

Artículo Original / Original Article

# Efecto citotóxico de diterpenos derivados del ácido ent-kaureno aislados de *Coespeletia moritziana* (Sch. Bip. ex Wedd.) Cuatrec.

[Cytotoxic effect of ent-kaurene acid-derived diterpenes isolated from *Coespeletia moritziana* (Sch. Bip. Ex Wedd.) Cuatrec.]

Yndra E. Cordero<sup>1</sup>, María E. Lucena<sup>2</sup>, Liliana M. Araujo<sup>2</sup>, Alfredo Usubillaga<sup>3</sup>, Luis B. Rojas<sup>3†</sup>, Rosa Aparicio<sup>3</sup>, Laila Moujir<sup>4</sup> y Francisco J. Ustáriz<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioanálisis Clínico, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela

<sup>2</sup>Carrera de Laboratorio Clínico, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Chimborazo, Ecuador

<sup>3</sup>Instituto de Investigaciones Dr Alfredo Usubillaga del Hierro, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Venezuela

<sup>4</sup>Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética, Facultad de Farmacia, Universidad de La Laguna, España

<sup>5</sup>Laboratorio de Análisis Instrumental, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

**Reviewed by:**

Juana Chávez  
Universidad Norbert Wiener  
Perú

Mario Simirgiotis  
Universidad Austral  
Chile

**Correspondence:**

María E. Lucena:  
[mlucena@unach.edu.ec](mailto:mlucena@unach.edu.ec)

**Section Biological activity**

Received: 19 December 2020

Accepted: 6 April 2021

Accepted corrected: 1 August 2021

Published: 30 May 2022

**Citation:**

Cordero YE, Lucena ME, Araujo LM, Usubillaga A, Rojas LB, Aparicio R, Moujir L, Ustáriz FJ. Efecto citotóxico de diterpenos derivados del ácido ent-kaureno aislados de *Coespeletia moritziana* (Sch. Bip. ex Wedd.) Cuatrec. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat* 21 (3): 404 - 417 (2022). <https://doi.org/10.37360/blacpma.22.21.3.24>

**Abstract:** The objective of the work was to study the cytotoxic effect of ent-kaurene acid derivatives obtained from *Coespeletia moritziana* (Sch. Bip. Ex Wedd.) Cuatrec., After analysis by GC/MS, IR and NMR. Isolating: kaurenic acid (I), grandifloric acid (II), 15- $\alpha$ -hydroxy kaurenic acid (III), 15  $\alpha$ -acetoxi-kaur 16-en-19-oic acid (IV), Kaurenol (V); and by hemisynthesis: 15,16-epoxy-17-acetoxi-kauran 19-oic acid (VI), 15-oxo-ent-kaur-16-en-19-oic acid (VIII), ester 2,3,4,6 -15-oxo-kaur-16-en-19-oic acid acetyl  $\alpha$ -D-pyranosyl tetra-tetra (VII). Cytotoxicity was tested in human cancer cell lines: uterus (HeLa), lung (A-549), breast (MCF-7), African green monkey kidney non-tumor line (Vero) and human peripheral blood mononuclear cells (CMPS). Compound (I) was active against HeLa, A-549 and Vero. Compounds (II and VIII) showed moderate and good ( $IC_{50} \leq 9 \mu M$ ) cytotoxicity, respectively, against the five cell lines. Compound (V) showed moderate activity against A-549 and compound (VII), slight cytotoxicity against HeLa and A-549. Results that show the cytotoxic specificity of the isolated kaurenes and derivatives of *Coespeletia moritziana* and their therapeutic potential.

**Keywords:** *Coespeletia moritziana*; Asteraceae; Kaurenic acid; 15,16-epoxy-17-acetoxi-kauran 19-oic acid; 15-oxo-ent-kaur-16-en-19-oic acid

**Resumen:** El objetivo del trabajo fue estudiar el efecto citotóxico de derivados del ácido ent-kaureno obtenidos de *Coespeletia moritziana* (Sch. Bip. ex Wedd.) Cuatrec., previo análisis mediante GC/MS, IR y RMN. Aislandose: ácido kaurénico (I), ácido grandiflorénico (II), ácido 15- $\alpha$ -hidroxi kaurénico (III), ácido 15  $\alpha$ -acetoxi-kaur 16-en-19-oico (IV), Kaurenol (V); y por hemisíntesis: ácido 15,16-epoxi-17-acetoxi-kauran 19-oico (VI), ácido 15-oxo-ent-kaur-16-en-19-oico (VIII), éster 2,3,4,6-tetra acetil  $\alpha$ -D-piranosilo del ácido 15-oxo-kaur-16-en-19-oico (VII). La citotoxicidad fue ensayada en líneas celulares cancerosas humanas: útero (HeLa), pulmón (A-549), mama (MCF-7), línea no tumoral de riñón de mono verde africano (Vero) y células mononucleares humanas de sangre periférica (CMPS). El compuesto (I) resultó activo frente a HeLa, A-549 y Vero. Los compuestos (II y VIII), mostraron moderada y buena ( $IC_{50} \leq 9 \mu M$ ) citotoxicidad respectivamente, frente a las cinco líneas celulares. El compuesto (V) presentó moderada actividad frente a A-549 y el (VII), leve citotoxicidad frente a HeLa y A-549. Resultados que evidencian la especificidad citotóxica de los kaurenos aislados y derivados de *Coespeletia moritziana* y su potencial terapéutico.

**Palabras clave:** *Coespeletia moritziana*; Asteraceae; Ácido kaurenico; Ácido 15,16-epoxi-17-acetoxi-kauran 19-oico; Ácido 15-oxo-ent-kaur-16-en-19-oico

## INTRODUCCIÓN

*Coespeletia moritziana* (Sch. Bip. ex Wedd.) Cuatrec., es una planta resinosa perteneciente a la familia Asteraceae que crece por encima de los 2900 m de altitud en la zona andina de Venezuela (Cuatrecasas, 1976). Posee hojas subcoriáceas y rígidas de 20 a 45 cm de largo y 1-2 cm de ancho que poseen un denso indumento amarillo-dorado en ambas superficies. Esta especie presenta flores solitarias y nutantes de color rojo con un diámetro de 4 a 5 cm sobre tallos florales simples y erectos (Aristeguieta, 1964). Los campesinos de la zona la conocen con el nombre de frailejón amarillo y por sus aportes en la medicina tradicional.

*Coespeletia moritziana* (Sch. Bip. ex Wedd.) Cuatrec., pertenece a la subtribu Espeletiinae, la cual está integrada por ocho géneros, distribuidos entre Colombia, Ecuador y Venezuela. Las especies pertenecientes a esta subtribu son conocidas popularmente como frailejones (Cuatrecasas, 1976). Todas presentan como metabolitos secundarios, derivados diterpénicos de tipo kaureno, siendo el ácido kaurénico el principal núcleo encontrado en esta subtribu. Este ácido y sus derivados han sido estudiados ampliamente, mostrando una variedad de propiedades biológicas independientemente del origen de la fuente de obtención. Entre sus propiedades se han descrito: *anti-inflamatoria* (Sosa et al., 2010; Hueso-Falcón et al., 2011; Costa et al., 2015; Zhang et al., 2017; Aimond et al., 2020); *antibacteriana* (Pereira et al., 2012; Villa-Ruano et al., 2013; Costa et al., 2015; Rodrigues et al., 2016; Lock et al., 2016; Muleya et al., 2017; Cordero et al., 2017; Pfeifer et al., 2019; Çiçek, et al., 2020); *antifúngica* (Costa et al., 2015); *antiparasitaria* (Brito et al., 2006; Bustos-Brito et al., 2015; Costa et al., 2020); *hipoglucemiante* (Lock et al., 2016); *antioxidante* (Mendoza et al., 2017); *analgésica* (Montiel-Ruiz et al., 2020); *anti-artrítica* (Hong et al., 2019); *genotóxica* (Dos Santos et al., 2017; Ferreira et al., 2020); *citotóxica* (Cordero et al., 2012; Cuca et al., 2011; Dutra et al., 2014; Vargas et al., 2015; Wu et al., 2017; Guetchueng et al., 2017; Muleya et al., 2017; Da Costa et al., 2018; Pfeifer et al., 2019; Ferreira et al., 2020; Aimond et al., 2020).

Estudios previos realizados a la especie *Coespeletia moritziana* descubren la presencia de derivados del kaurano, *ent-kaur-16-ene*, 19-hidroxi-*ent-kaur-16-eno*, 19-oxo-*ent-kaur-16-ene* y ácido *ent-kaur-16-ene-19-oico* (Bohlmann et al., 1980; Usubillaga y Morales., 1972). Así mismo, los componentes volátiles de la *Coespeletia moritziana*,

también han sido estudiados, revelan la presencia de monoterpenos (Aparicio et al., 2002; Ibañez y Usubillaga, 2006). Entre las actividades biológicas descritas para estos metabolitos se encontró que en experimentos in vivo en ratones, la sal sódica del ácido kaurénico actúa contra el melanoma murino reduciendo el tamaño del tumor, prolongando la sobrevivencia y reduciendo la metástasis (Usubillaga et al., 2003). Por otra parte, Ruiz et al., 2008, encontraron que el ácido 15-oxo-kaur-16-en-19-oico produce apoptosis en las células epiteliales del cáncer de próstata. Además de estos estudios realizados en Venezuela, hay diversos reportes de la actividad citotóxica de estas sustancias frente a varios tipos de líneas celulares, como leucemia (Hui et al., 1989), cáncer de mama, (Fatope et al., 1996), así como cáncer de piel, de ovario y de colon (Ryu et al., 1996).

