

CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LOS ÁCIDOS KAURÉNICOS AISLADOS A PARTIR DE *Coespeletia moritziana* Sch. Bip. Ex. Wedd. (FRAILEJÓN) Y SU ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

CONTRIBUTION TO THE STUDY OF THE KAURENIC ACID ISOLATED FROM *Coespeletia moritziana* Sch. Bip. Ex. Wedd. (FRAILEJÓN) LEAVES AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY

Recibido: 09-08-2008 / Aceptado: 15-03-2009

Alexis Peña^{1}, Libia Alarcón², Alfredo Usubillaga³, Judith Velasco⁴ y Paulino Delgado⁵*

¹ Programa Ciencias del Agro y del Mar, Universidad Nacional Experimental de los Llanos Occidentales Ezequiel Zamora, San Carlos, Venezuela. *penaalexis@ula.ve* / ² Departamento de Biología y Química, Núcleo Universitario "Rafael Rangel" Universidad de los Andes, Trujillo Venezuela. / ³ Instituto de Investigación, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela. / ⁴ Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela. / ⁵ Laboratorio de Productos naturales. Facultad de Ciencias. Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.

RESUMEN

De las partes aéreas de la *Coespeletia moritziana* Sch.Bip. ex Wedd (Frailejón amarillo), fueron aislados los diterpenos: ácido 15a-hidroxi- ent-kaur-16-en-19-oico [I], ácido 15a-(3-metoxi-3-metilbutanoato)-ent-kaur-16-en-19-oico [II], ácido 15a-acetoxi- ent-kaur-16-en-19-oico [III], ácido ent-kaur-9(11),16-dien-19-oico [IV], ácido ent-kaur-16-en-19-oico [V]. El tratamiento con dimetildioxirano del ácido [II] produjo los derivados a y 16,17 epoxidados [VI]. Todas las estructuras fueron establecidas aplicando métodos espectroscópicos incluyendo estudios uni- y bi-dimensionales de espectroscopia de RMN, IR, Masas, constantes físicas y por comparación con muestras auténticas. La actividad antibacteriana de los compuestos [I], [II], [III], [IV] y [V], fue evaluada frente a cinco cepas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Echerichia coli* (ATCC 25992) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). El ácido ent-kaur-16-en-19-oico [V] y ácido ent-kaur-9(11),16-dien-19-oico [IV] mostraron leve actividad antibacteriana contra cepas Gram positivas, específicamente frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Los valores de CIM fueron de 700 µg/mL y 1600 µg/mL respectivamente, aunque se esperaba

actividad para dichos compuestos las dosis no se corresponden con las reportadas en la bibliografía. Los restantes compuestos no mostraron actividad alguna, por lo que es posible considerar que la sustitución en posición 15 inactiva los derivados kaurénicos como antibacterianos. La evaluación antibacteriana se llevó a cabo empleando el método de difusión en gel.

Palabras clave: *Coespeletia moritziana*, diterpeno, ácido kaurénico, actividad antibacteriana.

SUMMARY

De las partes aéreas de la *Coespeletia moritziana* Sch. Bip. ex Wedd (Frailejón amarillo), fueron aislados los diterpenos: ácido 15a-hidroxi- ent-kaur-16-en-19-oico [I], ácido 15a-(3-metoxi-3-metilbutanoato)-ent-kaur-16-en-19-oico [II], ácido 15a-acetoxi- ent-kaur-16-en-19-oico [III], ácido ent-kaur-9(11),16-dien-19-oico [IV], ácido ent-kaur-16-en-19-oico [V]. El tratamiento con dimetildioxirano del ácido [II] produjo los derivados a y 16,17 epoxidados [VI]. Todas las estructuras fueron establecidas aplicando métodos espectroscópicos incluyendo estudios uni- y bi-dimensionales de espectroscopia de RMN, IR, Masas, constantes físicas y por comparación con muestras auténticas. La actividad antibacteriana de los compuestos [I], [II], [III], [IV] y [V], fue evaluada frente a cinco cepas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Echerichia coli* (ATCC 25992) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). El ácido ent-kaur-16-en-19-oico [V] y ácido ent-kaur-9(11),16-dien-19-oico [IV] mostraron leve actividad antibacteriana contra cepas Gram positivas, específicamente frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Los valores de CIM fueron de 700 µg/mL y 1600 µg/mL respectivamente, aunque se esperaba

