

Artículo original

Obtención de derivados azufrados del ácido kaurénico y de otros kaurenos substituidos en la posición C-15 y su actividad antibacteriana.

Obtaining sulfur derivatives to from of kaurenic acid and other kaurenes substituted in position C-15 and its antibacterial activity.

Peña Alexis^{1*}, Usubillaga Alfredo², Alarcón Libia¹, Velasco Judith³, Aparicio Rosa².

¹Nucleo Universitario Rafael Rangel, Universidad de Los Andes, Trujillo. ²Instituto de Investigaciones Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida. ³Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida C.P. 5101, República Bolivariana de Venezuela.

Recibido enero 2014 - Aceptado junio 2014

RESUMEN

Con el objeto de ensayar la posible oxidación del grupo hidroxilo del ácido 15 α -hidroxi-*ent*-kaur-16-eno-19-oico (**2a**), este compuesto se disolvió en DMSO y se sometió a reflujo. En lugar de obtener el derivado deseado se obtuvo un nuevo compuesto. El DMSO había reaccionado con el grupo carboxílico formando un derivado 19-oxo-19-metilen-metil-sulfóxido. En el proceso se había eliminado una molécula de agua. La misma reacción la presentaron el ácido *ent*-kaurénico(**1a**), el ácido 15 α -acetoxi-*ent*-kaur-16-eno-19-oico (**3a**) y el ácido 15-oxo-*ent*-kaur-16-eno-19-oico (**4a**). Estos compuestos no mostraron actividad antibacteriana, determinada por el método de difusión en agar con discos y microdilución en caldo contra bacterias de referencia internacional.

PALABRAS CLAVE

Ácido kaurénico, derivados del ácido kaurénico, DMSO, 19-oxo-19-metilen-metil-sulfóxido, actividad antibacteriana.

ABSTRACT

To test the possible oxidation of the hydroxyl group at 15 α -hydroxy-*ent*-kaur-16-en-19-oic acid (**2a**) it was refluxed with DMSO. Instead of obtaining the desired product a new compound was obtained. DMSO had reacted with the carboxylic acid moiety

yielding a 19-oxo-19-methylen-methyl-sulphoxide derivative. In the process a molecule of water had been eliminated. The same reaction occurred with *ent*-kaurenic acid (**1a**), 15 α -acetoxy-*ent*-kaur-16-en-19-oic acid (**3a**), and 15-oxo-*ent*-kaur-16-en-19-oic acid (**4a**).

KEY WORDS

Kaurenic acid, kaurenic acid derivatives, DMSO, 19-oxo-19-methylen-methyl-derivatives.

INTRODUCCIÓN

El dimetilsulfóxido (DMSO) ha sido utilizado como solvente y como reactivo, específicamente como agente oxidante en la transformación de alcoholes alílicos o bencílicos en sus respectivos aldehídos o cetonas con altos rendimientos [1,2]. El oxígeno nucleofílico puede reaccionar con centros electrofílicos para formar sales de sulfoxonio que pueden ser convertidas en aldehídos o cetonas bajo condiciones neutras. En algunos casos se necesita la activación del DMSO para lo cual se ha utilizado diciclohexilcarbodiimida (DCC), anhídrido acético, o cloruro de oxalilo [1, 2]. Con el objeto de ensayar la posible oxidación del grupo hidroxilo del ácido 15 α -hidroxi-*ent*-kaur-16-eno-19-oico (**2a**), este compuesto se disolvió en DMSO y se sometió a reflujo. En lugar de obtener el derivado deseado se obtuvo un nuevo compuesto. El

*Correspondencia al autor: penaalexis@ula.ve

DMSO había reaccionado con el grupo carboxílico formando un derivado 19-oxo-19-metilén-metil-sulfóxido. Por lo que se procedió a realizar dicha reacción con algunos derivados y se investigó la utilidad de los compuestos obtenidos como agentes antimicrobianos, comparando dos métodos para determinar la actividad biológica.