El interés por la evaluación del potencial biológico de los diterpenos naturales y sus derivados naturales o por síntesis química ha generado continuos e importantes aportes. (Henry et al., 2006), a partir de hojas de *Laetia thammia*, (Flacourtiaceae), lograron aislar ácido kaurénico, ácido *ent-3-β*-hidroxi-kaur-16-eno, 19-oico *ent-kaur-16-en-3α*, 19-diol y ácido 17-hidroxi *ent-kaur-15-en-19-oico*, y estudiar su actividad citotóxica frente varias líneas celulares, tales como: 22Rv1, LNCap (Cáncer de próstata), HT29, HCT116, SW620, SW480 (Cáncer de colon) y MCF-7 (Cáncer de mama), determinando que todos estos compuestos presentaron cierta actividad citotóxica a diferentes concentraciones inhibitorias al 50% (IC<sub>50</sub>) que fluctuaron entre (6 y 50 µg/mL). Sin embargo, dos de estos compuestos, el ácido 3-β-hidroxi *ent-kaur-16-eno-19-oico* con una IC<sub>50</sub> de (12,83 µg/mL) y el ácido 17-hidroxi *ent-kaur-15-en-19-oico* con una IC<sub>50</sub> de (17,63 µg/mL), mostraron ser altamente activos frente la línea celular de cáncer de próstata LNCaP.

Dutra et al., 2014, estudiaron la actividad citotóxica de los diterpenos de la corteza del tallo de *Annona vepretorum* frente células tumorales: B16-F10 (melanoma de ratón), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), HL-60 (leucemia promielocítica humana) y K562 (mielocítica crónica humana). Entre los compuestos estudiados, el *ent-3-β*-hidroxi-kaur-16-en-19-ol fue más activo con mayor efecto citotóxico frente la línea celular K562 (IC<sub>50</sub> de 2,49 µg/mL) y menor efecto frente la línea celular B16-F10 (IC<sub>50</sub> de 21,02 µg/mL). (Zhang et al., 2017), evaluaron el ácido Kaurenoico aislado de la planta *Wedelia prostrata* y 15 derivados de semi-

síntesis frente células tumorales humanas de colon (SW620 y SW480), páncreas (PANC-1 y BxPC-3), estómago (SGC-7901), esófago (Eca-109) y leucemia (K562 y HL-60). Determinando que ácido Kaurenoico fue inactivo frente a las líneas celulares tumorales; sin embargo, los derivados que contienen cetona  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturada presentaron actividad citotóxica. Cinco compuestos con una sustitución en la posición C-4 mostraron ejercer inhibición significativa frente las líneas celulares tumorales descritas, mientras que en el compuesto sin la sustitución en la posición C-4 fue menos activo frente las mismas líneas tumorales. Las células de cáncer de colon SW620 fueron altamente susceptibles a todos los derivados estudiados. Por otra parte, (Wu et al., 2017), aislaron un nuevo ent diterpenoide -kaurane, 11  $\beta$ , 16  $\alpha$  -dihydroxy- ent ácido -kauran-19-oico y ocho análogos conocidos de las partes aéreas de *Wedelia prostrata*. A partir del ácido kaurenoico, se obtuvo siete derivados. Todos los compuestos se evaluaron para determinar su actividad citotóxica in vitro frente las líneas celulares de cáncer: leucemia humana (K562), hígado (HepG - 2) y estómago (SGC - 7901). Solo cuatro derivados del ácido kaurenoico, con 15-ceto y sustituciones en la posición C-19, exhibieron actividades citotóxicas notables frente las líneas celulares tumorales con un valor de  $CI_{50}$  que varió de (0,05 a 3,71  $\mu$ M). Los compuestos con oxima en C-15 mostraron efectos inhibidores moderados. Mientras que, el derivado éster 4-piperdin-1-ilbutílico del ácido 15 - oxokaurenoico, indujo la muerte celular apoptótica típica en las células SW480 del colon.

En vista de la actividad biológica que poseen los kaurenos, se decidió aislar algunas de estas sustancias de la *Coespeletia moritziana* y sintetizar otras para realizar estudios sobre la actividad citotóxica *in vitro* frente ciertas líneas celulares humanas: HeLa (carcinoma epitelial de cuello de útero humano), MCF-7 (adenocarcinoma de mama), A-549 (carcinoma de pulmón humano), la línea celular no tumoral de riñón de mono verde africano (Vero) y al mismo tiempo estudiar la viabilidad celular con células mononucleares humana de sangre periférica (CMPS).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Procedimientos analíticos

#### Cromatografía en columna (CC)

Se utilizó gel de sílice de 60-200 mesh, de la casa Scharlau. Las columnas se desarrollaron utilizando solventes solos o mezclas de solventes de polaridad

creciente hexano-éter dietílico, hexano- acetato de etilo.

#### Cromatografía en capa fina (CCF)

Para la cromatografía en capa fina analítica se utilizaron placas de gel sílice 60 sobre soporte de aluminio de la casa Merck, WF 254 (0,25 mm de espesor). Las placas se desarrollaron con los sistemas eluyentes adecuados y se revelaron rociándolas con reactivo de ácido fosfomolibdico y ácido sulfúrico, después de calentadas en corriente de aire a unos 100°C aproximadamente, por algunos minutos hasta poder visualizar las manchas de color azul oscuro y rojo respectivamente.

#### Infrarrojo (IR)

Para la obtención de los espectros Infrarrojo se utilizó un espectrómetro FT-IR Perkin Elmer, modelo FT-1725X, empleando pastillas de KBr.

#### Resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros de la resonancia magnética nuclear protónica y los experimentos uni y bidimensionales se realizaron en un equipo Bruker-Avance DRX 400, a 400 y 100 MHz, respectivamente. Se utilizaron solventes deuterados ( $CDCl_3$ ,  $C_5ND_6$ ). Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear, Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes.

#### Espectrometría de gases-masas

Se realizó en un equipo Hewlett Packard modelo MSD 5973, provisto de una columna HP-5MS de 30 m de largo, 0,25 mm de diámetro. Como gas portador se utilizó helio a una velocidad de flujo de 0,9 mL/m. Las condiciones utilizadas fueron las siguientes: Temperatura inicial: 250°C, con un incremento de 5°/min hasta 300°C, energía de ionización 70 ev. Algunos compuestos fueron identificados mediante comparación directa con patrones puros existentes en el laboratorio.

#### Punto de fusión

Fue determinado en un instrumento digital Electrothermal con capacidad de 350°C.

#### Aislamiento y obtención de derivados

Se recolectaron 17,2 Kg de *Coespeletia moritziana* en el páramo de Piedras Blancas (Muestra testigo AU-28, Herbario MERF Facultad de Farmacia y Bioanálisis - Universidad de Los Andes, Venezuela). Las hojas se secaron y molieron obteniéndose 4,9 kg

de material vegetal seco y molido que se extrajo a temperatura ambiente con una mezcla de hexano-éter dietílico (4:1) v/v. El extracto etéreo se agitó con una solución (0,5) Molar de hidróxido de sodio ( $\geq 98\%$ ). A la fase acuosa, que contenía los ácidos kaurénicos en forma de sales sódicas, se agregó ácido clorhídrico hasta alcanzar un pH de 3, formándose un precipitado blanco constituido por los ácidos kaurénicos libres, que se filtró y se sometió a cromatografía flash sobre sílica gel con hexano y mezclas de hexano/acetato de etilo, tomándose fracciones de 100 mL. Las distintas fracciones se inspeccionaron por cromatografía sobre capa fina y se reunieron de acuerdo a su perfil cromatográfico, rindiendo una mezcla de dos sustancias, ácido kaurénico (I) puro y el ácido grandiflorénico (II). Se continuó eluyendo la columna con mezclas cada vez más polares de hexano/acetato de etilo, obteniéndose una mezcla, que se trató sobre una nueva columna. La elución de esta columna produjo ácido 15 $\alpha$ -hidroxi kaurénico (III) y el ácido 15 $\alpha$ -acetoxi-kaurénico (IV). El derivado ácido 15,16-epoxi-17-acetoxi-kauran 19-oico (VI) se obtuvo como subproducto de la hidroxilación alílica del ácido kaurénico con dióxido de selenio y peróxido de hidrogeno, según la técnica de (Aparicio *et al.*, 2007), y posterior acetilación del derivado obtenido (ácido 15,16-epoxi-17-hidroxi-kauran 19-oico), con anhídrido acético-piridina. Por otra parte, el derivado ácido 15-oxo-kaur-16-en-19-oico (VIII) se originó por oxidación del ácido 15 $\alpha$ -hidroxi kaurénico (III) con el reactivo de Sarett. La fase etérea del extracto original que había sido sometido a agitación con hidróxido de sodio se concentró e inspeccionó mediante cromatografía en capa fina, evidenciándose la presencia de kaurenol (V), kaurenal y ceras. Se tomó 20 gramos de esta mezcla y se sometió a cromatografía sobre columna de sílica gel, su elución con hexano permitió aislar el kaurenol (V). El éster glucosídico del ácido 15-oxo-kaur-16-en-19-oico (VII) se obtuvo, a partir del ácido 15-oxo-kaur-16-en-19-oico (VIII), utilizando la técnica de (Visbal *et al.*, 2004).