structures were established by spectroscopic methods, mainly unidimensional and bidimensional NMR experiments. Anti-bacterial activity of compounds **I, II, III, IV, and V** was assayed against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Escherichia coli* (ATCC 25992), and *Pseudomonas auruginosa* (ATCC 27853). Ent-kaur-16-en-19-oic acid [V] and ent-kaur-9(11),16-dien-19-oic acid [IV] showed slight anti-bacterial activity against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) a Gram positive strain. The CIM values were 700 µg/mL and 1600 µg/mL respectively. Activity was expected for both compounds but the values do not agree with those reported in the literature. The other compounds did not show any activity, which led us to conclude that substitution at C-15 leads to inactivation of kaurene's anti-bacterial properties. The antibacterial evaluation was done by the method of gel diffusion.

Key words: *Coespeletia moritziana*, diterpeno, ácido kaurenico, anti-bacterial activity

INTRODUCCION

En Venezuela los frailejones, plantas resinosas que tienen su habitat en los paramos andinos, contienen cantidades importantes de kaurenos, siendo el ácido kaurenico y el ácido grandiflorenico, los kaurenos más abundantes en la resina de los frailejones que se han estudiado hasta la fecha. Se ha reportado que este ácido tiene una gran variedad de actividades biológicas, dentro de las que destacan la actividad antimicrobiana, los estudios han mostrado que dicha actividad es preferentemente frente a bacterias gram positivas y la dosis oscila entre 5 y 1000 µg/mL, su mecanismo de acción aun no se ha establecido, pero se presumen que actúa a nivel de la membrana plasmática, tampoco se han establecido relaciones estructura actividad Gil et al. (2006); Takahashi et al. (2006); Kuate, (2006), otras actividades reportadas

son la antiparasitaria Batista (2007), antiinflamatoria Veiga Junior, (2007) y anticonvulsivantes Dalo (2007). También se ha encontrado moderado efecto in vitro contra varios tipos de cáncer, como cáncer pulmonar (A-549), sistema nervioso central (XF498), del ovario (SK-OV-3), de la piel (SK-MEL-2) y del colon (HCT15) Ryu et al. (1996). Sosa et al. (1996) han reportado que el ácido kaurénico es efectivo in vivo ante el melanoma murino B16F1 en ratones C57BL/6. Dosis de 1,0 mg/Kg disminuye el crecimiento del tumor primario, reduce el número de metástasis y aumenta la supervivencia de los animales de experimentación. Tomando en consideración que la LD50 en ratones es 439 mg/Kg, el ácido kaurénico ofrece un alto margen de seguridad. Recientemente el laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Farmacia en conjuntos con otros laboratorios interdisciplinarios han estudiado diferentes derivados del ácido kaurénico, encontrando excelentes resultados como la efectividad frente a células epiteliales del carcinoma de próstata humano Ruiz (2007). Actualmente se han obtenido derivados a los cuales no se le han comprobado actividad antibacteriana por lo que el presente trabajo pretende realizar una contribución a las relaciones estructura actividad de los mismos.

PARTE EXPERIMENTAL

Recolección, Secado Y Preparación Del Material Vegetal.

La planta adulta se colectó en el mes de noviembre de 2005, en el pico el Águila localizado en el estado Mérida en la porción nororiental de la Sierra la Culata, en la vía hacia la población de Piñango, a una altitud aproximada de 4126 m. s. n. m. con una masa aproximada de 10 Kg de la planta. La especie fue confirmada como *Coespeletia moritziana* (Sch.Bip. ex Wedd.), por el Ing. Juan Carmona A. Un voucher espécimen, fue depositado en el herbario MERF bajo el N° 21 (herbario de la Facultad de Farmacia y Bionálisis de la Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela). Las partes aéreas de la planta fueron secadas en una estufa a 60 °C por 96 horas. Luego de secado el material vegetal, fue molido en un molino eléctrico de martillo obteniéndose una masa aproximada de 2,5 Kg.