Es probable que la presencia de un medio débilmente ácido como el grupo carboxílico del ácido *ent*-kaurénico (**1a**), o el de algunos de sus derivados oxigenados **2a**, **3a** y **4a** (Fig. 1), 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.

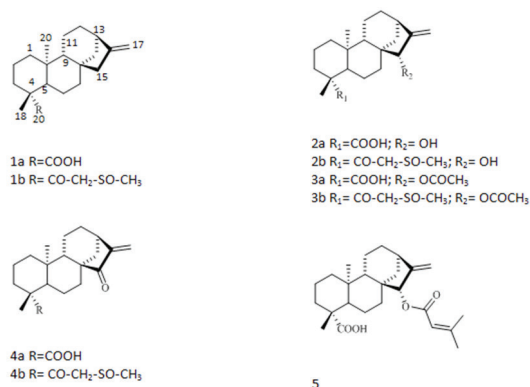


Fig. 1. Ácidos kaurénicos y sus derivados azufrados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Procedimientos Generales. Los puntos de fusión se determinaron en un equipo Fisatom 430 D y no están corregidos. Los espectros IR se midieron en un equipo Shimadzu modelo Affinity como discos de KBr. Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear se realizaron en un espectrómetro Bruker Avance de 400 MHz en soluciones de CDCl₃. Se realizaron experimentos ¹H, ¹³C, DEP, H-H COSY, HMQC y HMBC. Los espectros de masas se midieron en un equipo MSD 5973 de Agilent, equipado con una columna capilar DB-5MS (30 m, 0,25 mm di, film 0.25 μm). El horno se programó desde una temperatura inicial de 250oC hasta una temperatura final de 300 oC con calentamiento de 10oC/min. Como gas portador se usó Helio a razón de 0,9 mL/min. Se inyectó muestras de 1.0 μL, con un

reparto de 1:50. El análisis sobre placa fina se realizó sobre placas de gel de sílice Merck F254. Para la cromatografía flash se utilizó gel de sílice Merck de grado 9385 y para la elusión se usó hexano y AcOEt en mezclas de creciente polaridad.

Obtención del ácido *ent*-kaur-16-eno-19-oico (1a). El ácido kaurénico se obtuvo de las hojas de *Espeletia semiglobulata* según técnica descrita por Rojas y col.[3], pf. 176-178 oC, idéntico a una muestra auténtica (pf, TLC, IR, ¹H-RMN).

Obtención del ácido 15α-hidroxi-*ent*-kaur-16-en 19-oico (2a). Se obtuvo de las hojas de *Espeletia timotensis* [4], pf. 226-228 oC, idéntico a una muestra auténtica (pf, TLC, IR, ¹H-RMN).

Obtención del ácido 15α-acetoxi-*ent*-kaur-16-en 19-oico (3a). Este compuesto se obtuvo mediante acetilación de **2a** (200 mg) con anhídrido acético y piridina. La mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante la noche y al día siguiente se añadió agua helada y se extrajo con tolueno. La fase orgánica se llevó a sequedad varias veces con tolueno para eliminar la piridina. El acetato se cristalizó de etanol, pf. 173-174 oC. El espectro IR mostró bandas de carbonilo a 1700 cm⁻¹ (COOH) y 1735 cm⁻¹ (éster) y el espectro de masas mostró el ión molecular a m/z 360.

Obtención del ácido 15-oxo-*ent*-kaur-16-en 19-oico (4a). Para obtener el derivado 15-oxo-kaurénico (**4a**) se trató 180 mg de **2a** con complejo de ácido crómico/piridina (0.4 g/4.0 mL) durante 24 horas bajo agitación continua a temperatura ambiente [5]. Se extrajo el producto de la reacción con hexano: acetato de etilo (4:1). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se llevó a sequedad en un rotavapor. Se obtuvo un residuo de 168 mg que se purificó sobre una columna de gel de sílice utilizando como eluyente hexano: acetato de etilo 10 %. El producto cristalizó de metanol, pf. 194-197 oC (131 mg). El espectro de masas de **4a** mostró el ión molecular a m/z 316,5 (C₂₀H₂₈O₃). Los datos de **4a** concuerdan con los reportados para el ácido 15-oxo-*ent*-kaur-16-eno-19-oico [6].