### **Actividad biológica**

#### **Ensayo citotóxico con líneas celulares establecidas**

La actividad citotóxica de los compuestos fue evaluada frente a líneas celulares de carcinomas humanos: de cérvix uterino (HeLa), de mama (MCF-7), de pulmón (A-549) y la línea celular no tumoral de riñón de mono verde africano (Vero). Todas las células fueron cultivadas en monocapa, en medio DMEM (medio de cultivo de Dubelco) suplementado

con un 10% de suero bovino fetal (D-10%) inactivado a 56°C durante 30 minutos (4 mM) de L-glutamina, 0,2 mg/mL de antimicótico (ácido *p*-hidroxi benzoico butil éster) y una mezcla de antibióticos (100  $\mu$ g/mL de penicilina y 100  $\mu$ g/mL de estreptomycin). Los cultivos celulares se incubaron en condiciones estables de temperatura (37°C), con una humedad relativa del 98% y presión parcial de CO<sub>2</sub> del 5%. Se utilizaron placas de 96 pozos de fondo plano que fueron sembradas con las células adherentes (1 $\times$ 10<sup>4</sup> células/pozo) en medio DMEM con suero al 5% e incubadas 24 horas. Seguidamente, el medio fue succionado y sobre 2 $\times$ 10<sup>4</sup> células/pozo se depositaron 200  $\mu$ L de los productos a ensayar a concentraciones de (40, 20, 10, 5, 1 y 0,1)  $\mu$ M, disueltos en el mismo medio.

Como control negativo, se utilizaron pozos carentes de producto y con Dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración equivalente a la máxima utilizada en los cultivos problema, sin que nunca se superara el 0,8 % v/v. Como blanco, solamente se usó medio de cultivo y como control positivo mercaptopurina.

Transcurridas 48 horas de incubación se determinó la tasa de supervivencia celular, para lo cual, se añadió 20  $\mu$ L de solución de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio (MTT) en cada pozo, se incubó durante 3 horas y después de eliminar el medio por aspiración, se añadió 150  $\mu$ L de DMSO para disolver los cristales de formazán formados por las células vivas.

La densidad óptica del color desarrollado se midió en un espectrofotómetro ELISA (Infinite M200, Tecan) a una longitud de onda de 550 nm y los resultados fueron expresados como CI<sub>50</sub> (concentración requerida para reducir el número de células viables al 50%) en  $\mu$ L. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado.

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

suplementado con 5% de suero bovino fetal (SFB) y antibióticos (penicilina - estreptomina, Sigma). Las células fueron resuspendidas en medio hasta lograr una concentración final de  $2 \times 10^6$  cel/mL y 100  $\mu$ L de esta suspensión celular fue colocada en cada pozo de una placa de poliestireno de 96 pozos de fondo plano e incubadas durante 48 horas a 37°C, en atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub>, con las concentraciones de 0,05; 0,5; 5 y 50  $\mu$ g/mL por compuesto estudiado.

Finalizado el período de incubación se determinó la viabilidad celular por el método de exclusión con el colorante trypan blue (Freshney, 1987, Coligan *et al.*, 1995) a una concentración máxima de 170  $\mu$ M. El azul tripán es un colorante vital, soluble en agua, altamente tóxico, que se introduce en el interior de las células que presentan ruptura o daño en la membrana plasmática. Las células que aparecen en el microscopio, de color azul, son consideradas no viables. Sin embargo, las células vivas son capaces de excluir activamente este colorante, y, por tanto, mantienen su color original translúcido o blanco. Se tomaron 100  $\mu$ L de cultivo celular, el cual se colocó en un tubo de tipo eppendorf de 1,5 mL con un volumen equivalente 100  $\mu$ L de solución de azul tripán al 0,4% (Sigma-Aldrich) y se incubaron durante aproximadamente unos 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se tomó una muestra de 10  $\mu$ L de la mezcla y se colocó sobre una cámara de Neubauer, se procedió al recuento de las células vivas (blancas) y muertas (azules) utilizando un microscopio invertido Olympus CKX53.

La concentración inhibitoria de crecimiento 50 (CI<sub>50</sub>) se halló mediante un análisis de regresión lineal (ecuación de la recta:  $y = a + bx$ ). El índice de selectividad se calculó por la relación de CI<sub>50</sub> (células de control)/CI<sub>50</sub> (línea de células tumorales). Un índice de selectividad mayor a 1 indica que la citotoxicidad sobre células tumorales supera a la de las células control, si el índice es menor que uno, indica lo contrario.

## RESULTADOS

La caracterización de los compuestos aislados (I, II, III, IV, V) y de los hemisintetizados (VI, VIII, VII) elucidados a partir de extractos de las hojas de *Coespeletia moritziana* (Sch. Bip. ex Wedd.) Cuatrec., se muestran en la Figura N° 1.

A continuación, se indican los valores espectroscópicos de los compuestos puros aislados de *Coespeletia moritziana* (Sch. Bip. ex Wedd.)

Cuatrec., comparados con patrones auténticos, y los formados a través de hemisíntesis.

### Compuesto I (ácido kaurénico)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) d: 2,63 (1H, *s*, H-13), 2,04 (2H, *d*, H-15), 4,73 (1H, *s*, H-17a), 4,79 (1H, *s*, H-17b), 1,24 (3H, *s*, H-18), 0,95 (3H, *s*, H-20). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) d: 155,8 (C-16), 103 (C-17), 184,9 (C-19), 57,0 (C-5), 55,1 (C-9), 48,9 (C-15), 44,2 (C-8), 43,8 (C-13), 41,3 (C-7), 40,7 (C-1), 39,7 (C-14), 39,7 (C-10), 43,2 (C-4), 37,7 (C-3), 33,1 (C-12), 29,0 (C-18), 21,8 (C-6), 19,1 (C-2), 18,4 (C-11), 15,6 (C-20). EI-MS m/z: 302. IR  $\nu$ /cm<sup>-1</sup>: 2985 (C-H), 1712 (C=O) (KBr).

### Compuesto II (ácido grandiflorénico)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) d: 5,23 (1H, *t*, H-11), 2,76 (1H, *s*, H-13), 2,60 (2H, *d*, H-15), 4,79 (1H, *s*, H-17a), 4,91 (1H, *s*, H-17b), 1,24 (3H, *s*, H-18), 1,02 (3H, *s*, H-20). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) d: 155,8 (C-16), 103 (C-17), 184,9 (C-19), 57,0 (C-5), 155,1 (C-9), 48,9 (C-15), 44,2 (C-8), 43,8 (C-13), 41,3 (C-7), 40,7 (C-1), 39,7 (C-14), 39,7 (C-10), 43,2 (C-4), 37,7 (C-3), 33,1 (C-12), 29,0 (C-18), 21,8 (C-6), 19,1 (C-2), 114,9 (C-11), 15,6 (C-20). EI-MS m/z: 300. IR  $\nu$ /cm<sup>-1</sup>: 2990 (C-H), 1705 (C=O) (KBr).

### Compuesto III (ácido 15-alfa-hidroxi-ent-kaur-16-en-19-oico)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) d: 2,72 (1H, *s*, H-13), 3,79 (1H, *s*, H-15), 5,09-5,19 (2H, *s*, H-17a,b), 1,24 (3H, *s*, H-18), 0,94 (3H, *s*, H-20); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) d: 160,3 (C-16), 108,7 (C-17), 183,2 (C-19), 57 (C-5), 53,3 (C-9), 82,8 (C-15), 47,7 (C-8), 42,2 (C-13), 35,1 (C-7), 40,6 (C-1), 36,2 (C-14), 39,8 (C-10), 43,6 (C-4), 37,6 (C-3), 32,5 (C-12), 28,9 (C-18), 20,9 (C-6), 19,0 (C-2), 18,2 (C-11), 15,8 (C-20); EI-MS m/z: 318; IR  $\nu$ /cm<sup>-1</sup>: 2990 (C-H), 1715 (C=O) (KBr).

