales ordenados de sépalos, pétalos, estambres y carpelos, los carpelos encierran a los óvulos y reciben el polen en su superficie.
- **Bacterias Gram-positivas:** son aquellas bacterias que se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram. Esta característica química está íntimamente ligada a la estructura de la envoltura celular, por lo que refleja un tipo natural de organización bacteriana.
- **Bacterias Gram-negativas:** son aquellas que no se tiñen de azul oscuro o de violeta por la tinción de Gram, y lo hacen de un color rosado tenue: de ahí el nombre de "gramnegativas" o también "Gram-negativas". Esta característica está íntimamente ligada a la estructura didérmica dada por la envoltura celular, pues presenta doble membrana celular (una externa y la otra citoplasmática), lo que refleja un tipo natural de organización bacteriana.
- **Clase:** en biología, la clase es una categoría en la taxonomía, situada entre el filo o división y el orden; sin embargo, es un grupo taxonómico que comprende varios órdenes de plantas o animales con muchos caracteres comunes. En plantas, los nombres de las clases de en llevar el sufijo “-opsida” (Magnoliopsida).
- **Dominio:** en biología, el dominio es una categoría taxonómica utilizada en los sistemas de clasificación biológica, por arriba del reino y el superreino.
- **Enzimas:** son moléculas orgánicas que actúan como catalizadores de reacciones químicas; aceleran la velocidad de reacción. Comúnmente son de naturaleza proteica, pero también de ARN.
- **Especie:** según este concepto, especie es un grupo (o población) natural de individuos que pueden cruzarse entre sí, pero que están aislados reproductivamente de otros grupos afines.
Familia: en biología, la familia es una unidad sistemática y una categoría taxonómica situada entre el orden y el género; o entre la superfamilia y la subfamilia si estuvieran

descritas. Al igual que ocurre con otros niveles (categorías) en la taxonomía de los seres vivos, y debido a la necesidad de destacar determinados rasgos comunes y las relaciones de parentesco, varias familias pueden agruparse en superfamilias, y los constituyentes de una familia pueden dividirse en subfamilias. En botánica la desinencia latina de la familia es -aceae, y en español -áceas (por ejemplo, Asteraceae, asteráceas).

- **Género:** en taxonomía, el género es una categoría taxonómica que se ubica entre la familia y la especie; así, un género es un grupo de organismos que a su vez puede dividirse en varias especies.
- **Orden:** en biología, el orden es la categoría taxonómica entre la clase y la familia.
- **Reino:** en el ámbito de la biología, reino representa cada una de las grandes subdivisiones taxonómicas en las que se clasifican los seres vivos respecto a su parentesco evolutivo.

www.bdigital.ula.ve

www.bdigital.ula.ve