Extracción Del Material Vegetal.

Posteriormente este material se extrajo en columnas con mezcla de solventes hexano: Acetato de etilo al 2 %. El extracto fue concentrado al vacío en un rota vapor a una temperatura no mayor de 50°C. Luego se mantuvo en campana por varios días para asegurar la completa evaporación del solvente y se peso (270,3g).

A dicho extracto se le realizó una extracción ácido base, Luego de disolver el extracto se agito varias veces con una solución de hidróxido de sodio al 10 %, a esta solución resultante se le regeneraron los ácidos con adición de ácido clorhídrico concentrado, posteriormente se realizó una extracción líquido - líquido, usando como fase orgánica una mezcla de solventes de hexano: acetato de etilo al 2 % en acetato de etilo. La solución obtenida fue concentrada en un rota vapor. La masa de extracto obtenida fue de 180 g. Por ultimo el extracto obtenido se pasó por una columna flash de silica gel, corrido de una manera isocrática usando como solvente hexano: acetato de etilo al 2 %, logrando de esta manera un extracto más limpio (120 g).

Separación Cromatográfica De Los Productos.

El extracto se disolvió en acetato de etilo, se le añadió gel de sílice, se homogenizó, luego, se eliminó el solvente en un rota vapor. El gel húmedo se extendió en una bandeja, y se mantuvo a la temperatura ambiente bajo campana, durante 24 horas, hasta que se eliminó por completo el solvente. La mezcla seca se homogenizó en un mortero, quedando de esta forma lista para la cromatografía en columna.

La cabeza se colocó en la parte superior de una columna flash, la cual se preparó de acuerdo a la técnica de Coll y Bowden, (1986). Dicha columna se eluyó con hexano, mezclas de hexano: acetato de etilo, comenzando con 5% hasta 100% de acetato de etilo. Se colectaron fracciones de 1000 mL c/u, las cuales se concentraron al vacío, se analizaron por cromatografía de capa fina y se reunieron adecuadamente. Luego de analizadas las fracciones, se reunieron y se sometieron a posteriores y sucesivas separaciones cromatográficas. De acuerdo a la elusión fueron obtenidos cinco compuestos:

Ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico. $C_{20}H_{30}O_2$. (*ácido kaurénoico*): Sólido cristalino blanco, p.f. 175-178°C, IR, Masas, RMN 1H y ^{13}C idénticos con aquellos de una muestra auténtica.

Ácido *ent*-kaur-9(11), 16-en-19-oico. $C_{20}H_{28}O_2$. (*ácido grandiflorénico*): Sólido cristalino blanco, p.f. 158-160 °C, IR, Masas, RMN 1H y ^{13}C idénticos con aquellos de una muestra auténtica.

Ácido 15a-acetoxi-*ent*-kaur-16-en-19-óico. $C_{22}H_{32}O_4$.: Sólido cristalino blanco, p.f. 170-173 °C, los datos de IR, Masas, RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) y ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz) idénticos a los reportados por Brieskorn and Pöhlman, (1968).

Ácido 15a-(3-metoxi-3-metilbutanoato)-*ent*-kaur-16-en-19-óico. $C_{26}H_{41}O_5$: Sólido cristalino blanco, p.f. 125- 128 °C, los datos de IR, Masas, RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) y ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz) idénticos a los reportados por Peña et al. (2008).

Ácido 15a-hidroxi-*ent*-kaurénico. $C_{20}H_{30}O_3$. (*ácido grandiflorólico*): Sólido cristalino blanco, p.f. 227-228 °C, los datos de IR, Masas, RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) y ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz) idénticos a los reportados por Piozzi et al. (1968).

Síntesis Del Epóxido Ácido 15a-(3-metoxi-3-metilbutanoato)-*ent*-kaur-16-en-19-óico Con Dimetildioxirano.

