

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS

---

**DITERPENOS DE *AZORELLA COMPACTA*:  
TRANSFORMACIONES QUÍMICAS Y  
ACTIVIDAD BIOLÓGICA.**

Tesis para optar el Grado de Doctor en Química

SOLANGE DEL CARMEN NUÑEZ GONZALEZ

Profesor Tutor: Aurelio San Martín Barrientos  
Profesor Co-tutor: Luis Loyola Morales

---

Santiago, Chile 2018

## BIOGRAFÍA



Solange Del Carmen Núñez González nació el 4 de Mayo de 1991 en la comuna de Providencia, Santiago, ciudad en la que vive actualmente. Realizó sus estudios de enseñanza media en el Colegio La Salle, ubicado en la comuna de La Granja, donde se graduó el año 2007. Al año siguiente ingresa a la carrera de Licenciatura en Ciencias con mención en Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, egresando el año 2012 donde obtuvo

la posibilidad de continuar sus estudios en el Programa de Doctorado gracias a una beca otorgada por la institución.

Durante sus estudios realizó publicaciones en el área de fisicoquímica y química orgánica, además de desempeñarse como ayudante de laboratorio de docencia en ambas áreas. Como parte del trabajo de tesis llevó a cabo su investigación en el laboratorio de Productos Naturales y Síntesis en la Universidad de Chile y Universidad de Talca, desarrollándose también en el área Microbiológica en la Universidad Austral y Universidad Autónoma de Chile.

“La vida es como un maratón, con altibajos, pero una vez que lo has terminado sientes que puedes hacer cualquier cosa”

“Para triunfar en la vida, no es importante llegar primero. Para triunfar simplemente hay que llegar, levantándose cada vez que se cae en el camino”

Esta tesis de la dedico con mucho cariño a mis padres, Orfelina y Nelson, quienes durante la vida me han brindado todo lo que tienen en sus manos, y más. Con sus enseñanzas, valores, consejos y apoyo, me han dado las herramientas y mostrado el camino para transformarme en una persona de bien, que puede lograr cualquier cosa que se proponga en la vida, con esfuerzo, dedicación y honestidad.

A mi familia, mis hermanas, quienes junto a mis padres, me han apoyado incondicionalmente y dado fuerzas para seguir adelante, a pesar de los problemas que se presentan en el camino y que son difíciles de sortear.

A mis amigos, que en todo momento me han estrechado una mano y me han alentado para lograr mis objetivos sin abandonar la carrera, que a ratos se ha puesto cuesta arriba.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi familia, quienes me han apoyado en todo este proceso, y en la vida. A mi padre y mi madre, que con su preocupación y trabajo me han brindado todo lo necesario para desarrollarme como persona, tanto en lo emocional y material. A mis hermanas que, por ser la menor, me han cuidado y enseñado que siempre podemos dar más, y que con esfuerzo y dedicación podemos alcanzar las metas que nos proponemos.

A mis amigos, a los que me han acompañado desde el colegio y a los que conocí en este camino universitario que, a pesar del tiempo o la distancia, siempre están presentes con su preocupación, con una palabra de apoyo o una sonrisa. Debo mencionar también a mis amigos pequeños Pepe y Barto, que a pesar de lo que haga incondicionalmente me dan su cariño y compañía moviendo sus colitas, aunque uno de ellos nos haya dejado.

Agradezco también al atletismo, deporte que conocí en el transcurso de estos años de doctorado, donde he conocido a gente muy esforzada y cariñosa que me han demostrado que con perseverancia y voluntad se pueden alcanzar las metas más difíciles, y que todos tenemos esas posibilidades, es sólo querer tomarlas y hacerlas nuestras.

A Colo Colo, el equipo de mis amores, que me enseña cada día que con empuje y coraje podemos seguir avanzando a pesar de los obstáculos que se pongan en el camino. Además de poner en mi vida experiencias increíbles y personas maravillosas, amigos, y especialmente a mi pareja, que a pesar de todo está siempre presente con su preocupación, cariño y buenas energías.

También quiero agradecer a los profesores que me ayudaron a continuar y terminar con este trabajo, al profesor Luis Espinoza por su ayuda y preocupación, al Profesor Nicolás Yutronic por abrirme las puertas a este camino y no permitir que lo abandonara, al profesor Gino Corsini, Andrés Olea, Sergio Leiva y Fernando Castañeda, que me permitieron trabajar en sus laboratorios y me dieron nuevos conocimientos. No puedo dejar de mencionar a los auxiliares de laboratorio don Patricio, don Raúl, la señora María Inés y a todo el personal, de quienes también aprendí mucho y fueron parte importante en mi trabajo.

Por ultimo agradecer a la Universidad de Chile y Conicyt por los financiamientos otorgados que me permitieron cursar mis estudios.

A todos muchas gracias.

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>RESUMEN</b> .....	i
1.1 Resumen proyecto.....	ii
<b>CAPÍTULO I</b> .....	1
INTRODUCCIÓN .....	1
2.1 Generalidades.....	2
2.2 Especies vegetales en la zona Norte-Andina de Chile .....	3
2.3 Metabolitos secundarios del tipo terpenoides .....	8
2.4 Terpenoides aislados desde especies de la tribu <i>Mulinae</i> .....	14
2.5 Antecedentes de actividad biológica de <i>Azorella compacta</i> .....	18
2.6 Antecedentes ensayos bacterianos .....	21
HIPÓTESIS .....	27
OBJETIVOS.....	29
4.1 Objetivo general.....	30
4.2 Objetivos específicos .....	30
<b>CAPÍTULO II</b> .....	31
PARTE EXPERIMENTAL .....	31
5.1 Consideraciones generales.....	32
5.2 Abreviaciones de RMN .....	34
5.3 Abreviaciones químicas.....	35

5.4 Abreviaciones biológicas.....	36
5.5 Recolección de <i>Azorella compacta</i> .....	37
5.6 Descripción de compuestos .....	38
• Ácido mulinólico ( <b>1</b> ) .....	38
• Azorellanol ( <b>2</b> ).....	39
• Ácido mulin-12-en-11,14-diona-20-oico ( <b>3</b> ).....	40
• Ácido mulin-11,13-dien-20-oico ( <b>4</b> ) .....	41
• Ácido mulínico ( <b>5</b> ) .....	42
• Lactona del ácido mulin-9-hidroxi-11-en-20-oico ( <b>6</b> ) .....	43
• Epiazorellanol ( <b>27</b> ) .....	44
• Ácido epimulínico ( <b>28</b> ) .....	45
• Ácido 16-normulin-11-en-13-ona-20-oico ( <b>29</b> ) .....	45
• 7-acetoxi-13-metoxi-epiazorellano ( <b>30a</b> ) .....	47
• 7-acetoxi-13-metoxi-azorellano ( <b>30b</b> ) .....	47
• 7-acetoxi-mulin-9,12-dieno ( <b>31</b> ) .....	48
• 7-acetoxi-13- $\alpha$ -metoximulin-9-eno ( <b>31a</b> ) .....	50
• 7-desacetil-azorellanol ( <b>16</b> ) .....	51
• Azorellanona ( <b>7</b> ) .....	52
• 9- $\beta$ -hidroxi-mulin-12-en-7-ona ( <b>7a</b> ) .....	53
• Mulin-9,12-dien-7-ol ( <b>32</b> ) .....	54
• Mulin-9,12-dien-7-ona ( <b>33</b> ) .....	55
• Ácido 12-oxo-11,13- $\alpha,\alpha$ -dihidroxi-mulin-20-oico ( <b>34</b> ) .....	56
• Ácido 11-oxo-12,13- $\alpha,\alpha$ -dihidroxi-mulin-20-oico ( <b>35</b> ) .....	56
• Ácido 11,12-dioxo-13- $\alpha$ -hidroxi-mulin-20-oico ( <b>36</b> ) .....	56
• Metil éster del ácido mulin-11,13-dien-20-oico ( <b>37</b> ) .....	59
• Metil éster del ácido mulinólico ( <b>38</b> ) .....	59