### Compuesto IV (ácido 15-alfa-acetoxi-ent-kaur-16-en-19-oico)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) d: 2,78 (1H, *s*, H-13), 5,25 (1H, *s*, H-15), 5,09 (2H, *s*, H-17), 1,22 (3H, *s*, H-18), 0,95 (3H, *s*, H-20), 2,07 (3H, *s*, H-22); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) d: 155,4 (C-16), 110,0 (C-17), 183,7 (C-19), 56,7 (C-5), 52,8 (C-9), 83 (C-15), 47,4 (C-8), 42,4 (C-13), 34,7 (C-7), 40,5 (C-1), 37,1 (C-14), 39,8 (C-10), 43,6 (C-4), 37,6 (C-3), 32,6 (C-12), 28,9 (C-18), 20,7 (C-6), 18,9 (C-2), 18,3 (C-11), 15,8 (C-20), 171,1 (C-21), 21,3 (C-22); EI-MS m/z:

360; IR  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 2990 (C-H), 1733 (C=O), 1699 (C=O) (KBr).

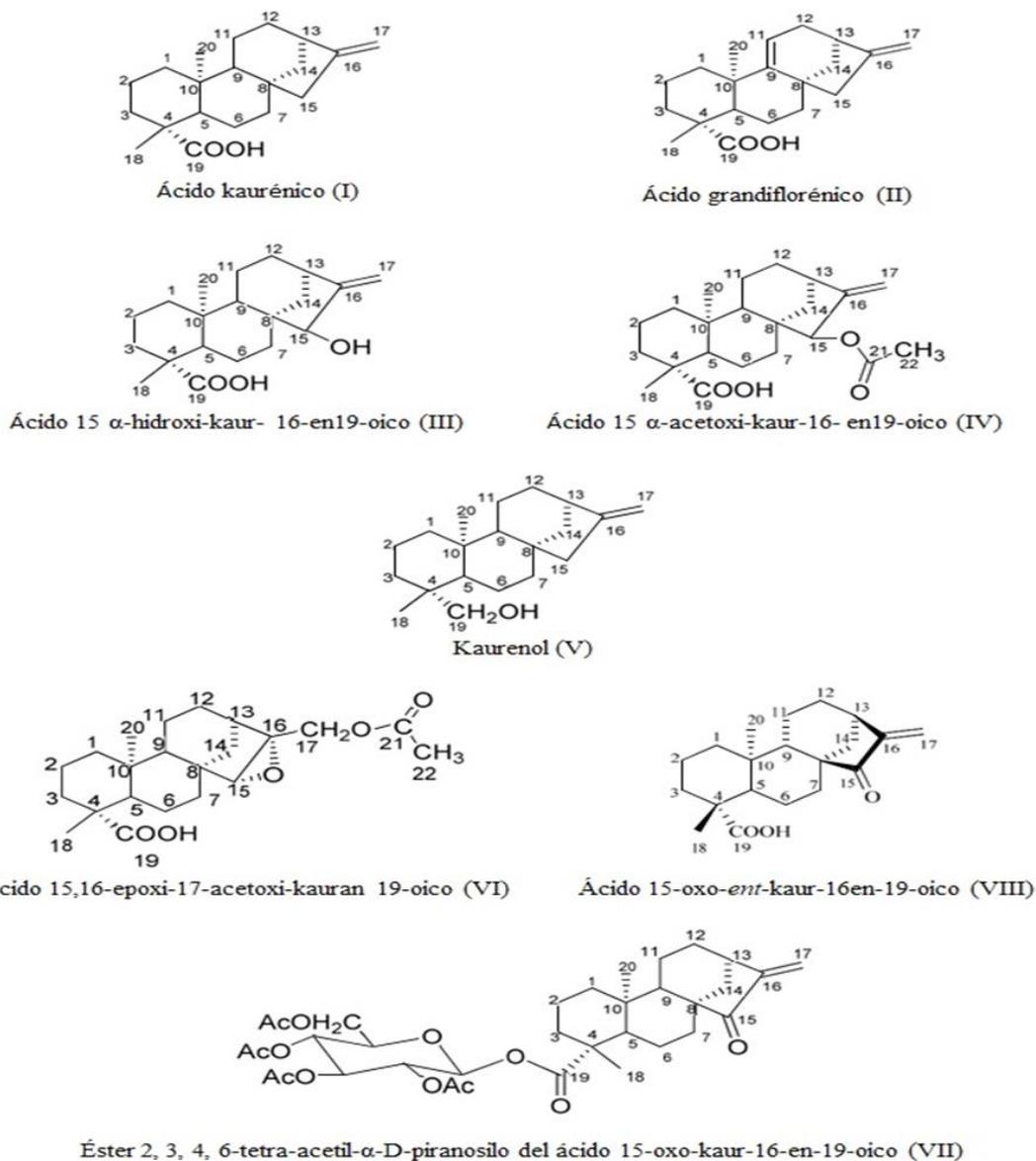


Figura N° 1

Compuestos aislados y hemisintetizados a partir de *Coespeletia moritziana* (Sch. Bip. ex Wedd.) Cuatrec.

**Compuesto V (Kaurenol)**

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 0,76 (2H, *dt*, H-1), 0,89-1,74 (2H, *td*, H-3), 2,63 (1H, *m*, H-13), 2,06 (2H, *m*, H-15), 4,73 (1H, *s*, H-17a), 4,79 (1H, *s*, H-17b), 0,96 (3H, *s*, H-18), 3,44-3,74 (2H, *2d*, H-19a; H-19b), 1,01 (3H, *s*, H-20);  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 155,9 (C-16), 103 (C-17), 65,6 (C-19),

59,9 (C-5), 59,2 (C-9), 49,1 (C-15), 44,2 (C-8), 44,0 (C-13), 41,7 (C-7), 40,5 (C-1), 39,7 (C-14), 39,3 (C-10), 38,7 (C-4), 35,7 (C-3), 33,2 (C-12), 27,1 (C-18), 20,5 (C-6), 18,3 (C-2), 18,2 (C-11), 18,1 (C-20); EI-MS,  $m/z$ : 288; IR  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 3395, (O-H), 2960 (C-H), 1660 (C=C) (KBr).

**Compuesto VI (ácido 15,16-epoxi 17-acetoxi-kauran-19-oico)**

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) d: 2,85 (1H, s, H-15), 4,65-4,68 (1H, d, H-17a), 4,06-4,09 (1H, d, H-17b), 1,24 (3H, s, H-18), 0,92 (3H, s, H-20), 2,09 (3H, s, H-22); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) d: 62,2 (C-16), 62,3 (C-17), 183,8 (C-19), 56,8 (C-5), 49,3 (C-9), 65,2 (C-15), 43,4 (C-8), 35,8 (C-13), 35,7 (C-7), 40,8 (C-1), 37,4 (C-14), 39,6 (C-10), 43,9 (C-4), 32,0 (C-3), 26,5 (C-12), 29,1 (C-18), 20,9 (C-6), 19,1 (C-2), 18,4 (C-11), 15,4 (C-20), 171,1 (C-21), 207,0 (C-22); EI-MS m/z: 376,49; IR n/cm<sup>-1</sup>: 2990 (C-H), 1715 (C=O), 1704 (C=O) (KBr).

**Compuesto VII (Ester 2,3,4,6-tetra acetil α-D-piranosilo del ácido 15-oxo-kaur-16-en-19-oico)**

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) d: 5,74 (1H, d, H-1'), 3,04 (1H, s, H-13), 5,93-5,25 (2H, s, H-17a,b), 1,26 (3H, s, H-18), 0,98 (3H, s, H-20); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) d: 149,5 (C-16), 114,7 (C-17), 175,6 (C-19), 56,3 (C-5), 51,6 (C-9), 210,0 (C-15), 52,6 (C-8), 38,2 (C-13), 33,8 (C-7), 39,9 (C-1), 36,7 (C-14), 40,4 (C-10), 44,2 (C-4), 37,8 (C-3), 32,4 (C-12), 28,9 (C-18), 20,0 (C-6), 19,0 (C-2), 18,5 (C-11), 16,0 (C-20); 91,3 (C-1'), 70,4 (C-2'), 73,2 (C-3'), 68,3 (C-4'), 72,6 (C-5'), 61,8 (C-6'), ≈20,8 (CH<sub>3</sub>COO), ≈170,0 (C=O) EI-MS m/z: 646,72; IR n/cm<sup>-1</sup>: 3440 (C=O), 1724 (C=O), 1690 (C=O), 1644 (C=C) (KBr).

**Compuesto VIII (ácido 15-oxo-ent-kaur-16-en-19-oico)**

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) d: 3,05 (1H, s, H-13), 2,38 (2H, dd, H-14), 5,94-5,25 (2H, s, H-17a,b), 1,26

(3H, s, H-18), 1,06 (3H, s, H-20); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) d: 149,7 (C-16), 114,6 (C-17), 184,1 (C-19), 56,3 (C-5), 51,7 (C-9), 210,8 (C-15), 52,7 (C-8), 38,3 (C-13), 33,8 (C-7), 40,5 (C-1), 36,7 (C-14), 40,1 (C-10), 43,9 (C-4), 36,7 (C-3), 32,3 (C-12), 29,1 (C-18), 20,2 (C-6), 19,0 (C-2), 18,5 (C-11), 15,7 (C-20); EI-MS m/z: 316; IR n/cm<sup>-1</sup>: 3440 (C=O), 1724 (C=O), 1690 (C=O), 1644 (C=C) (KBr).