El derivado epoxidado se obtiene al tratar el ácido 15a-(3-metoxi-metilbutanoato)-*ent*-kaur-16-en-19-oico con dimetildioxirano a temperatura ambiente. La preparación del dimetildioxirano en acetona se realizó en un balón de dos bocas de cuatro litros unido a un sistema cerrado, con agitación constante y capacidad de enfriamiento. Se le adiciona agua destilada (254 mL), acetona (192 mL) y $NaHCO_3$ (58g) y se enfría en un baño de hielo/agua entre 5-10 °C. Este se agita vigorosamente hasta homogenizar y enfriar la mezcla, luego se adiciona el caroate (que es una sal compuesta de $2 KHSO_5.KHSO_4.K_2SO_4$) (120 g, 0,195 mol), en cinco porciones a intervalos de 3 minutos. Después de tres minutos de la última adición, se le aplica un sistema de vacío a fuerza moderada. Luego se retira el baño de hielo /agua y se continúa agitando la mezcla de tal manera que comience la destilación del dimetildioxirano en acetona, se colecta en un balón enfriado a -78 °C Adam et al. (1991).

La reacción se lleva a cabo por una rápida adición de una alícuota de solución enfriada de dimetildioxirano en acetona a una solución del derivado kaurénico en relación de 1:1,5 (disuelto en diclorometano) a temperatura ambiente. Luego de seguir la reacción a través de cromatografía de capa fina se observa la formación de otro producto y la desaparición del reactivo de partida, después se remueve el solvente por simple evaporación, para la posterior caracterización del producto González *et al.* (1996).

Actividad Antibacteriana Del Ácido Kaurenico, Ácido Grandiflorenico Y Sus Derivados Aislados De *Coespeletia moritziana*.

La actividad antimicrobiana se determinó por el método de difusión en agar con discos Rangel *et al.* (2002), modificada en el laboratorio. Se ensayaron los siguientes microorganismos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Echerichia coli* (ATCC 25992) y *Pseudomonas auruginosa* (ATCC 27853).

El ensayo se realizó con un cultivo de 18 horas de cada microorganismo en 2,5 mL de caldo Mueller-Hinton a 37 °C. El inóculo bacteriano se ajustó con solución salina fisiológica al Patrón de Turbidez de Mac Farland N° 0,5 (10^{6-8} ufc/mL). Cada inóculo se diseminó con un hisopo sobre la superficie de una placa que contenía agar Mueller-Hinton y luego se colocó sobre la superficie un disco de papel de filtro (6 mm diámetro) previamente impregnado con 10 µL de la dilución de cada uno de los compuestos que se pretendían estudiar y el control negativo respectivo (DMSO). Además, se colocó el disco estándar del antibiótico de referencia como control positivo para cada uno de los microorganismos. El medio de cultivo inoculado se sometió a preincubación durante 18 horas a 4 °C y luego se incubó a 37 °C durante 24 horas De Los Rios *et al.* (1999). La lectura de los halos de inhibición se realizó a las 24 horas. Para la actividad antibacteriana se midió la zona de inhibición alrededor del disco y éste se expresó en mm. La Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) se determinó solo con las cepas que mostraron zonas de inhibición. Para determinar la CIM se prepararon diluciones de los ácidos con un rango de concentración de 500-1900

µg/mL, concentración que se tomó como referencia de acuerdo a la concentración de las diluciones de cada uno de los compuestos que mostraron actividad, luego se impregnaron los discos de papel de filtro con 10 µL de cada dilución. La CIM fue definida como la concentración más baja capaz de inhibir el crecimiento bacteriano visible NCCLS, (2005). Los ensayos se realizaron por triplicado. Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios "Lic. Luisa Vizcaya". Facultad de Farmacia y Bioanálisis. ULA, Mérida-Venezuela.