• Metil éster del ácido epimulinólico (39) .....	59
• Metil éster del ácido 16-normulin-11-en-13-ona-20-oico (40) ..	59
• Metil éster del ácido mulin-12-en-11,14-diona-20-oico (41) .....	59
• Metil éster del ácido 12-oxo-11,13- $\alpha$ -dihidroxi-mulin-20-oico (42) .....	59
• Ácido 14-oxo-13- $\beta$ -hidroximulin-11-en-20-oico (43) .....	60
• Ácido 11-epoxi-12,13-dihidroximulin-20-oico (44) .....	60
• 7-acetoxi-13-dihidroximulin-9-eno (45) .....	62
• Ácido 11-oxo-14- $\alpha$ -hidroximulin-9-en-20-oico (46) .....	63
• Mulin-11,13-dien-20-ol (47) .....	64
• Mulin-11-en-13,20-diol (48) .....	66
• Ácido mulin-20-oico (49) .....	67
5.7 Formación de micelas .....	69
5.8 Actividad biológica.....	70
5.8.1 Microorganismo.....	70
5.8.2 Cultivos .....	70
5.8.3 Ensayos antibacterianos .....	71
a) Ensayo en caldo MH.....	71
b) Ensayo de difusión de disco .....	74
c) Ensayos MIC .....	75
d) Ensayos en Caldo MH (DMSO y Pluronic) .....	76
e) Ensayos difusión de disco (DCM y Pluronic).....	78
5.8.4 Ensayos con ácido 16-nor-mulin-11-en-13-ona-20-oico (Anexo1)	

<b>CAPÍTULO III</b> .....	80
<b>RESULTADOS Y DISCUSIONES</b> .....	80
6.1 Recolección del material .....	81
6.2 Extracción de metabolitos secundarios .....	82
6.2.1. Determinación estructural del compuesto <b>29</b> .....	84
6.3 Reacciones químicas sobre diterpenos .....	88
6.3.1 Modificaciones sobre azorellanol ( <b>2</b> ) .....	88
6.3.2 Oxidación de ácido mulinólico ( <b>1</b> ) .....	101
6.3.3 Metilación de diterpenos <b>1, 3, 4, 28, 29</b> y <b>34</b> .....	105
6.3.4 Reacciones sobre ácido mulin-11,13-dien-20-oico ( <b>4</b> ) .	107
6.3.5 Otras reacciones .....	111
6.4 Formación de micelas .....	118
6.5 Ensayos biológicos .....	119
6.5.1 Resultados de ensayos en caldo MH .....	119
6.5.2 Resultado de los ensayos de difusión de disco .....	121
a) Resultados de inhibición de crecimiento .....	124
b) Aumento de actividad biológica por modificación estructural.....	126
6.5.3 Resultados ensayos de MIC en difusión de disco.....	128
6.5.4 Resultados de ensayos DMSO vs Pluronic (caldo y disco) .....	129
 <b>CONCLUSIONES</b> .....	 136
 <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	 139

<b>ANEXOS .....</b>	<b>152</b>
---------------------	------------

<b>ANEXO 1.....</b>	<b>153</b>
---------------------	------------

- Ensayos con ácido 16-nor-mulin-11-en-13-ona-20-oico contra bacterias bucales.

<b>ANEXO 2.....</b>	<b>155</b>
---------------------	------------

- Espectros RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Vegetación andina de izq. a der. tolar, pajonal y bofedal .....	5
Figura 2: <i>Azorella compacta</i> (yareta) .....	7
Figura 3: a) Limoneno (C. terpénicos), b) Pinocembrina (C.fenólicos), c) Cafeína (C. nitrogenados) .....	9
Figura 4: DMAPF (izquierda) y IPPF (derecha).....	11
Figura 5: Esquema de la biosíntesis de IPPF (DMAF) con acetil-CoA como precursor.....	12
Figura 6: Esquema ruta biosintética de los terpenoides .....	13
Figura 7: Esqueletos descritos para las especies de la Tribu Mulinæ. a) Azorellano, b) Yaretano, c) Mulinano y d) Madreporano.....	15
Figura 8: Diterpenos aislados desde <i>Azorella compacta</i> .....	16
Figura 9: Diterpenos que presentan actividad biológica.....	19
Figura 10: Estructura de las bacterias .....	22
Figura 11: Pared celular de las bacterias Gram-positivas (izq.) y Gram-negativas (der.) .....	23
Figura 12: Estructura ácido mulinólico.....	39
Figura 13: Estructura azorellanol .....	40
Figura 14: Estructura del ácido mulin-12-en-11,14-diona-20-oico .....	41
Figura 15: Estructura del ácido mulin-11,13-dien-20-oico.....	42
Figura 16: Estructura del ácido mulínico .....	42
Figura 17: Estructura de lactona del ácido mulin-9-hidroxi-11-en-20-oico ....	43
Figura 18: Estructura de epiazorellanol .....	44
Figura 19: Estructura del ácido epimulinólico .....	45
Figura 20: Estructura del ácido 16-normulin-11-en-13-ona-20-oico .....	46
Figura 21: Estructura de 7-acetoxi-13-metoxiepiazolellano.....	47

Figura 22: Estructura de 7-acetoxi-13-metoxiazorellano .....	48
Figura 23: Estructura de 7-acetoximulin-9,12-dieno .....	49
Figura 24: Estructura de 7-acetoxi-13- $\alpha$ -metoximulin-9-eno .....	50
Figura 25: Estructura de 7-desacetil-azorellanol .....	52
Figura 26: Estructura de azorellanona.....	53
Figura 27: Estructura de 9- $\beta$ -hidroximulin-12-en-7-ona .....	54
Figura 28: Estructura de mulin-9,12-dien-7-ol .....	55
Figura 29: Estructura de mulin-9,12-dien-7-ona.....	56
Figura 30: Estructura el ácido 12-oxo-11,13- $\alpha,\alpha$ -dihidroximulin-20-oico.....	57
Figura 31: Estructura de ácido 11-oxo-12,13- $\alpha,\alpha$ -dihidroximulin-20-oico.....	58
Figura 32: Estructura de ácido 11,12-dioxo-13- $\alpha$ -hidroximulin-20-oico .....	58
Figura 33: Estructuras de compuestos metilados .....	60
Figura 34: Estructura de ácido 14-oxo-13- $\beta$ -hidroximulin-11-en-20-oico.....	61
Figura 35: Ácido 11-epoxi-12,13-dihidroximulin-20-oico ( <b>44</b> ) acetilado.....	62
Figura 36: Estructura de 7-acetoxi-13-hidroximulin-9-eno .....	63
Figura 37: Estructura de ácido 11-oxo-14- $\alpha$ -hidroximulin-9-en-20-oico.....	64
Figura 38: Estructura de mulin-11,13-dien-20-ol .....	65
Figura 39: Estructura de mulin-11-en-13,20-diol .....	66
Figura 40: Estructura de ácido mulin-20-oico .....	67
Figura 41: Disposición de discos de papel en ensayo de difusión de disco ...	75
Figura 42: Disposición cuadros de papel en ensayo MIC.....	76
Figura 43: Diterpenos aislados desde partes aéreas de <i>Azorella compacta</i> .....	83
Figura 44: Estructura del ácido mulin-12,14-dien-11-ona-20-oico .....	86
Figura 45: Valor del ángulo diedro entre hidrógenos nueve y diez en posición <i>trans</i> .....	87
Figura 46: Valor del ángulo diedro entre hidrógenos nueve y diez en posición <i>cis</i> .....	87