Las Figuras N° 2 (A-B), muestran los espectros de RMN <sup>1</sup>H y RMN <sup>13</sup>C y las Figuras N° 3 (A-B), los espectros bidimensionales, que permitieron caracterizar del ácido 15,16-epoxi-17-acetoxi-kauran 19-oico (VI), derivado hemisintetizado del ácido *ent*-kaureno aislado de *Coespeletia moritziana* (Sch. Bip. ex Wedd.) Cuatrec., el cual no ha sido reportado como subproducto en ninguna reacción.

Por otra parte, se determinaron características generales del ácido 15, 16-epoxi 17- acetoxi- kauran-19-oico (VI) como: Fórmula molecular C<sub>22</sub>H<sub>32</sub>O<sub>5</sub>, Peso molecular (376,49 g/mol), punto de fusión 187°C, solubilidad (en cloroformo), color (incolore) y olor (inodoro).

La Tabla N° 1 muestra los resultados de las IC<sub>50</sub> de la actividad citotóxica de los compuestos aislados y hemisintetizados a partir de *Coespeletia moritziana* (Sch. Bip. ex Wedd.) Cuatrec., frente líneas celulares tumorales, células Vero y CMPS incorporados en fase inicial de crecimiento celular y cultivadas durante 48 horas.

**Tabla 1**

**Actividad citotóxica de los compuestos de *Coespeletia moritziana* (Sch. Bip. ex Wedd.) Cuatrec., frente a las líneas celulares en estudio**

	Líneas Celulares				
	IC <sub>50</sub> , μM				
Diterpenoides y Control +	HeLa	MCF-7	A-549	Vero	CMPS
(I)	23,03	>40	20,63	23,13	>170
(II)	21,47	36,7	35,3	33,69	62,5
(III)	>40	>40	>40	NE	75,08
(IV)	>40	>40	>40	NE	44,94
(V)	>40	38	28,17	>40	24,02
(VI)	>40	>40	>40	NE	33,78
(VII)	30,2	>40	34,3	NE	61,85
<b>(VIII)</b>	<b>4,65</b>	<b>2,13</b>	<b>8,90</b>	<b>6,23</b>	7,61
Mercaptopurina (Control +)	2,9	47,0	1,4	67,6	NE

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

La Tabla N° 2 muestra los resultados de Correlación de los IC<sub>50</sub> y el Índice de selectividad (IS) de los compuestos la actividad aislados y hemisintetizados a partir de *Coespeletia moritziana* (Sch. Bip. ex Wedd.)

Cuatrec., frente las líneas celulares cancerosas, Vero y CMPS utilizadas en el estudio biológico experimental *in vitro*.

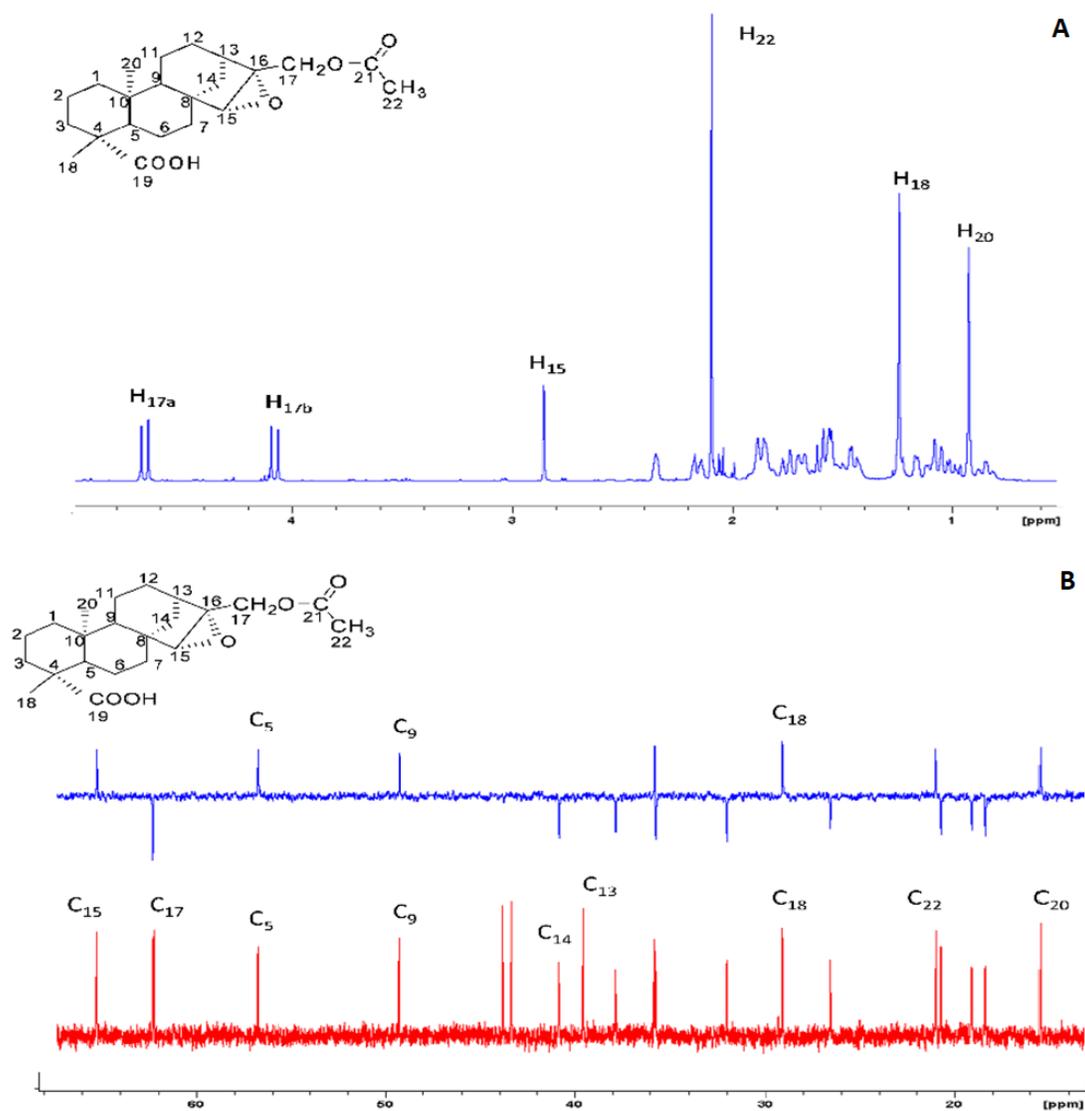
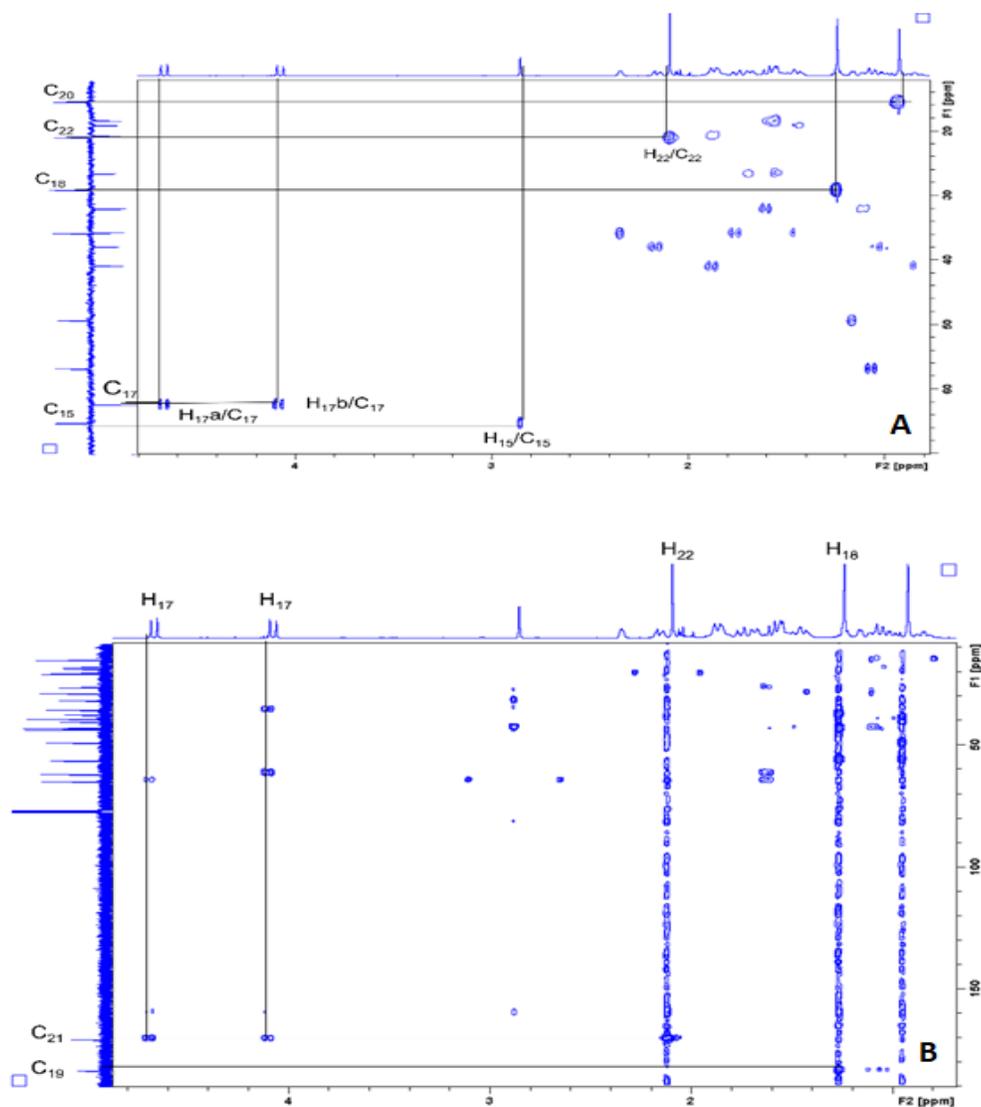


Figura N° 2

Espectros de RMN <sup>1</sup>H y RMN <sup>13</sup>C del ácido 15, 16-epoxi 17- acetoxi- kauran- 19- oico hemisintetizado a partir de *Coespeletia moritziana* (Sch. Bip. ex Wedd.) Cuatrec.