Reacción del ácido *ent*-kaur-16-eno-19-oico (1) con DMSO. Se sometió una solución de 100 mg de **1** en 10 mL de DMSO a reflujo durante 2 horas. Transcurrido este tiempo se añadió agua y se agitó con éter dietílico. La fracción etérea se secó sobre Na₂SO₄ y se llevó a seco en un rotavapor. El producto se sometió a cromatografía flash sobre gel de sílice utilizando como solvente hexano. Se recuperó 104 mg de 19-oxo-*ent*-kaur-16-en-19-metilen-metil-sulfóxido (**1b**), pf 94-96oC; IR (cm⁻¹) 3060, 1724,

1132, 758; MS, se observó el ion molecular a m/z 362,5 (C₂₂H₃₄O₂S); ¹H-RMN (Tabla 1); ¹³C-RMN (Tabla 2).

Reacción del ácido 15 α -hidroxi-*ent*-kaur-16-eno-19-oico (2a) con DMSO. Se sometió una solución de 100 mg de **2a** en 10 mL de DMSO a reflujo durante 2 horas. Se extrajo y purificó el producto de la reacción en las mismas condiciones descritas para **1** obteniéndose 92 mg del derivado 15 α -hidroxi-19-oxo-*ent*-kaur-16-en-19-metilén-metil-sulfóxido (**2b**), en forma de una grasa que no fue posible cristalizar, cuyo espectro de masas mostró un ión molecular a m/z 378,5 (C₂₂H₃₄O₃S); IR (cm⁻¹) 3424, 3058, 1724, 1138, 758; ¹H-RMN (Tabla 1); ¹³C-RMN (Tabla 2).

Reacción del ácido 15 α -acetoxi-*ent*-kaur-16-eno-19-oico (3a) con DMSO. Se sometió una solución de 100 mg de **3a** en 10 mL de DMSO a reflujo durante 2 horas. Se extrajo y purificó el producto de la reacción en las mismas condiciones descritas para **1a** obteniéndose 85 mg del derivado 15 α -acetoxi-19-oxo-*ent*-kaur-16-en-19-metilén-metil-sulfóxido (**3b**), pf 61-63 oC; IR (cm⁻¹) 1730, 1240, 938; MS ión molecular m/z 420,6 (C₂₂H₃₆O₄S); ¹H-RMN (Tabla 1); ¹³C-RMN (Tabla 2).

Reacción del ácido 15-oxo-*ent*-kaur-16-eno-19-oico (4a) con DMSO. Se sometió una solución de 100 mg de **4a** en 10 mL de DMSO a reflujo durante 2 horas. Se extrajo y purificó el producto de la reacción en las mismas condiciones descritas para **1a** obteniéndose 105 mg del derivado 15,19-dioxo-*ent*-kaur-16-eno-19-metilén-metil-sulfóxido (**4b**), que cristalizó en hexano, pf 89-92oC; IR (cm⁻¹) 1724, 1676, 1120, 905; MS ión molecular m/z 376,5 (C₂₂H₃₂O₃S); ¹H-RMN (Tabla 1); ¹³C-RMN (Tabla 2).

Intento de reacción del ácido 15 α -O-senecioxi-*ent*-kaur-16-eno-19-oico (5) con DMSO. Se sometió una solución de 100 mg de **5** obtenido de las hojas *Coespeletia moritziana* (7) en 10 mL de DMSO a reflujo durante 2 horas. Se extrajo y purificó el producto de la reacción en las mismas condiciones descritas para **1a**, sin embargo se recuperó únicamente el producto de partida (**5**). Se repitió el experimento pero se obtuvo el mismo resultado.