Figura 47: Estructura final del ácido 16-normulin-11-en-13-ona-20-oico (compuesto <b>29</b> ) .....	88
Figuras 48: Estructuras simuladas para el compuesto <b>31a</b> .....	94
Figura 49: Determinación ángulo diedro con hidrógenos en posición <i>cis</i> del compuesto <b>34</b> .....	103
Figura 50: Determinación ángulo diedro con hidrógenos en posición <i>trans</i> del compuesto <b>34</b> .....	104
Figura 51: Estructura de compuesto metilados .....	106
Figura 52: Acoplamiento NOESY del compuesto <b>44</b> acetilado .....	110
Figura 53: Estructura y numeración del compuesto <b>49</b> .....	117
Figura 54: Halo de inhibición ( <i>S. aureus</i> ) del compuesto <b>34</b> .....	124
Figura 55: Velo de inhibición ( <i>E. coli</i> ) del compuesto <b>34</b> .....	125
Figura 56: Halo inhibición ampicilina para a) <i>S. aureus</i> , b) <i>E. coli</i> y c) <i>M.</i> <i>smegmatis</i> .....	126
Figura 57: Ensayo MIC difusión de disco con <i>S. aureus</i> .....	129
Figura 58: Gráfico Absorbancia vs concentración compuesto <b>3</b> .....	130
Figura 59: Gráfico Absorbancia vs concentración compuesto <b>29</b> .....	130
Figura 60: Gráfico Absorbancia vs concentración compuesto <b>45</b> .....	131

## ÍNDICE DE TABLAS Y ESQUEMAS

Tabla 1: Especies de <i>Azorella</i> presentes en Chile y su distribución.....	6
Tabla 2: Clasificación de terpenos .....	10
Tabla 3: Dilución de soluciones stock de compuestos <b>2</b> y <b>16</b> .....	72
Tabla 4: Concentración final de compuestos en medio de incubación.....	73
Tabla 5: Concentración final de compuestos en 500 µL de medio.....	77
Tabla 6: Resultados ensayos compuestos <b>2</b> , <b>16</b> y Penicilina en Pluronic.....	120
Tabla 7: Resultados ensayos de difusión de disco .....	121
Tabla 8: Resultados usando 500 µg de los compuestos <b>31</b> y <b>36</b> (mm) .....	122
Tabla 9: Resultados antibacterianos difusión de disco .....	122
Tabla 10: Resultados MIC del compuesto <b>45</b> .....	128
Tabla 11: Ensayo solubilidad DCM vs Pluronic en difusión de disco .....	133
Tabla 12: Resultados ensayos antibacterianos del ácido 16-nor-mulin-11-en 13-ona-20-oico (mm). (Anexo 1)	
ESQUEMA 1. <b>Oxidación del compuesto 2 y 27 sobre sílica gel</b> .....	89
ESQUEMA 2. <b>Apertura del ciclopropano en medio ácido</b> .....	91
ESQUEMA 3. <b>Hidrólisis del compuesto 2 utilizando K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b> .....	96
ESQUEMA 4. <b>Oxidación del compuesto 16 utilizando KMnO<sub>4</sub></b> .....	97
ESQUEMA 5. <b>Hidrólisis del compuesto 31 y posterior oxidación</b> .....	99
ESQUEMA 6. <b>Oxidación del compuesto 1 utilizando KMnO<sub>4</sub></b> .....	102
ESQUEMA 7. <b>Oxidación del compuesto 4 utilizando KMnO<sub>4</sub></b> .....	107
ESQUEMA 8. <b>Oxidación del compuesto 31 utilizando Hg(OAc)<sub>2</sub></b> .....	111
ESQUEMA 9. <b>Reducción del compuesto 3 utilizando NaBH<sub>4</sub></b> .....	113
ESQUEMA 10. <b>Reducción del compuesto 4 utilizando LiAlH<sub>4</sub></b> .....	114
ESQUEMA 11. <b>Reducción del compuesto 1 utilizando LiAlH<sub>4</sub></b> .....	116

ESQUEMA 12. Hidrogenación del compuesto 4 utilizando H <sub>2</sub> .....	116
---	-----

## ANEXOS 2

Figura I: Espectro RMN <sup>1</sup> H Azorellanol ( <b>2</b> ) .....	155
Figura II: Espectro RMN <sup>1</sup> H Ácido mulin-12-en-11,14-diona-20-oico ( <b>3</b> ) ..	156
Figura III: Espectro RMN <sup>13</sup> C Ácido mulin-12-en-11,14-diona-20-oico ( <b>3</b> )	157
Figura IV: Espectro RMN <sup>1</sup> H Ácido mulínico ( <b>5</b> ) .....	158
Figura V: Espectro RMN <sup>1</sup> H Lactona del ácido mulin-9-hidroxi-11-en-20-oico ( <b>6</b> ).....	159
Figura VI: Espectro RMN <sup>13</sup> C Lactona del ácido mulin-9-hidroxi-11-en-20- oico ( <b>6</b> ).....	160
Figura VII: Espectro RMN <sup>1</sup> H Ácido 16-normulin-11-en-13-ona-20-oico ( <b>29</b> ) .....	161
Figura VIII: Espectro <sup>13</sup> C Ácido 16-normulin-11-en-13-ona-20-oico ( <b>29</b> ) .	162
Figura IX: Espectro RMN <sup>1</sup> H 7-acetoxi-13-metoxiepiazolellano ( <b>30a</b> ) .....	163
Figura X: Espectro RMN <sup>1</sup> H 7-acetoxi-13-metoxiazorellano ( <b>30b</b> ) .....	164
Figura XI: Espectro RMN <sup>1</sup> H 7-acetoximulin-9,12-dieno ( <b>31</b> ) .....	165
Figura XII: Espectro RMN <sup>13</sup> C 7-acetoximulin-9,12-dieno ( <b>31</b> ) .....	166
Figura XIII: Espectro RMN <sup>1</sup> H 7-acetoxi-13- $\alpha$ -metoximulin-9-eno ( <b>31a</b> ) ..	167
Figura XIV: Espectro RMN <sup>13</sup> C 7-acetoxi-13- $\alpha$ -metoximulin-9-eno ( <b>31a</b> ) .	168
Figura XV: Espectro RMN <sup>1</sup> H 7-desacetilazolellanol ( <b>16</b> ) .....	169
Figura XVI: Espectro RMN <sup>13</sup> C 7-desacetilazolellanol ( <b>16</b> ) .....	170
Figura XVII: Espectro RMN <sup>1</sup> H Azorellanona ( <b>7</b> ) .....	171
Figura XVIII: Espectro RMN <sup>13</sup> C Azorellanona ( <b>7</b> ) .....	172
Figura XIX: Espectro RMN <sup>1</sup> H 9- $\beta$ -hidroximulin-12-en-7-ona ( <b>7a</b> ) .....	173
Figura XX: Espectro RMN <sup>13</sup> C 9- $\beta$ -hidroximulin-12-en-7-ona ( <b>7a</b> ) .....	174



Figura XXI: Espectro RMN <sup>1</sup> H Mulin-9,12-dien-7-ol ( <b>32</b> ) .....	175
Figura XXII: Espectro RMN <sup>13</sup> C Mulin-9,12-dien-7-ol ( <b>32</b> ) .....	176
Figura XXIII: Espectro RMN <sup>1</sup> H Ácido 12-oxo-11,13- $\alpha,\alpha$ -dihidroximulin-20- oico ( <b>34</b> ) .....	177
Figura XXIV: Espectro RMN <sup>13</sup> C Ácido 12-oxo-11,13- $\alpha,\alpha$ -dihidroximulin- 20-oico ( <b>34</b> ) .....	178
Figura XXV: Espectro RMN <sup>1</sup> H Ácido 11-oxo-12,13- $\alpha,\alpha$ -dihidroximulin-20- oico ( <b>35</b> ) .....	179
Figura XXVI: Espectro RMN <sup>13</sup> C Ácido 11-oxo-12,13- $\alpha,\alpha$ -dihidroximulin- 20-oico ( <b>35</b> ) .....	180
Figura XXVII: Espectro RMN <sup>1</sup> H Ácido 11,12-dioxo-13- $\alpha$ -hidroximulin-20- oico ( <b>36</b> ) .....	181
Figura XXVIII: Espectro RMN <sup>13</sup> C Ácido 11,12-dioxo-13- $\alpha$ -hidroximulin- 20-oico ( <b>36</b> ) .....	182
Figura XXIX: Espectro RMN <sup>1</sup> H Ácido 14-oxo-13- $\beta$ -hidroximulin-11-en-20- oico ( <b>43</b> ) .....	183
Figura XXX: Espectro RMN <sup>1</sup> H Ácido 11-epoxi-12,13-dihidroximulin-20- oico ( <b>44</b> ) (acetilado) .....	184
Figura XXXI: Espectro RMN <sup>13</sup> C Ácido 11-epoxi-12,13-dihidroximulin-20- oico ( <b>44</b> ) (acetilado) .....	185
Figura XXXII: Espectro RMN <sup>1</sup> H 7-acetoxi-13-hidroximulin-9-eno ( <b>45</b> ) ..	186
Figura XXXIII: Espectro RMN <sup>13</sup> C 7-acetoxi-13-hidroximulin-9-eno ( <b>45</b> )	187
Figura XXXIV: Espectro RMN <sup>1</sup> H Ácido 11-oxo-14- $\alpha$ -hidroximulin-9-en-20- oico ( <b>46</b> ) .....	188
Figura XXXV: Espectro RMN <sup>13</sup> C Ácido 11-oxo-14- $\alpha$ -hidroximulin-9-en-20- oico ( <b>46</b> ) .....	189
Figura XXXVI: Espectro RMN <sup>1</sup> H Mulin-11,13-dien-20-ol ( <b>47</b> ) .....	190