FigurN° 3

Espectros de HMQC y de HMBC ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) del ácido 15, 16-epoxi 17- acetoxi- kauran- 19- oico hemisintetizado a partir de *Coespeletia moritziana* (Sch. Bip. ex Wedd.) Cuatrec

Tabla N° 2

Correlación de los IC<sub>50</sub> y el Índice de selectividad (IS) de los compuestos de *Coespeletia moritziana* (Sch. Bip. ex Wedd.) Cuatrec. frente a las líneas celulares en estudio

Compuestos	Líneas celulares										
	CMPS (µM)	Vero (µM)	MFC-7 (µM)			A-549 (µM)			HeLa (µM)		
	IC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>	IS <sub>CMPS</sub>	IS <sub>Vero</sub>	IC <sub>50</sub>	IS <sub>CMPS</sub>	IS <sub>Vero</sub>	IC <sub>50</sub>	IS <sub>CMPS</sub>	IS <sub>Vero</sub>
<b>I</b>	>170	23,13	>40	NC	NC	20,63	<b>13,28</b>	<b>1,12</b>	23,03	11,89	1,00
<b>II</b>	62,5	33,69	36,7	<b>1,70</b>	0,917	35,3	<b>1,77</b>	0,95	21,47	<b>2,9</b>	<b>1,57</b>
<b>III</b>	75,08	NE	>40	NC	NC	>40	NC	NC	>40	NC	NC
<b>IV</b>	44,94	NE	>40	NC	NC	>40	NC	NC	>40	NC	NC
<b>V</b>	24,02	>40	38	<b>0,632</b>	<b>NC</b>	28,17	0,85	<b>1,41</b>	>40	NC	NC
<b>VI</b>	33,78	NE	>40	NC	NC	>40	NC	NC	>40	NC	NC
<b>VII</b>	61,85	NE	>40	NC	NC	34,3	<b>1,80</b>	NC	30,2	2,05	NC
<b>VIII</b>	7,61	6,23	2,13	NC	<b>2,92</b>	8,90	NC	0,70	4,65	NC	0,75

NE: no estudiadas. NC= no calculada

## DISCUSIÓN

Como puede observarse en la Tabla N° 1, el ácido 15-oxo-ent-kaur-16-en-19-oico (VIII) presentó una IC<sub>50</sub> ≤ 9 µM frente las tres líneas celulares cancerosas estudiadas, pero también sobre la célula no tumoral Vero. (Hueso-Falcón *et al.*, 2011), reportan a este compuesto, pero con su ácido carboxílico metilado, como no tóxico en células no tumorales. Esto indica que el grupo carboxílico libre en la estructura VIII es tóxico para las células no tumorales, por tanto, al metilarlo se evitaría este efecto. El sistema carbonilo α-β insaturado juega un rol importante en la actividad, este grupo actúa como un aceptor de Michael para residuos nucleofílicos, especialmente cisteína y grupos sulfidrilos (Lyss *et al.*, 1998; Picman *et al.*, 1979). Mientras que, el ácido kaurenico (I) resultó ser activo frente las líneas celulares HeLa (23,03 µM), A-549 (20,63 µM) y Vero (23,13 µM) pero no frente las células MCF-7 (>40 µM), corroborando lo descrito por (Morales *et al.*, 2005). Por otra parte, estos resultados coinciden parcialmente con lo descrito por (Cuca *et al.*, 2011), sobre el efecto citotóxico el ácido kaurenico aislado de plantas lauráceas sobre las líneas tumorales HeLa (cáncer cervical), A-549 (cáncer pulmonar), Hep-2 (carcinoma de laringe), PC-3 (adenocarcinoma de próstata) y MCF-7 (carcinoma de mama), determinado que fue activo frente a todas las líneas celulares y presentó efecto letal total frente las líneas celulares PC-3, Hep-2 y A549. Así mismo, (Guetchueng *et al.*, 2017), indicaron que entre los compuestos diterpenicos aislados de los frutos de

*Zanthoxylum leprieurii* Guill. & Perr. (Rutaceae), solo el ácido kaurenico mostró citotoxicidad frente la línea celular humanas de cáncer de próstata (PC3) con un valor de IC<sub>50</sub> de 33,28 ± 9,14 µg/mL. Finalmente, (Ferreira *et al.*, 2020), han reportado que el extracto de *Mikania glomerata* Sprengel enriquecido en ácido kaurenico presentó efecto citotóxico y genotóxico a concentraciones superiores (40,0 µg/mL) en células pulmonares de hámster chino (V79). Mientras que, el ácido kaurenico aislado del extracto mostro solo efecto genotóxico frente las células (V79) a las mismas concentraciones del extracto enriquecido; demostrando que el ácido ent-kaurenico debería ser responsable, al menos en parte, de la genotoxicidad del extracto rico en ácido ent-kaurenico de *Mikania glomerata* Sprengel. Otro compuesto con resultados interesantes resultó ser el ácido grandiflorénico (II) que mostró una moderada actividad citotóxica frente a las cinco líneas celulares estudiadas.

Con respecto al derivado glucosídico (VII), solo se observó una leve actividad frente a HeLa (30,2 µM) y A-549 (34,3 µM). El kaurenol (III) mostró una actividad moderada (IC<sub>50</sub> de 28,17 µM) frente a la línea celular A-549. Por otra parte, las Figura N° 2 (A-B), muestran los espectros de RMN <sup>1</sup>H y RMN <sup>13</sup>C del ácido 15,16-epoxi-17-acetoxi-kauran 19-oico (VI). En la RMN-<sup>1</sup>H se identifica el núcleo del ent-kaurenol. A campo bajo se muestran una señal a δ 2,85 H-15, señal característica de un hidrógeno que se encuentra sobre carbono unido a un heteroátomo, a mediano campo se observan señales

correspondiente a dos hidrógenos desapantallados característicos de carbonos que se encuentran formando un epóxido a  $\delta$  4,65 y 4,06 H-17a,b y a campo alto se observa la presencia de un metilo a  $\delta$  2,09 H-22 característico de un grupo acetoxi, además de los metilos a  $\delta$  1,24 y 0,92 H-18 y H-20 correspondientes al núcleo del ent-kaurano. De igual manera, en el espectro de RMN-<sup>13</sup>C se puede diferenciar a campo bajo la presencia de dos carbonilos  $\delta$  183,8 C-19 y 171,1 C-21, además a mediano campo se observa una señal a  $\delta$  65,2 C-15, correspondiente a un carbono metínico unido a un oxígeno, también se observa la ausencia del doble enlace entre los carbonos C-16 y C-17, debido a la presencia de dos señales a  $\delta$  62,2 C-16 y 62,3 C-17 que por el desplazamiento estos carbonos se encuentran unido a oxígeno, las demás señales se corresponden con el núcleo del ent-kaurano, de esta manera se permite presumir la presencia del ácido. La Figura N° 3 (A-B), muestra los espectros bidimensionales del ácido 15,16-epoxi-17-acetoxi-kauran 19-oico (VI) que permitieron obtener correlaciones de tipo de HMQC y de HMBC respectivamente. En el espectro HMBC se observa la correlación de los protones de C-22 con el carbonilo 21, a dos enlaces y también los protones de C-17 con el carbonilo 21 a tres enlaces, lo cual corrobora la presencia del acetato sobre C-17. Aparte podemos observar la correlación de los protones del C-18 a tres enlaces con el carbonilo 19. Resultados que permitieron caracterizar al ácido 15,16-epoxi-17-acetoxi-kauran 19-oico (VI) obtenido de la hidroxilación alílica del ácido kaurénico con dióxido de selenio y peróxido de hidrógeno y posterior acetilación; como un subproducto no reportado en ninguna reacción. Por otra parte, el ácido 15,16-epoxi-17-acetoxi-kauran 19-oico (VI) mostró baja citotoxicidad frente las líneas celulares cancerosas en estudio.