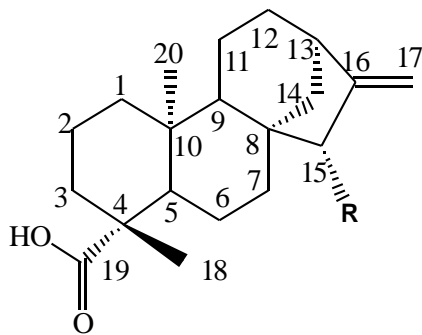
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las partes aéreas de la *Coespeletia moritziana* (figura 1), una vez secada en una estufa y molida, se extrajo hasta agotamiento durante varios días, con mezclas de hexano: acetato de etilo (7:3), a temperatura ambiente. El extracto obtenido fue sometido a diferentes procesos de percolado, luego de concentrado se realizó una extracción ácido base, con una solución de hidróxido de sodio, con lo que se obtuvo las sales de los compuestos ácidos presentes en el extracto, posteriormente se regeneraron los ácidos y se concentró para dar como resultado un extracto de color verde oscuro.

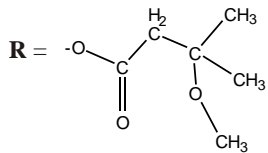
El extracto fue preabsorbido en gel de sílice y posteriormente fue sometido a varios procesos de fraccionamiento y separación, utilizando técnicas cromatográficas. De esta manera se pudieron aislar cinco diterpenoides de la serie del kaurano específicamente derivados del ácido kaurénico cuyas estructuras se representan a continuación (figura 2).



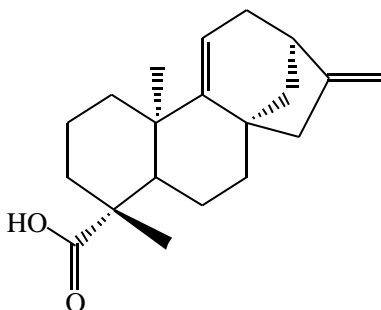
Figura 1. Muestra de las partes aéreas de *Coespeletia moritziana*



- R = - H, Acido *ent*-kaur-16-en-19-oico [V].
 R = - OCOCH₃, Acido 15 -acetoxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico [III]
 R = -OH, Acido 15 -hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico [I]



Ácido 15a-(3-metoxi-3-metilbutanoato)-*ent*-kaur-16-en-19-oico [III]



Ácido *ent*-kaur-9(11),16-dien-19-oico [IV]

Figura 2. Diterpenoides aislados a partir de *Coespeletia moritziana*

Epoxidación del Ácido 15a-(3-metoxi-3-metilbutanoato)-*ent*-kaur-16-en-19-oico.

La presencia del producto epoxidado fue demostrado a través de sus espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C, al comparar estos espectros con los espectros de los compuestos de partida.

Actividad antimicrobiana de los metabolitos obtenidos cromatográficamente.

La actividad antimicrobiana fue ensayada contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. Estos microorganismos son morfológicamente y fisioló-

gicamente diferentes y los resultados obtenidos son representativos de la actividad antibacteriana del ácido kaurénico y sus derivados aislados a partir de *C. moritziana*.

La identificación de los cinco compuestos ácido kaurénico [V], ácido grandiflorenico [IV], ácido 15 - (3-metoxi-3-metilbutanoato)-*ent*-kaur-16-en-19-oico [III], ácido 15 -acetoxi-*ent*-kaurénico [II] y ácido grandiflorolico [I] fue realizada con base a el estudio de sus propiedades físicas y espectros de IR, Masas, RMN-¹H y de RMN-¹³C, aplicando técnicas bidimensionales y comparando con los datos reportados en la literatura.

La tabla N°1 muestra la actividad antimicrobiana de los compuestos mayoritarios presentes en *C. moritziana*, de los cuales solo el ácido kaurénico [V] y el ácido grandiflorenico [IV] mostraron moderada actividad frente a bacterias Gram positivas específicamente *Staphylococcus aureus*, con una CIM de 700 y 1600 µg/mL respectivamente. Resultados anteriores han mostrada que el ácido kaurénico y/o grandiflorenico presentan actividad antibacteriana, sin embargo, las dosis son diferentes, generalmente, requieren dosis menores a los 600 µg/mL Slimestad *et al.* (1995); Ghisalberti *et al.* (1997); Gutierrez *et al.* (1998); De Los Rios *et al.* (1999); Wilkens *et al.* (2002); Zgoda- Pols *et al.* (2002).