Figura XXXVII: Espectro RMN $^{13}\text{C}$ Mulin-11,13-dien-20-ol ( <b>47</b> ) .....	191
Figura XXXVIII: Espectro RMN $^1\text{H}$ Mulin-11-en-13,20-diol ( <b>48</b> ) .....	192
Figura XXXIX: Espectro RMN $^{13}\text{C}$ Mulin-11-en-13,20-diol ( <b>48</b> ) .....	193
Figura XL: Espectro RMN $^1\text{H}$ Ácido mulin-20-oico ( <b>49</b> ) .....	194
Figura XLI: Espectro RMN $^{13}\text{C}$ Ácido mulin-20-oico ( <b>49</b> ) .....	195

## **RESUMEN**

## 1.1 Resumen

En el presente trabajo se logró la extracción de nueve diterpenos naturales a partir de extractos de *Azorella compacta* obtenidos a partir de éter de petróleo y acetato de etilo. Ocho de estos diterpenos están descritos en la literatura y se determinaron mediante espectroscopía  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -RMN, y a través de comparación con estándares previamente aislados, mientras que el ácido 16-normulin-11-en-13-ona-20-oico (**29**) se aisló por primera vez describiendo su estructura mediante  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -RMN, IR, UV y espectroscopía de masas.

Los nueve diterpenos obtenidos fueron derivatizados mediante cambios funcionales para dar paso a veintidós diterpenos semisintéticos que fueron caracterizados espectroscópicamente.

Posteriormente se determinó la actividad antibacteriana de los diterpenos, tanto naturales como semisintéticos, los cuales fueron ensayados en cepas de *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium smegmatis* y *Escherichia coli*. Los resultados obtenidos indicaron que dos diterpenos naturales y cuatro diterpenos modificados presentaron actividad biológica contra las bacterias mencionadas.

También fue posible determinar que al modificar químicamente las estructuras de diterpenos naturales se observó un incremento de la actividad antibacteriana. Además se observó que al incorporar los compuestos naturales o semisintéticos en soluciones acuosas de micelas formadas con Pluronic F-127, no se detectó aumento de la actividad biológica.

Seis de los diterpenos descritos en este trabajo presentaron una mayor actividad biológica. Las modificaciones estructurales llevadas a cabo dieron lugar, en algunos casos, a un incremento de la actividad incluso en aquellos compuestos naturales que no poseían capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano.

## CAPÍTULO I

### **INTRODUCCION**

## 2.1 Generalidades

En el planeta se encuentran distribuidas una gran cantidad de especies de plantas, cada una de ellas con diferentes propiedades y características. Es por esto que no sólo se recurre a ellas para la alimentación de muchos de los seres vivos, sino que también han sido la cura para diversas enfermedades. Según la Organización Mundial de la Salud (WHO), entre un 65 y 80% de la población mundial utiliza y depende de las plantas como primera opción para la cura de sus enfermedades. Esto se debe principalmente por el escaso acceso a la medicina moderna, a tradiciones culturales, y al bajo costo que implica la obtención de diferentes recursos naturales como medicina alternativa<sup>[1]</sup>.

Sin embargo, a pesar del conocimiento que se tiene del uso de las materias naturales como fuente medicinal, el estudio que se ha realizado de las plantas para verificar sus propiedades es bajo. De las que han sido estudiadas se ha determinado que no sólo aquellas moléculas que fueron extraídas desde las plantas han presentado características para ser potenciales medicamentos, sino que también se convierten en una fuente para la elaboración de nuevas estructuras con las mismas propiedades medicinales e incluso aumentando su actividad, convirtiéndose así en cabeza de serie para la investigación de nuevas drogas.

En Chile existe una gran diversidad de vegetación con más de 5.000 especies distribuidas a lo largo del país, con características propias e incluso exclusivas de la zona<sup>[2]</sup>. La vida vegetal se encuentra fuertemente

condicionada por el clima característico, a lo que se suma las diferencias topográficas y geomorfológicas y otros factores.

## 2.2 Especies vegetales en la Zona Norte-Andina de Chile

Especialmente en la zona norte-andina se observa un cambio considerable en el ecosistema debido a la altura que alcanza la cordillera de Los Andes en esta región y a las precipitaciones que se presentan en épocas de verano, que alcanzan los 400 a 500 mm, causadas por el fenómeno conocido como invierno altiplánico favoreciendo un clima de carácter tropical<sup>[3]</sup>. Las precipitaciones y la aridez del sector, que varían de norte a sur y de este a oeste, crean un ambiente de características extremas para las especies que logran desarrollarse y adaptarse a este clima<sup>[4]</sup>. Desde los 3.000 msnm hasta alturas que sobrepasan los 4.000 msnm es posible observar formaciones muy diversas de especies vegetales rastreras o acojinadas, con espinas o matorrales, que se han adaptado para resistir el exigente clima del lugar<sup>[5]</sup>.

Los primeros conocimientos acerca de la flora de la zona andina del norte de Chile se realizaron en 1934, donde se exploró el sector del noreste del país y sus límites con Perú y Bolivia<sup>[6]</sup>. Posteriormente, en 1907, se describió la flora de la zona norte de Chile con mayor extensión, considerándose estos estudios como base para las futuras investigaciones que se han realizado hasta las últimas décadas<sup>[7]</sup>.

En estos estudios se describe principalmente una vegetación del tipo “semi desértica en elevada altura” (ver Figura 1) detallada como pequeños arbustos de no más de un metro de alto (tolares), que se distribuyen en la



zona pre-altiplánica, hasta los 3.800 msnm aproximadamente, acompañadas de hierbas de hoja perenne y flores como la chachacoma (*Senecio eriophyton*) y quinchamalí (*Quinchamalium chilensis*)<sup>[8,9]</sup>.

Luego, estos matorrales desaparecen a medida que se aumenta la altitud para dar paso a hierbas en forma de mechón o champas denominadas como pajonal andino, las que pueden llegar a medir hasta 2 metros de alto, como por ejemplo la “paja brava” (*Panicum prionitis*) y el “iru” (*Festuca chrysophylla*)<sup>[10]</sup>. Sobre los 4.000 msnm estas praderas de hierbas se mezclan con plantas en forma de cojín como la “checa-checa” (*Pycnophyllum molle*) y la “llareta o yareta” (*Azorella compacta*), las que crecen preferentemente en zonas rocosas y de pronunciadas pendientes<sup>[10,11]</sup>.

En este ecosistema puneño también es posible encontrar vegetación con alta humedad conocida como bofedales, estos son acumulaciones de materia vegetal saturadas con agua, adaptadas a alturas muy elevadas. Son una fuente importante de alimento y agua para los animales de las regiones andinas, siendo un elemento vital para la ecología de Los Andes. La vegetación dominante en los bofedales son juncáceas (*Juncaceae*) como el “pakó” (*Oxychloe andina*) especies herbáceas como por ejemplo la “arenaria” (*Arenaria ruvilaris*)<sup>[12]</sup>, macrófitos acuáticos como la “tembladerilla” (*Azolla filiculoides*) y plantas en forma de cojín que crecen en zonas donde el flujo superficial de agua es bajo<sup>[13,14]</sup>.