Los resultados obtenidos, mostraron que el núcleo de los *ent*-kaurenos con sus sustituyentes claves como lo es el grupo ácido en C-19 y la posición del doble enlace entre los C-16 y C-17, son piezas importantes para el mejoramiento de su actividad citotóxica; mientras que, un sustituyente como el hidroxilo en la posición C-15, afecta de manera desfavorable la actividad citotóxica.

La Tabla N° 2 muestra la correlación entre los IC<sub>50</sub> y el índice de selectividad (IS) de los compuestos ensayados frente las líneas celulares tumorales (MCF-7, HeLa, A-549) y no tumorales Vero y (CMSP). Podemos observar que el ácido

kaurénico (I) tiene un IS en células mononucleares de sangre periférica de (13,28  $\mu$ M) en relación células tumorales A-549 y (11,89  $\mu$ M) con respecto a las células tumorales HeLa. Sin embargo, cuando se calcula el IS de para ambas líneas celulares tumorales, pero utilizando a las células normales Vero se observa que el IS disminuye prácticamente 10 veces (A-549 1,12  $\mu$ M y HeLa 1,0  $\mu$ M). Esta diferencia posiblemente se deba a que las células Vero son células manipuladas, en cambio las CMSP son células nuevas extraídas de un paciente sano y directamente utilizadas sin previa manipulación. Es importante señalar que no existe una referencia bibliográfica que establezca un patrón en la selección de las concentraciones a estudiar, sin embargo, se tomó para este ensayo con CMSP un valor máximo de (170  $\mu$ M) para compuestos puros.

Por otro parte, el ácido grandiflorénico (II) presentó un IS superior a uno (1) para las células Vero (1,57) en relación con células tumorales HeLa, mientras que, presentó valores de IS superiores a uno (1) para las CMPS (1,70  $\mu$ M; 1,77  $\mu$ M; 2,9  $\mu$ M) en relación con las líneas MCF-7, A-549, HeLa respectivamente. Así mismo, el ácido 15-oxo-ent-kaur-16-en-19-oico (VIII) presentó un IS superior a uno (1) para las células Vero (2,92  $\mu$ M) en relación con MCF-7. Otro de los compuestos estudiados que presentó un IS superior a uno (1) sobre las CMPS fue el éster 2,3,4,6 tetra acetil  $\alpha$ -D-piranosilo del ácido 15-oxo-kaur-16-en-19-oico (VII), con 1,80  $\mu$ M en relación con la línea celular tumorales (A-549) y de 2,048  $\mu$ M con (HeLa).

## CONCLUSIONES

De los cinco compuestos aislados y evaluados de *Coespeletia moritziana* (Sch. Bip. ex Wedd.) Cuatrec. tres (I, II y V) exhibieron moderada actividad citotóxica frente a todas, dos o una de las líneas celulares cancerosas humanas en estudio. Mientras que, de los tres compuestos obtenidos por hemisíntesis (VI, VII y VIII) solo el ácido 15-oxo-ent-kaur-16-en-19-oico (VIII) exhibió buena actividad citotóxica frente todas las líneas celulares cancerosas; así como, baja toxicidad frente a células mononucleares humanas normales de sangre periférica. No obstante, el compuesto (VI) el cual no ha sido reportado como subproducto en ninguna reacción, resultó ser en menos tóxico de los kaurenos estudiados; resultados que ponen de manifiesto el potencial terapéutico de los Kaurenos de *Coespeletia moritziana* (Sch. Bip. ex Wedd.) Cuatrec., y sus derivados.

**AGRADECIMIENTOS**

Al Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los

Andes. Al programa de apoyo a grupos de investigación del CDCHTA (ADG: Grupo de Productos Naturales y Química Medicinal-ULA).

**REFERENCIAS**

- Aimond A, Calabro K, Audoin C, Olivier E, Dutot M, Buron P, Rat P, Laprévotte O, Prado S, Roulland E, Thomas OP, Genta-Jouve G. 2020. Cytotoxic and anti-inflammatory effects of ent-kaurane derivatives Isolated from the Alpine plant *Sideritis hyssopifolia*. **Molecules** 25: 589. <https://doi.org/10.3390/molecules25030589>
- Aparicio R, Romero M, Rojas LB, Khouri N, Usubillaga A. 2002. Volatile constituents from the leaves of three species of *Coespeletia* from the Venezuelan Andes. **J Essent Oil Res** 14: 37 - 39. <https://doi.org/10.1080/10412905.2002.9699755>
- Aparicio R, Bahsas A, Usubillaga A. 2007. Allylic oxidation of ent-kauronic acid, ent-kauronic acid methyl ester and ent-kauranol. **Avances Quim** 2: 3 - 8.
- Aristeguieta L. **Compositae**. 1964. En: Lasser T. Ed. Flora de Venezuela. Edición Especial del Instituto Botánico, Caracas, Venezuela.
- Bohlmann F, Suding H, Cuatrecasas J, King R, Robinson, H. 1980. Tricyclic sesquiterpenes and further diterpenes from Espeletopsis species. **Phytochemistry** 19: 2399 - 2403. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)91035-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)91035-5)
- Brito S, Crescente O, Fernández A, Coronado A, Rodríguez N. 2006. Eficacia de un ácido kaurénico extraído de la planta venezolana *Wedelia trilobata* (Asterácea) frente *Leishmania* (Viannia) *braziliensis*. **Biomédica** 26: 180 - 187. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v26i1.1511>
- Bustos-Brito C, Sánchez-Castellanos M, Esquivel B, Calderón JS, Calzada F, Yépez-Mulia L, Joseph-Nathan P, Cuevas G, Quijano L. 2015. ent-Kaurene glycosides from *Ageratina cylindrica*. **J Nat Prod** 78: 2580 - 2587. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00488>
- Çiçek, SS, Wenzel-Storjohann A, Girreser U, Tasdemir D. 2020. Biological activities of two major copaiba diterpenoids and their semi-synthetic derivatives. **Rev Bras Farmacogn** 30: 18 - 27. <https://doi.org/10.1007/s43450-020-00002-y>
- Coligan J, Kruisbeek A, Margulies D, Shevach E, Strober W (ed.). 1995. **Current protocols in immunology**, John Wiley & Sons Inc., New York, USA.
- Cordero Y, Corao G, Cova J, Usubillaga A. 2012. Effect of some ent-kauranes on the viability of human peripheral blood mononuclear cells. **Nat Prod Commun** 7: 563 - 564. <https://doi.org/10.1177/1934578X1200700503>
- Cordero Y, Lucena ME, Araujo L, Usubillaga A, Rojas L, Moujir L. 2017. Actividad antibacteriana de diterpenos del kaurano aislados de *Coespeletia moritziana* (Sch. Bip. ex Wedd.) Cuatrec. **Rev Fac Farm** 59: 3 - 7.
- Costa A, Freitas L, Mendiola J, Ibáñez E. 2015. *Copaifera langsdorffii* supercritical fluid extraction: chemical and functional characterization by LC/MS and *in vitro* assays. **J Supercrit Fluids** 100: 86 - 96. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.02.028>
- Costa L, Souza T, Colmanette A, Conceição M, Pereira H, Hollaender G, de Lima L, Kenupp J, Cardoso N, Tame R, Sola R, Guidi L, Ambrósio S. 2020. Schistosomicidal activity of kaurane, labdane and clerodane-type diterpenes obtained by fungal transformation. **Proc Biochem** 98: 34 - 40. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.07.020>
- Cuatrecasas J. 1976. A new sub-tribe in the Heliantheae (Compositae): Espeletiinae. **Phytologia** 35: 43 - 61. <https://doi.org/10.5962/bhl.part.2608>
- Cuca LE, Coy ED, Alarcón MA, Fernández A, Arstizabal FA. 2011. Cytotoxic effect of some natural compounds isolated from Lauraceae plants and synthetic derivatives. **Biomédica** 31: 335 - 343. <https://doi.org/10.1590/S0120-41572011000300006>
- Da Costa RM, Bastos JK, Costa MC, Ferreira MM, Mizuno CS, Caramori GF, Nagurniak GR, Simão MR, Santos RAS, Veneziani RCS, Ambrósio SR, Parreira RLT. 2018. *In vitro* cytotoxicity and structure-activity relationship approaches of ent-kauronic acid derivatives against human breast carcinoma cell line. **Phytochemistry** 156: 214 - 223. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.10.005>
- Dutra LM, Bomfim LM, Rocha SLA, Nepel A, Soares MBP, Barison A, Costa EM, Bezerra DP. 2014. ent-Kaurane diterpenes from the stem bark of *Annona vepretorum* (Annonaceae) and cytotoxic evaluation. **Bioorg Med**