Los otros compuestos no han sido previamente estudiados a excepción del ácido 15- -acetoxi-*ent*-kaur-16en-19-oico, el cual mostro debil actividad antibacteriana frente *Staphylococcus aureus* (CIM 31,25 µg/mL) Gaspar *et al.* (2003). La actividad marginal mostrada por las funciones 15-hidroxil o 15-oxi-16-en del ácido kaurénico, muestra que estos sustituyentes afectan la actividad antibacteriana de manera desfavorable Ghisalberti *et al.* (1997).

Es de notar que la actividad antibacteriana del ácido *ent*-kaurénico y grandiflorenico han sido reportada por otros investigadores, sin embargo, las concentraciones minimas inhibitorias (definida como la cantidad mas pequeña de la sustancia requerida para inhibir el desarrollo del microorganismo) oscila entre 10-100 µg/mL, cabe destacar que en la mayoría

de los estudios de actividad antibacteriana el ácido kaurénico muestra mayor efectividad que el ácido grandiflorénico. Del mismo modo se muestra actividad solo para bacterias Gram positivas, por lo que probablemente, este resultado está relacionado con las diferencias en las estructuras químicas de la superficie que existe entre estos dos grupos de bacterias, como son la estructura, composición y permeabilidad de la *pared celular*.

el C-15 no mostraron actividad (no se han reportado estudios similares), posiblemente esta posición sea indispensable que se encuentre libre para la actividad de dichos compuestos. *S. aureus* es el agente etiológico de infecciones nosocomiales en el hombre, con una elevada tasa de resistencia a los antibióticos de origen sintético. En tal sentido, la actividad antibacteriana observada muestra un adelanto para el entendimiento de estos compuestos.

Tabla N° 1. Actividad antibacteriana de los ácidos kaurénicos presentes en *Coespeletia moritziana*.

MICROORGANISMOS	Muestras evaluadas					Zonas de inhibición (mm)					CIM (V) µg/mL	CIM (IV) µg/mL
	V	IV	III	II	I	(discos de 6mm de diámetro)						
						Control positivo: compuestos de referencia						
						AMP-S (10/10 µg)	VA (30 µg)	NET (30 µg)	AZT (30 µg)	CEF (75 µg)		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	13 mm	9 mm	NA	NA	NA	45	-	-	-	-	700	1600
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	NA	NA	NA	NA	NA	-	27	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	NA	NA	NA	NA	NA	-	-	30	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357	NA	NA	NA	NA	NA	-	-	-	46	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	NA	NA	NA	NA	NA	-	-	-	-	34	-	-

CONCLUSIONES

Se demostró que el uso de dimetildioxirano como reactivo oxidante es bastante eficiente, logrando epoxidar el doble enlace con un rendimiento del 95%, sin embargo, la reacción no mostró alta especificidad, ya que se formaron los derivados a y epoxidados del Ácido 15a-(3-metoxi-3-metilbutanoato)-*ent*-kaur-16-en-19-oico [III].

El análisis de actividad antibacteriana, mostró que los compuestos [IV] y [V] fueron activos frente a cepas de bacterias gram positivos (*S. aureus* [ATCC 25923]), como se esperaba por estudios anteriores, mientras que los derivados kaurénicos sustituidos en