Figura 1: Vegetación andina de izq. a der. tolar, pajonal y bofedal.

A pesar de la riqueza de los ecosistemas de Chile y sus países vecinos, tanto en nuestro país como en el resto de Latinoamérica, aún no se ha profundizado en el tema de los productos naturales, ni se ha ampliado el conocimiento de esta área, por ejemplo, en Chile sólo el 6,4% de las publicaciones están referidas a los productos naturales, situándose en el cuarto lugar dentro de América Latina<sup>[15]</sup>.

Tanto en la zona andina de Chile como en Sudamérica los climas extremos son propicios para el crecimiento de una de las especies de la familia Apiaceae más importantes y destacadas de la zona. La familia Apiaceae está constituida por cerca de 450 géneros y por más de 3.000 especies que incluye plantas de uso etnobotánico como el comino (*Cominum cyminum*), cilantro (*Coriandrum sativum*), anís (*Pimpinella anisum*), zanahoria (*Daucus carota subsp. Sativus*), apio (*Apium graveolens*) y el perejil (*Petroselinum crispum*), entre otras, incluyendo también especies venenosas como la cicuta (*Conium maculatum*)<sup>[16-18]</sup>.

*Azorella* es un género principalmente sudamericano perteneciente a la tribu mulinae, junto con los géneros *Mulinum* y *Laretia*, fue descrito por primera

vez en 1783 con la especie *Azorella filamentosa*, por Lamarck, estudiando material recolectado en Tierra del Fuego. A la fecha se ha determinado que el género *Azorella* está integrado por cerca de 70 especies distribuidas en la Cordillera de los Andes desde Costa Rica hasta las islas subantárticas, y Nueva Zelanda<sup>[19,20]</sup>.

En Chile se encuentran 17 especies pertenecientes al género *Azorella*, distribuidas desde Arica hasta Tierra del fuego, donde tres de ellas son endémicas<sup>[21]</sup>. Las especies presentes en Chile se indican en la Tabla 1:

Tabla 1: Especies de *Azorella* presentes en Chile y su distribución.

<i>A. ameghinoi</i> (XI región)	<i>A. diapensioides</i> (I región)	<i>A. compacta</i> (I a III región)	<i>A. diversifolia</i> (XI región)
<i>A. spinosa</i> (IV a X región)	<i>A. selago</i> (XII región)	<i>A. madreporica</i> (III a VII región)	<i>A. lycopodioides</i> (VI a XII región)
<i>A. crassipes</i> (IX región)	<i>A. filamentosa</i> (XII región)	<i>A. monantha</i> (VI a XII región)	<i>A. trifoliolata</i> (VIII región)
<i>A. cryptantha</i> (III y VI región)	<i>A. fueguiana</i> (XII región)	<i>A. monteroi</i> (IX región)	<i>A. trifurcata</i> (VIII a XII región)
<i>A. incisa</i> (V a X región)			

*Azorella compacta* o llareta es una de las plantas en las que se han centrado las investigaciones debido al uso medicinal que le daba la gente de la zona, contra la diabetes y otras enfermedades<sup>[22]</sup>, era consumida en forma de infusión, de sabor amargo, para aliviar molestias provocadas por la altura (mal de puna), depurar la sangre, contra problemas estomacales entre otros. Además su resina era utilizada de forma externa para aliviar inflamaciones<sup>[23]</sup>. También fue una planta muy usada como combustible en

establecimientos mineros y salitreros, para secar minerales o para la generación de vapor. Así mismo, se utilizaba en el uso doméstico para la cocina y como calefacción gracias a su madera seca<sup>[24]</sup>.

*A. compacta* pertenece a la familia Apiaceae que describe plantas herbáceas de hoja perenne, muy aromáticas, hermafroditas, de tallos huecos y flores en forma de sombrilla invertida compuestas por pequeñas umbelas, por lo que en un comienzo se conocía a esta familia como Umbelliferae (ver Figura 2). En el caso de la llareta, las umbelas están comprimidas en el interior de la cúpula formando un cojín denso, duro y resinoso<sup>[25,26]</sup>.



Figura 2: *Azorella compacta* (llareta).

La llareta es una especie de arbusto amarillo-verdoso que se desarrolla casi exclusivamente en laderas rocosas del noreste de Chile, noroeste de Argentina, sur de Perú y Oeste de Bolivia, desde los 3.800 a los 5.300 msnm en un proceso muy lento que alcanza los 1,5 cm por año, donde puede llegar a crecer 12 metros de diámetro y 1 metro de alto<sup>[27]</sup>. Prefiere suelos bien drenados aunque estos sean nutricionalmente pobres sin importar si son suelos ácidos, neutros o alcalinos. Se ha adaptado a un clima de constante exposición al sol creciendo de forma muy compacta para evitar

la pérdida de calor, por lo que no suele reproducirse en zonas de sombra. Puede soportar periodos de lluvia e incluso nieve<sup>[28]</sup>.

Distintas especies de la tribu mulinae fueron usadas como plantas medicinales, es por este motivo que se comenzó a realizar investigaciones fitoquímicas sobre especies de la familia Apiaceae donde se ha logrado determinar la presencia de flavonoides, sesquiterpenos, cumarinas y poliacetilenos con actividades antinflamatoria, anticancerosa, antibacterial, antifúngica, antioxidante, entre otras<sup>[29-36]</sup>. Sin embargo, de los géneros *Mulinun*, *Latería* y *Azorella* (tribu mulinae) se ha encontrado mayoritariamente terpenoides, que al igual que el resto de la familia Apiaceae, presentan una importante actividad biológica. Del género *Azorella* se han estudiado los compuestos presentes en *A. compacta*, *A. madreporica*, *A. trifurcata*, *A. yareta*, *A. monantha* y *A. julianii*. Las investigaciones se han llevado a cabo recolectando dichas plantas en Chile y también en Argentina<sup>[37,38]</sup>.

### 2.3 Metabolitos secundarios del tipo terpenoides

Existe otra gran cantidad de compuestos que generan las plantas que no son considerados como esenciales para su crecimiento porque no son utilizados en el metabolismo celular básico, estos son los metabolitos secundarios, que deben su nombre a que en un comienzo se creía que era productos de desecho del metabolismo de las plantas. Posteriormente se determinaría que estos compuestos estarían estrechamente ligados a la protección y a la comunicación entre las especies, y que a diferencia de sus pares primarios,

son radicalmente distintos entre los individuos, ya que cada planta presenta diferentes necesidades para sobrevivir en el entorno<sup>[39,41]</sup>.

Además de ser producidos como respuesta a las presiones de selección natural, los metabolitos secundarios también son responsables del olor, sabor y color de las hojas y flores de las plantas, dando también sus propiedades medicinales. Se han descrito más de 30.000 sustancias que pueden ser consideradas en la categoría de metabolitos secundarios, que a pesar de su gran variabilidad estructural son sintetizados en los vegetales a partir de un número reducido de precursores: ácido acético (en forma de acetyl-CoA), el ácido shikimico y aminoácidos.

Según la estructura química de los metabolitos secundarios se han clasificado en al menos tres grandes grupos (ver Figura 3):

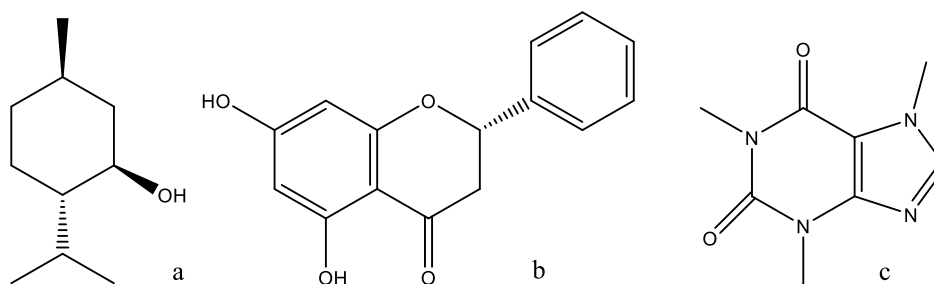


Figura 3: a) Limoneno (C. terpénicos), b) Pinocembrina (C.fenólicos), c) Cafeína (C. nitrogenados).