Evaluación de la actividad antimicrobiana. La actividad antimicrobiana se determinó por dos métodos: el método de difusión en agar con discos, según la metodología descrita por Velasco y col., 2007 [8] y por el método de microdilución en caldo descrito por INEI-ANLIS. Dr. Carlos G. Malbrán 2001 [9], con algunas modificaciones que se describen

a continuación: Las pruebas se realizaron con un cultivo de 18 horas de cada microorganismo en 2,5 mL de caldo Mueller-Hinton (MH) a 37 °C. El inóculo bacteriano se ajustó con solución salina fisiológica al patrón de turbidez de McFarland N° 0,5 (10⁶⁻⁸ ufc/mL). Se emplearon microplacas de 96 pozos, estériles de fondo redondo, cada pozo contenía: 90 μ L de caldo MH, se agregaron 5 μ L del inóculo en cada pozo, para una concentración final bacteriana de aproximadamente 5 x 10⁵ ufc/mL, se adicionó 5 μ L del compuesto a evaluar disuelto en DMSO a una concentración de 2000 μ g/mL, para un volumen final de 1 mL. En cada prueba se incluyó un pozo de control de crecimiento (MH + inóculo - sin antibiótico), un control negativo (caldo MH sin inocular), un control negativo (caldo MH + inóculo + DMSO) y un control positivo con ciprofloxacina (256 μ g/mL) para *P. aeruginosa* y kanamicina (256 μ g/mL) para el resto de las bacterias. Las microplacas inoculadas se incubaron durante 20 horas a 37 °C, posteriormente se sembraron 2 μ L de cada pozo en agar MH, el cual se incubó durante 24 horas a 37 °C.

Los resultados se interpretaron de la siguiente manera: no activo en el agar MH donde se observó desarrollo bacteriano y activo en aquel medio que no se observó crecimiento. En el último caso, se procedió a determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM), mediante diluciones del compuesto con DMSO en un rango de concentración del compuesto de 5 - 2000 μ g/mL, repitiéndose los pasos anteriores. La CIM se definió como la concentración más baja del compuesto capaz de inhibir el desarrollo bacteriano [10]. Los ensayos microbiológicos se realizaron por duplicado frente a los siguientes microorganismos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella Typhi* (CDC 57) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El tratamiento del ácido 15- α -hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico (**2a**) con DMSO en lugar de conducir a la oxidación del grupo hidroxilo produjo la formación de un nuevo compuesto. Se plantea el siguiente mecanismo para explicar la reacción ocurrida en la formación de este nuevo compuesto: La presencia del ácido carboxílico del diterpeno activa la transformación de la molécula de DMSO y conduce a la formación de un iluro de azufre que actúa como nucleófilo atacando

al átomo de carbono del grupo carboxílico, esto da lugar a la pérdida de una molécula de agua y a la formación de un enlace entre el carbonilo del grupo ácido y un metileno unido al azufre. El mecanismo propuesto se presenta en la Fig. 2.

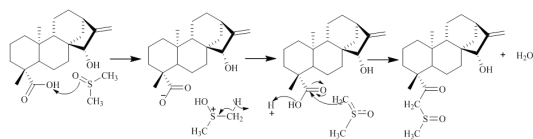


Fig. 2. Mecanismo propuesto para los derivados obtenidos por reacción con DMSO.

La reacción de **2a** con DMSO produjo como producto una grasa que fue imposible cristalizar. En caso de que se hubiera formado el derivado 15-oxo, que era el producto de oxidación esperado, se hubiera obtenido un producto cristalino con punto de fusión 194-197°C (**4a**). El espectro IR del nuevo producto (**2b**, Fig. 2) mostró bandas muy intensas a 1138 cm^{-1} y 756 cm^{-1} que correspondían a las vibraciones de tensión de grupos S=O y S-H respectivamente. El espectro de masas confirmó que se había formado un derivado azufrado cuya masa molecular de 378,2 permitió calcular una estructura molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_3\text{S}$.