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adam, W., Joachim, B., Hadjarapoglou, L. 1991. Convenient preparation of acetone solution of dimethyldioxirane. *Chem. Ber.*, 124, 2377.
- Batista, R., Humberto, J. L., Chiari, E., De Oliveira, A. B. 2007. Synthesis and trypanocidal activity of *ent*-kaurane glycosides. *Bioorg. Med. Chem.*, 15, 1, 381-91.
- Brieskorn, C. H., Pöhlmann, E. 1968. Diterpene vom kaurantyp aus der Compositae *Espeletia schultzii* (Wedd). *Tetrahedron Letters*, (54), 5661-5664.
- Coll, J., Bowden, B., 1986. The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpenes mixtures. *J. Nat. Prod.*, 49, 934-936.
- Dalo, N. L., Sosa-Sequera, M. C., Usubillaga, A. 2007. On the anticonvulsant activity of kaurenic acid. *Invest. Clin.* 48, 3, 349-58.
- De Los Rios, C., Hidalgo, B.D., Contreras, Q., Crescente, O., Caserta, A. 1999. Evaluación fitoquímica y actividad antibacteriana de las inflorescencias de *Espeletia schultzii* (Asteraceae). *Ciencia-Maracaibo*, 7, 72-77.
- Gaspar-Marques, G.C., Simões, M.F., Duarte, A., Rodríguez, B. 2003. Labdane and kaurane diterpenoids from *Plectranthus fruticosus*. *J. Nat. Prod.*, 66, 491-496.
- Ghisalberti, E.L. 1997. The biological activity of naturally occurring kaurane diterpenes. *Fitoterapia*. LXVIII, 4, 303-325.
- Gil, F., De La Iglesia, R., Mendoza, L., Gonzalez, B., Wilkens, M. Soil. 2006. Bacteria are differentially affected by the resin of the medicinal plant *Pseudognaphalium vira vira* and its main component kaurenic acid. *Microb. Ecol.*, 52, 1, 10-8.
- Gutiérrez, S. R., Fuentes, O., Téllez, A. N., Torrenegra, R. 1998. Principios activos antibacterianos de *Espeletia barclayana*. *Rev. Latinoamer. Quím.*, 26(3), 71-74.
- Kuiate, J., Bessièrre, J. M., Zollo, H.P., Kuate, P. S. 2006. Chemical composition and antidermatophytic properties of volatile fractions of hexanic extract from leaves of *Cupressus lusitannica* Mill. from Cameroon. *J. Ethnopharmacol.*, 103, 160-165.
- Peña, A., Alarcón, L., Usubillaga, A. 2008. Ent-15a-(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. (Asteraceae). *Avances en Química*, 3(3), 95-97.
- Piozzi, F., Sprio, V., Passannanti, S. & Mondelli, R. 1968. Estructure of Grandifloric acid. *Gazz. Chim. Ital* 98, 907-910.
- Ruiz, Y., Rodrigues, J., Arvelo, F., Usubillaga, A., Monsalve, M., Diez, N., Galindo-Castro, I. 2007. Cytotoxic and apoptosis-inducing effect of ent-15-oxo-kaur-16-en-19-oic acid, a derivative of grandifloric acid from *Espeletia schultzii*. *Phytochemistry*.
- Ryu, S. Y., Ahn, J. W., Han, Y. N., Han, B. H., Kim, S. H. 1996. In vitro antitumor activity of diterpenes from *Aralia cordata*. *Arch. Pharmacol. Res.*, 19, 77-78.
- Slimestad, R., Marston, A., Mavi, S., Hostettmann, K. 1995. Larvicidal constituents of *Melantheria albinervia*. *Planta Medica*, 61(6), 562-563.
- Sosa, S.M., Sosa, C.B., Usubillaga, A., Escallona, A., Suarez, O., Reyna, R., Pascuzzo, C. Antitumorogenic effect of kaurenic acid on melanoma B16F1. VI World Conference on Clinical Pharmacology and therapeutics, Buenos Aires, August. 1996.
- Takahashi, J. A., Pereira, C. R., Pimenta, L. P., Boaventura, M. A., Silva, L. G. 2006. Antibacterial activity of eight Brazilian annonaceae plants. *Nat. Prod. Res.* 20, 1, 21-6.
- Veiga Junior, V. F., Rosas, E. C., Carvalho, M. V., Henriques, M. G., Pinto, A. C. 2007. Chemical

composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne--a comparative study. *J. Ethnopharmacol.* 112, 2, 248-54.

Wilkins, M., Alarcón, C., Urzúa, A., Mendoza, L. 2002. Characterization of bacterial activity of the natural diterpene kaurenic acid. *Planta Med.*, 68(5), 452-454.

Zgoda- Pols, J., Freyer, A.J., Killmer, L.B., Porter, J.R. 2002. Antimicrobial diterpenes from the stem bark of *Mitrephora celebica*. *Fitoterapia*, 73, 434-438.