Los terpenos o terpenoides constituyen el mayor porcentaje de los metabolitos secundarios y son formados principalmente por la vía del ácido mevalónico<sup>[41,43]</sup>. Son biomoléculas químicamente heterogéneas pero físicamente semejantes, presentan nula solubilidad en agua, siendo afines

con solventes orgánicos poco polares como el hexano o diclorometano. En un comienzo se determinó que los terpenos eran hidrocarburos constituidos únicamente por alquenos (por eso su nombre terminaba en *-eno*), pero luego se descubrió la presencia de grupos funcionales como cetonas, ésteres y ácidos carboxílicos en sus estructuras, cambiando de nombre a terpenoides<sup>[44]</sup>. Fueron separados originalmente del aceite de la trementina (terpenitina) y están ampliamente distribuidos en microorganismos, plantas y animales siendo clasificados dentro del grupo de los lípidos, pero considerados como “lípidos no relacionados a ácidos grasos”.

Tabla 2: Clasificación de terpenoides.

<b>N° Unidades De Isopreno</b>	<b>Clasificación</b>	<b>Ejemplos</b>
1	Hemiterpenos	Isopentenol, alcohol isoamílico.
2	Monoterpenos	Gerianol, mentol, loganina.
3	Sesquiterpenos	Farnesol, bisabolol, sirenina.
4	Diterpenos	Ácido abiético, fitol, crocetina.
5	Sesterterpenos	Artemona, cadineno. Constituyentes de extractos lípidos insaponificables.
6	Triterpenos	Escualenos, esteroides, triterpenos pentacíclicos.
8	Tetraterpenos	Carotenos, xantofilas.
>8	Politerpenos	Solanesol, espadicol, hule.

La unidad básica y precursora de los terpenos es el isopreno, el cual en su forma de pirofosfato de isopentenilo, junto a su isómero, en un proceso de condensación, dan paso a cadenas lineales que forman posteriormente los diferentes tipos de terpenos ya sean cíclicos, lineales o mixtos<sup>[45]</sup>. Según la cantidad de unidades de moléculas de isopreno que se condensan para formar los terpenos, se pueden clasificar en distintos grupos (ver Tabla 2).

La ruta biosintética asociada a los terpenos es la vía del acetil-ácido mevalónico, donde tres moléculas de acetil-CoA se unen entre sí para dar paso al ácido mevalónico, un intermediario de seis carbonos que es fosforilado, descarboxilado y deshidratado para dar paso a los precursores pirofosfato de isopentenilo (IPPF) y pirofosfato de dimetilalilo (DMAPF) (ver Figura 4), que posteriormente originaran los distintos terpenoides<sup>[46]</sup>.

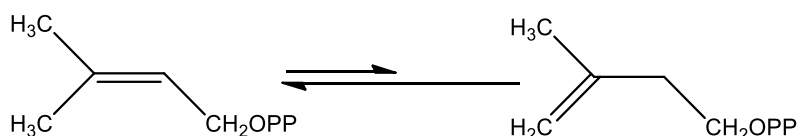


Figura 4: DMAPF (izquierda) y IPPF (derecha)

El proceso de formación de IPPF y DMAPF está regulado por diferentes enzimas. En principio, dos moléculas de acetil-CoA se condensan mediante una tiolasa para dar paso al acetoacetil-CoA. Luego una tercera unidad de acetilo, que es transferida del acetil-CoA mediante una enzima, es añadida por medio de una condensación del éster. El enlace que une la enzima con el tioéster de las moléculas de acetil-CoA unidas (condensadas), se hidroliza dando paso al producto 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-



CoA), luego el mismo grupo tioéster es reducido a alcohol para formar ácido mevalónico, precursor directo del IPPF.

A través de acciones consecutivas de quinasas sobre el ácido mevalónico se forma el 5-pirofosfato del ácido mevalónico (M5PF), el cual, por acción de una descarboxilasa, da origen al IPPF que por medio de una isomerasa da lugar al DMAPF (ver Figura 5)<sup>[47]</sup>.

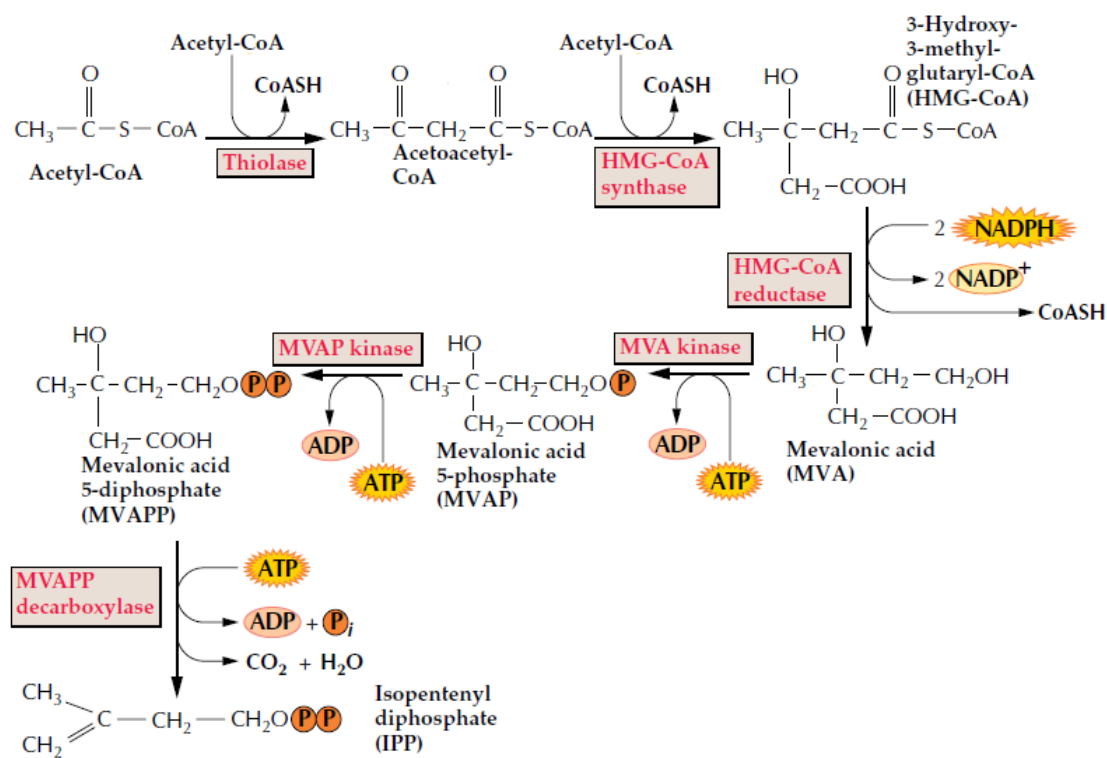


Figura 5: Esquema de la biosíntesis de IPPF (DMAF) con acetil-CoA como precursor.

Los intermediarios IPPF y DMAPF, considerados como los bloques activos de cinco carbonos de la biosíntesis de los terpenoides, reaccionan entre sí para generar pirofosfato de geranilo (GPF), una molécula de diez carbonos que es la precursora de la mayoría de los monoterpenos. A su vez, GPF se

puede unir a otra molécula de IPPF para dar un compuesto de quince carbonos denominado pirofosfato de farnesilo (FPF), el precursor de casi todos los sesquiterpenos. La adición de otra molécula de IPF a la estructura de quince carbonos, da paso al pirofosfato de geranylgeranilo (GGPF), una estructura de veinte carbonos que da origen de los diterpenos. Finalmente FPF y GGPF, pueden dimerizar para formar triterpenos (treinta carbonos) y tetraterpenos (cuarenta carbonos), respectivamente<sup>[42]</sup>. Todo este proceso consecutivo es catalizado por enzimas tipo sintasas (ver Figura 6).