En el espectro de resonancia protónica (Tabla 1) se observan las señales correspondientes al núcleo kaurénico. Cabe destacar la presencia de señales a δ 3,79 (H-15) así como de dos picos a δ 5,08 y δ 5,16, que son las señales características del grupo metileno exocíclico de los kaurenos que poseen un hidroxilo como substituyente en C-15. Superpuesto a las señales del metileno exocíclico se observó un cuarteto AB que se asignó al grupo metilénico que enlaza el carbonilo C-19 con el átomo de azufre, cuyos protones no son magnéticamente equivalentes. A δ 2,25 se observó un singulete que corresponde al grupo metilo terminal unido al átomo de azufre.

En el espectro RMN- ^{13}C además de las señales de C-13 características de **2a**, se observó la presencia de señales a 177,2 ppm, que corresponde al grupo carbonilo en C-19 y una señal a 68,0 ppm que corresponde a un metileno (C-21) desapantallado por la presencia de los grupos C=O y S=O vecinos. El espectro HMQC permitió asignar todos los protones a sus correspondientes carbonos y el espectro HMBC permitió correlacionar por ejemplo el carbonilo C-19 a tres enlaces con los protones del metilo C-18, así como el carbono C-21 con los protones del metilo C-22, ambos enlazados al átomo de azufre. En base a este análisis se estableció que **2b** era el 15 α -hidroxi-19-oxo-*ent*-kaur-16-eno-19-metilen-

metil-sulfóxido.

El ácido kaurénico (**1a**) disuelto en DMSO, sometido a reflujo durante 2 horas condujo a la formación de un producto que cristalizó (pf 92-94 °C). Un análisis de los espectros IR, Masas, así como experimentos uni- y bi-dimensionales de RMN de este producto permitió asignarle la estructura 19-oxo-*ent*-kaur-16-eno-19-metilen-metil-sulfóxido (**1b**, Fig. 1). De manera similar el ácido 15 α -acetoxi-*ent*-kaur-16-eno-19-oico (**3a**) al reaccionar con DMSO produjo el compuesto, 15 α -acetoxi-*ent*-kaur-16-eno-19-metilen-metil-sulfóxido (**3b**, Fig. 1) y el ácido 15-oxo-*ent*-kaur-16-eno-19-oico (**4a**) formó el compuesto 15-oxo-*ent*-kaur-16-eno-19-metilen-metil-sulfóxido (**4b**, Fig.1), cuyos espectros de resonancia se encuentran en las Tablas 1 y 2.

Tal como se ha mencionado en la parte experimental al tratar de obtener un derivado azufrado sometiendo a reflujo con DMSO el ácido 15 α -O-senecioxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico (**5**), no ocurrió la reacción y se recuperó el producto de partida. El ácido senecioxico ($\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$) es una molécula mucho más voluminosa que el grupo hidroxilo o el grupo acetato y se llegó a la conclusión de que el impedimento estérico no permitía que el sulfóxido actuara sobre el grupo carboxílico en C-19.

TABLA 1

Desplazamientos químicos protónicos (δ) de 19-oxo-*ent*-kaur-16-eno-19-metilen-metil-sulfóxido (**1b**), 15 α -hidroxi-19-oxo-*ent*-kaur-16-eno-19-metilen-metil-sulfóxido (**2b**), 15 α -acetoxi-19-oxo-*ent*-kaur-16-eno-19-metilen-metil-sulfóxido (**3b**), 15,19-dioxo-*ent*-kaur-16-en-19-metilen-metil-sulfóxido (**4b**).