- Chem Lett** 24: 3315 - 3320. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.06.005>
- Fatope MO, Audu OT, Takeda Y, Zeng L, Shi G, Shimada H, McLaughlin JL. 1996. Bioactive ent-kaurene diterpenoids from *Annona senegalensis*. **J Nat Prod** 59: 301 - 303. <https://doi.org/10.1021/np9601566>
- Ferreira NH, Ribeiro AB, Morais MD, Peixoto AM, Bernardino MA, Moreira MR, Soares ACF, Heleno VCG, Veneziani RCS, Tavares DC. 2020. Cytotoxic and genotoxic effects of the ent-kaurenoic acid and ent-kaurenoic acid enriched *Mikania glomerata* extract in V79. **Biofarmasi J Nat Prod Biochem** 18: 1 - 4. <https://doi.org/10.13057/biofar/f180101>
- Freshney R. 1987. **Culture of animal cells: A manual of basic technique**. In Alan R. Liss, Inc., New York, USA.
- Guetchueng ST, Nahar L, Ritchie KJ, Ismail FM, Wansi JD, Evans A, Sarker SD. 2017. Kaurane diterpenes from the fruits of *Zanthoxylum leprieurii* (Rutaceae). **Rec Nat Prod** 11: 304 - 309.
- Hansel T, De Vries I, Iff T, Rihs S, Wandzilak M, Betz S, Blaser K, Walker C. 1991. An improved immunomagnetic procedure for the isolation of highly purified human blood eosinophils. **J Immunol Methods** 145: 105 - 110. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(91\)90315-7](https://doi.org/10.1016/0022-1759(91)90315-7)
- Henry GE, Adams LS, Rosales JC, Jacobs H, Heber D, Seeram NP. 2006. Kaurane diterpenes from *Laetia thamnia* inhibit the growth of human cancer cells *in vitro*. **Cancer Lett** 244: 190 - 194. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.12.022>
- Hong R, Soo KS, Choi GM, Yeom M, Lee B, Lee S, Kang KS, Lee HS, Park HJ, Hahm DH. 2019. Continentalic acid rather than kaurenoic acid is responsible for the anti-arthritic activity of Manchurian spikenard *in vitro* and *in vivo*. **Int J Mol Sci** 20: 5488. <https://doi.org/10.3390/ijms20215488>
- Hueso-Falcón I, Cuadrado I, Cidre F, Amaro-Luis JM, Ravelo AG, Estévez-Braun A, de las Heras B, Hortelano S. 2011. Synthesis and anti-inflammatory activity of the ent-kaurene derivatives. **Eur J Med Chem** 46: 1291 - 1305. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.01.052>
- Hui YH, Rupprecht JK, Liu YM, Anderson JE, Smith DL, Chang CJ, McLaughlin JL. 1989. Bullatacin and Bullatacinone: two highly potent bioactive acetogenins from *Annona bullata*. **J Nat Prod** 52: 463 - 477. <https://doi.org/10.1021/np50063a002>
- Ibañez J, Usubillaga A. 2006. Analysis of the essential oil of two different altitudinal populations of *Coespeletia moritziana* (Sch. Bip. ex Wedd) Cuatrec. **Flavour Frag J** 21: 760 - 763. <https://doi.org/10.1002/ffj.1655>
- Lock O, Perez E, Villar M, Flores D, Rojas R. 2016. Bioactive compounds from plants used in Peruvian traditional medicine. **Nat Prod Commun** 11: 315 - 337.
- Lyss G, Knorre A, Schmidt TJ, Pahl HL, Merfort I. 1998. The anti-inflammatory sesquiterpene lactone helenalin inhibits the transcription factor NF- $\kappa$ B by directly targeting p65. **J Biol Chem** 273: 33508 - 33516. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.50.33508>
- Mendoza C, Márquez, A, Mathews N, Sosa SM, López A. 2017. Acción protectora del ácido kaurénico en el estrés oxidativo hepático. **Rev Vet** 28: 27 - 30. <https://doi.org/10.30972/vet.2811293>
- Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A. 1990. High gradient magnetic cell separation with MACS. **Cytometry** 11: 231 - 238. <https://doi.org/10.1002/cyto.990110203>
- Montiel-Ruiz RM, Córdova-de la Cruz M, González-Cortazar M, Zamilpa A, Gómez-Rivera A, López-Rodríguez R, Lobato-García CE, Blé-González EA. 2020. Antinociceptive effect of hinokinin and kaurenoic acid Isolated from *Aristolochia odoratissima* L. **Molecules** 25: 1454. <https://doi.org/10.3390/molecules25061454>
- Morales A, Pérez P, Mendoza R, Compagnone R, Suarez AI, Arvelo F, Ramírez JL, Galindo-Castro I. 2005. Cytotoxic and proapoptotic activity of ent-16 $\beta$ -17 $\alpha$ -dihydroxykaurane on human mammary carcinoma cell line MCF-7. **Cáncer Lett** 218: 109 - 116. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.07.009>
- Muleya E, Joseph OB, Mtunzi FM, Sekomeng MJ. 2017. Diterpenoids of *Alepidea Amatsymbica* Eckl. & Zeyh: Studies of their cytotoxic, antimicrobial, and lipoxigenase inhibitory activities. **MOJ Biorg Org Chem** 1: 103 - 111.
- Pereira S, Taleb-Contini S, Coppede J, Pereira P, Bertoni B, França S, Pereira AM. 2012. An ent-kaurane-type diterpene in *Croton antisiphiliticus* Mart. **Molecules** 17: 8851 - 8858. <https://doi.org/10.3390/molecules17088851>
- Pfeifer AL, Wenzel-Storjohann A, Barbosa JD, Zidorn C, Peifer C, Tasdemir D, Sezai S. 2019. Antimicrobial and cytotoxic effects of the *Copaifera reticulata* oleoresin and its main diterpene acids. **J Ethnopharmacol**

- 233: 94 - 100. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.11.029>
- Picman AK, Rodríguez E, Towers GH. 1979. Formation of adducts of parthenin and related sesquiterpene lactones with cysteine and glutathione. **Chem-Biol Interact** 28: 83 – 89.  
[https://doi.org/10.1016/0009-2797\(79\)90116-9](https://doi.org/10.1016/0009-2797(79)90116-9)
- Rodrigues M, Borges A, Soares S, Chiquini T, De Souza D, Lemes DC, Gomes CH, Da Silva T, Crispim D, Ferreira NH, Ambrósio SR, Cassio Sola RC. 2016. ent-Kaurenoic acid-rich extract from *Mikania glomerata*: *In vitro* activity against bacteria responsible for dental caries. **Fitoterapia** 112: 211- 216.  
<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.06.007>
- Ruiz Y, Rodrigues J, Arvelo F, Usubillaga A, Monsalve M, Diez N, Galindo-Castro I. 2008. Cytotoxic and apoptosis-inducing effect of ent-15-oxo-kaur-16-en-19-oic acid, a derivative of grandiflorolic acid from *Espeletia schultzei*. **Phytochemistry** 69: 432 - 438. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.07.025>
- Ryu SY, Ahn JW, Han BH, Kim SH. 1996. *In vitro* antitumor activity of diterpenes from *Aralia cordata*. **Arch Pharmacol Res** 19: 77 - 78.
- Sosa M, Suarez O, Dalo N. 2010. Kaurenic acid: An *in vivo* experimental study of its antiinflammatory and antipyretic effects. **Indian J Pharmacol** 42: 293 - 296. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.70205>
- Usubillaga A, Morales A. 1972. Kaurenic acid in *Espeletia* species. **Phytochemistry** 11: 1856-1857.
- Usubillaga A, Romero M, Aparicio R. 2003. Kaurenic acid in Espeletiinae. **Acta Horticulturae** 129 - 130.  
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2003.597.17>
- Vargas F, De Almeida P, Aranha ES, Boleti AP, Newton P, De Vasconcellos MC, Veiga-Junior VF, Lima ES. 2015. Biological activities and cytotoxicity of diterpenes from *Copaifera* spp. oleoresins. **Molecules** 20: 6194 - 6210. <https://doi.org/10.3390/molecules20046194>
- Villa-Ruano N, Pacheco-Hernández Y, Lozoya-Gloria E, Rubio-Rosas E, Ruiz-González N, Martínez-Orea Y, Cruz-Duran R, Ramirez-Garcia SA, Ramón-Canúl LG. 2013. Lipophilic constituents and some biological activities of hexanic extracts from *Zaluzania montagnifolia*, (Sch. Bip.) Sch. Bip. (Asteraceae). **Agrociencia** 47: 335 - 346.
- Visbal T, Martín P, Mora AJ, Delgado GE, Usubillaga A. 2004. Carbohydrate esters of kaurenic acid. **Rev Latinoam Quím** 32: 67 - 75.
- Wu Z, Zhang Y, Yang L, Chen N, Jiang L, Jiang S, Li G, Li Y, Wang G. 2017. Three new ent-kaurane diterpenes from the herbs of *Wedelia prostrata*. **J Nat Med** 71: 305 - 309. <https://doi.org/10.1007/s11418-016-1037-6>
- Zhang M, Zhao C, Dai W, He J, Jiao S, Li B. 2017. Anti-inflammatory ent-kaurenoic acids and their glycosides from *Gochnatia decora*. **Phytochemistry** 137: 174 - 181.  
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.02.021>