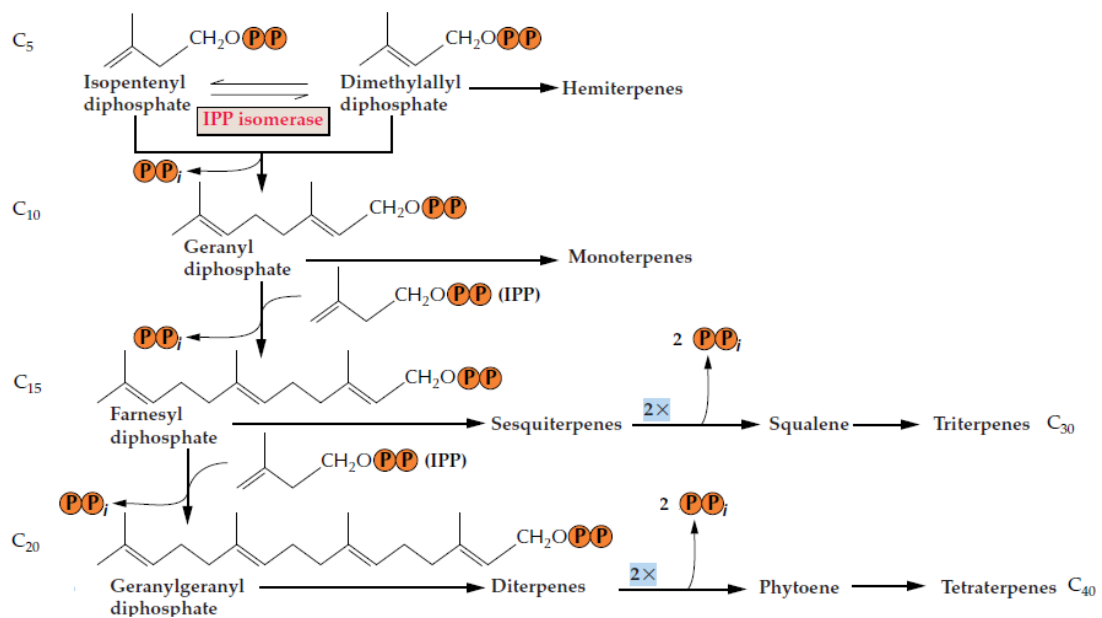


Figura 6: Esquema ruta biosintética de los terpenoides.

Existe una segunda vía de formación de IPPF, a través de un conjunto de reacciones a partir de intermediarios de la glucólisis o del ciclo de Calvin, denominada ruta del fosfato de metileritritol (MEF) que opera en cloroplastos y otros plastidos. Una molécula de piruvato se descarboxila mediante una enzima para luego condensarse con una molécula de D-gliceraldehido-3-fosfato para generar 1-desoxixilulosa-5-fosfato. Los pasos

siguientes hasta la formación de IPPF no están totalmente determinados y solo se han logrado describir ciertos intermediarios del proceso<sup>[42,46]</sup>.

#### 2.4 Terpenoides aislados desde especies de la tribu *Mulinae*

En general los terpenoides aislados de plantas pertenecientes a la tribu *Mulinae* son diterpenos, moléculas de estructura básica compuesta por veinte átomos de carbono que además pueden presentar diferentes grupos funcionales e incluso átomos de nitrógeno. Existen diterpenos lineales, y de uno hasta cuatro ciclos en su estructura, distribuidos en plantas (resinas), animales y microorganismos.

Uno de los diterpenos lineales o acíclicos de mayor importancia es el fitol, aislado en 1.909 por Willstätter en la hidrólisis de la clorofila. Dentro del grupo de los monocíclicos se encuentra la vitamina A, aislada en 1931 por Karrer del aceite del hígado de mero. El diterpeno tricíclico más importante es el ácido abiético, componente principal de la colofonia, resina de las coníferas<sup>[48,49]</sup>.

Sin embargo, los diterpenos de las especies de la tribu *Mulinae* son de estructuras únicas presentando cuatro tipos de esqueletos base: mulinano, yaretano, madreporano y azorellano (ver Figura 7). Estos esqueletos contienen múltiples grupos funcionales, generando una gran variedad de estructuras. Es posible también, encontrar diterpenos con ausencia de uno de los carbonos de la estructura base, pero manteniendo el resto del esqueleto sin cambios.

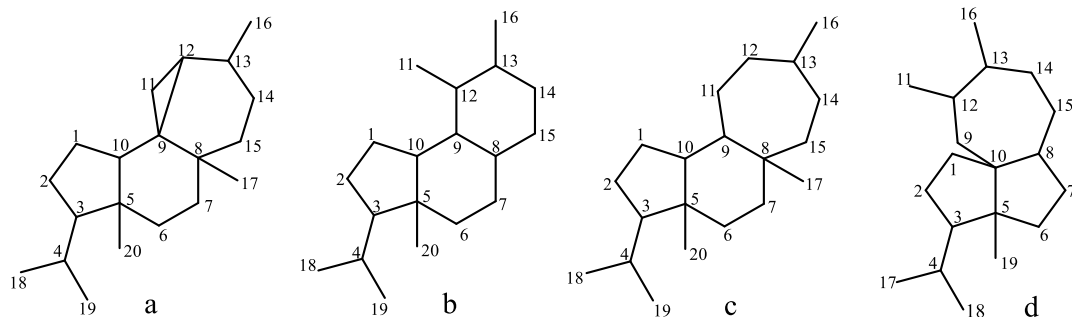


Figura 7: Esqueletos descritos para las especies de la Tribu Mulinæ. a) Azorellano, b) Yaretano, c) Mulinano y d) Madreporano.

Específicamente, desde *Azorella compacta*, se han logrado separar y purificar diterpenos con esqueleto mulinano y azorellano (ver Figura 8), los que han sido estudiados para conocer completamente su estructura y la posible actividad biológica que presenten<sup>[50-65]</sup>.

Como se observa en la Figura 8 la mayoría de los diterpenos presentan una función carboxílica entre los anillos de cinco y seis miembros, donde se ubica el carbono veinte, esto es una característica del esqueleto mulinano, pues en las estructuras del esqueleto tipo azorellano no se ve esta oxidación. Sin embargo, para todos los diterpenos aislados, existen variaciones considerables en la funcionalización del cicloheptano, donde es posible observar cetonas, hidroxilos e insaturaciones, entre otras. Sólo en los esqueletos tipo azorellano se han determinado modificaciones en el anillo central de seis carbonos.