Posición	[1b]	[2b]	[3b]	[4b]
1	a 0,81 b 1,88	a 0,80 b 1,88	a 0,79 b 1,83	a 0,82 b 1,77
2	a 1,45 b 1,80	1,42	a 1,45 b 1,79	1,84
3	a 1,02 b 2,20	a 1,02 b 2,17	a 0,98 b 2,20	a 1,04 b 2,21
5	1,08	1,09	1,01	1,17
6	1,85	a 1,79 b 1,95	a 1,76 b 1,87	a 1,77 b 1,85
7	1,51	a 1,36 b 1,80	a 1,24 b 1,67	a 1,35 b 1,70
9	1,05	1,05	1,22	1,20
11	1,58	a 1,52 b 1,58	a 1,50 b 1,59	a 1,47 b 1,65
12	a 1,47 b 1,61	a 1,46 b 1,56	a 1,48 b 1,65	a 1,63 b 1,82
13	2,63 m	2,73 m	2,78	3,04
14	a 1,15 b 1,98	a 1,40 b 1,90	a 1,42 b 1,95	a 1,38 b 2,40
15	2,04	3,79	5,25	-
17	a 4,73 d b 4,79	a 5,06 d b 5,20	5,09	a 5,25 dd b 5,93
18	1,18 s	1,20 s	1,18	1,19
20	0,87 s	0,83 s	0,89 s	0,94 s
21	a 5,09 dd b 5,19 (12 Hz)	a 5,08 dd b 5,20 (12 Hz)	a 5,08 dd b 5,19 (12 Hz)	a 5,09 dd b 5,17 (12 Hz)
22	2,26 s	2,25 s	2,25	2,26
24	-	-	2,10	-

Los desplazamientos químicos se encuentran expresados en ppm (δ)

TABLA 1

Desplazamientos Químicos de C-13 (ppm) de 19-oxo-*ent*-kaur-16-eno-19-metilen-metil-sulfóxido (**1b**), 15 α -hidroxi-19-oxo-*ent*-kaur-16-eno-19-metilén-metil-sulfóxido (**2b**), 15 α -acetoxi-19-oxo-*ent*-kaur-16-eno-19-metilén-metil-sulfóxido (**3b**), 15,19-dioxo-*ent*-kaur-16-eno-19-metilén-metil-sulfóxido (**4b**).

Posición	[1b]	[2b]	[3b]	[4b]
1	40,9	40,8	40,7	40,1
2	19,3	19,3	19,2	19,0
3	38,2	38,1	38,0	38,0
4	44,4	44,3	44,2	44,3
5	57,3	57,2	56,8	56,3
6	22,1	21,2	21,0	20,3
7	41,5	35,4	34,9	36,7
8	44,3	47,9	47,6	52,7
9	55,2	53,4	53,0	51,7
10	39,8	39,9	39,9	40,4
11	18,6	18,4	18,5	18,5
12	33,3	32,7	32,7	33,9
13	44,0	42,4	42,6	38,3
14	39,9	36,3	37,3	38,0
15	49,1	82,8	83,1	210,8
16	156,0	160,4	155,5	149,7
17	103,2	108,4	110,1	114,6
18	29,0	28,9	28,8	31,0
19	177,3	177,2	177,1	177,0
20	15,5	16,2	16,2	16,0
21	68,0	68,0	68,1	68,1
22	15,9	15,9	15,9	15,9
23	-	-	171,2	-
24	-	-	21,4	-

Los desplazamientos químicos se encuentran expresados en ppm

Por otra parte, se determinó la actividad antibacteriana de los compuestos obtenidos por el método de difusión en agar con discos y de microdilución en caldo, encontrándose que los compuestos azufrados no presentaron actividad antibacteriana contra las bacterias Gram positivas y Gram negativas ensayadas, demostrando que la introducción de un grupo sulfóxido sobre el carbono C-19 no mejora la actividad y que las modificaciones no juegan un papel preponderante frente a estos microorganismos.

En cuanto al ácido *ent*-kaur-16-eno-19-oico (**1a**), inhibió el desarrollo de las bacterias Gram positivas ensayadas, variando el valor de la CIM según el método utilizado, por ejemplo la CIM por el método de difusión en agar con discos frente a *S. aureus* fue de 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y por el método de microdilución en caldo de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, así como la actividad de este compuesto contra *E. faecalis* solo se observó por el

método de microdilución en caldo con una CIM de $\leq 750 \mu\text{g}/\text{mL}$. En este sentido, Ramírez y Castaño [11] refieren que el método de microdilución en caldo es más sensible. Por otra parte, la actividad de este compuesto contra bacterias Gram positivas ya ha sido reportada [12, 13].

CONCLUSIONES

Se sintetizaron los derivados sulfóxidos, 19-oxo-*ent*-kaur-16-eno-19-metilen-metil-sulfóxido (**1b**), 15 α -hidroxi-19-oxo-*ent*-kaur-16-eno-19-metilén-metil-sulfóxido (**2b**), 15 α -acetoxi-19-oxo-*ent*-kaur-16-eno-19-metilén-metil-sulfóxido (**3b**), 15,19-dioxo-*ent*-kaur-16-eno-19-metilén-metil-sulfóxido (**4b**), los cuales no han sido reportados en la literatura. Estos compuestos pueden ser punto de partida para nuevas modificaciones que puedan servir para un estudio de relación estructura actividad (REA).

Los derivados sulfóxidos obtenidos en este estudio no mostraron actividad antibacteriana, demostrando que las modificaciones realizadas sobre el C-19 no mejoran la actividad y que las mismas no juegan un papel preponderante frente a estos microorganismos.

La actividad antibacteriana del ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico (**1a**) varió según el método utilizado, mostrando mayor sensibilidad el método de microdilución en caldo, posiblemente debido a la mejor difusión del soluto en el medio.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico, Tecnológico y de las Artes (CDCHTA, Proyecto FA-509-11-08-A), Programa de Apoyo Directo a Grupos de Investigación (ADG) del CDCHTA: Grupo de Investigación de Bacteriología Clínica, Universidad de Los Andes, Mérida – República Bolivariana de Venezuela.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Hudlicky M. Oxidationes in organic chemistry. Washington DC. ACS Monograph 186. 1990. p 433.
- [2] Smith M. Organic synthesis. New York: McGraw-Hill. 1994. p 1499.
- [3] Rojas J, Aparicio R, Villasmil T, Peña A,

Usubillaga A. On the isomerization of *ent*-kaurenic acid. *Nat Prod Commun.* 2011; 6(7): 935-938.

[4] Pérez N. Estudio de los componentes de la *Espeletia timotensis*. [Tesis doctoral] Mérida: Universidad de Los Andes. Facultad de Farmacia; 1972.

[5] Poos G, Arth G, Beyler R, Sarett L. Approaches to the total syntheses of Adrenal steroids. *J Am Chem Soc.* 1953; 75: 422-429.

[6] Ruiz Y, Rodrigues J, Arvelo F, Usubillaga A, Monsalve M, Diez N, Galindo I. Cytotoxic and apoptosis-inducing effect of *ent*-15-oxo-kaur-16-en-19-oic acid, a derivative of grandiflorolic acid from *Espeletia schultzei*. *Phytochemistry.* 1953; 69: 432-438.

[7] Usubillaga A., Romero M, Aparicio R. Kaurenic acid in Espeletiinae. *Acta Hort.* 2003; 597: 129-130.

[8] Velasco J, Rojas J, Salazar P, Rodríguez M, Díaz T, Morales A, Rondón M. Antibacterial activity of the essential oil of *Lippia oreganoides* against multiresistant bacterial strains of nosocomial origin.

Nat Prod Commun. 2007; 2(1): 85-88.

[9] INEI-ANLIS. “Dr. Carlos G. Malbrán”. Manual de procedimientos para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos en bacterias aisladas de humanos. Buenos Aires, Argentina. 2001.

[10] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved Standard—Eleventh Edition. Document M02-A11. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012.

[11] Ramírez L, Castaño D. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia Et Technica.* 2009; 42: 263-268.

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

[13] Slimestad R, Marston A, Mavi S, Hostettmann K. Larvicidal constituents of *Melantheria albinervia*. *Planta Med.* 1995; 61: 562-563.