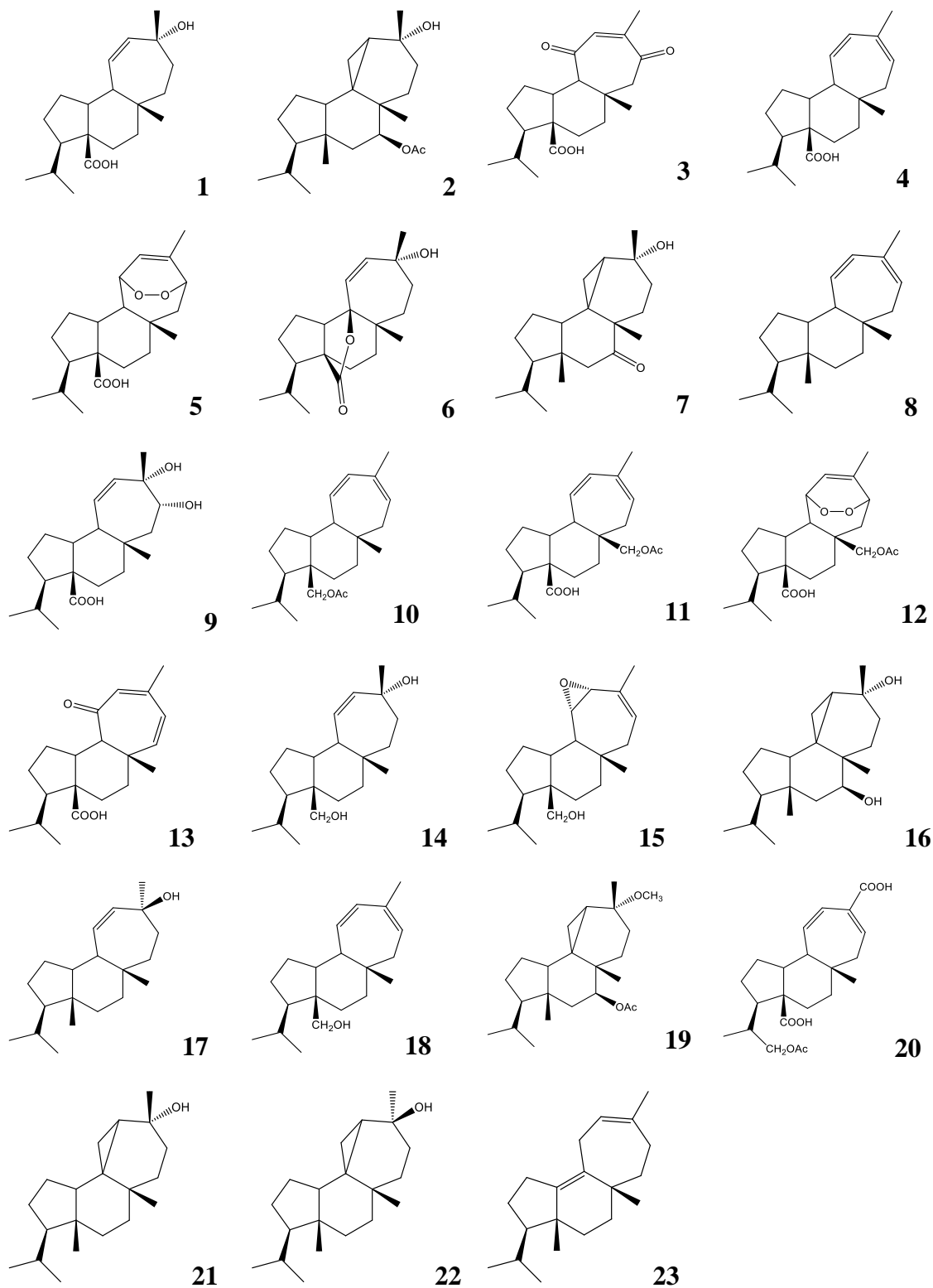


Figura 8: Diterpenos aislados desde *Azorella compacta*.

Además de determinar si estos diterpenos presentan actividad biológica, se realizaron transformaciones para determinar si es posible aumentar dicha actividad. Las modificaciones que se realizaron siguieron dos caminos, uno químico y el otro biológico, este último considerado principalmente por su selectividad. Las biotransformaciones son definidas como cualquier transformación química de una sustancia por un organismo vivo o preparaciones de estos, como caldo de bacterias, cianobacterias, levaduras, microalgas, hongos, plantas e incluso células animales. Estos organismos absorben las estructuras ya sea para asimilarlas como alimentos o para eliminarlas como producto excretable<sup>[66]</sup>.

Las biotransformaciones pueden ser modificaciones netamente químicas (alteración de pH, hidrólisis, entre otras), o por vía bioquímica, con participación directa de enzimas<sup>[67]</sup>. La garantía de este método es la posibilidad de conseguir nuevos compuestos regio y estereoselectivos, bajo condiciones suaves pudiendo ser considerados como “naturales”<sup>[68,69]</sup>.

En el caso particular de los diterpenos de *A. compacta*, se llevaron a cabo reacciones usando enzimas como oxigenasas y peroxidasas, siendo de mayor interés las hidroxilaciones selectivas<sup>[70]</sup>.

Dentro de las transformaciones químicas que se llevaron a cabo están las reacciones de deshidrataciones, hidroxilaciones, esterificaciones, entre otras<sup>[53,54]</sup>.

## 2.5 Antecedentes de Actividad Biológica de *Azorella compacta*

Los estudios han abarcado diversas áreas de la salud, entre ellas la actividad antiparasitaria, centrándose específicamente en la enfermedad de Chagas.

El Chagas, o tripanosomiasis americana, es una enfermedad potencialmente mortal causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, el que es transmitido por un insecto de la clase de los triatomíneos conocido como “vinchuca”, “chipo”, “chirimacha”, etc, por transfusiones de sangre, transplantes, entre otros<sup>[69]</sup>. La enfermedad afecta a las zonas de más bajo desarrollo socioeconómico y a una amplia gama de especies mamíferas incluyendo humanos, de las que cerca de 8 millones están infectados y otros 25 millones están en riesgo de contaminación<sup>[71,72]</sup>.

Se evaluó *in vitro* la actividad de los diterpenos **2** y **4** (ver Figura 9) sobre los estados amastigote, epimastigote y tripomastigote de las cepas Tulahuen, SPA-14 y G, y del clon Brener de *Trypanosoma cruzi*, dando resultados positivos<sup>[56,73]</sup>.

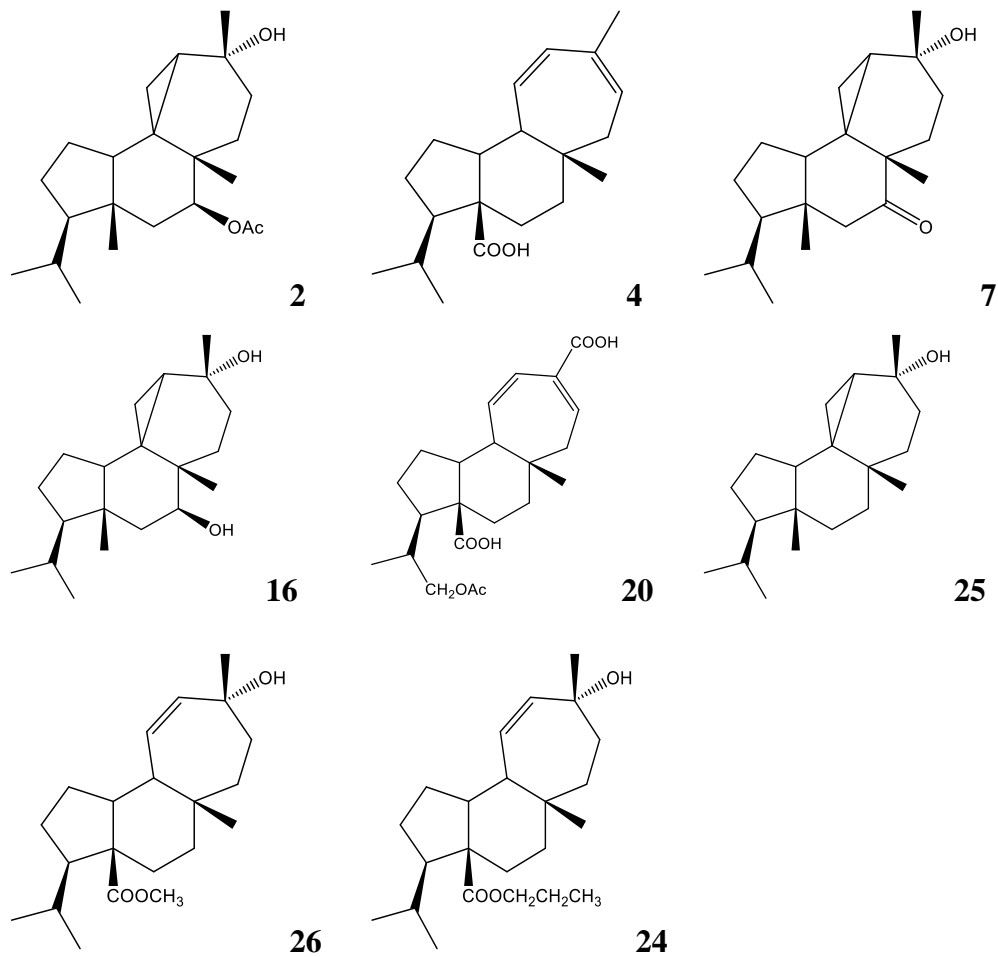


Figura 9: Diterpenos que presentan actividad biológica.

Se estudió la actividad de los diterpenos de *A. compacta* como anticonceptivo utilizándose como espermicida químico. Este tipo de espermicidas actúan inmovilizando o matando al espermatozoide para evitar que ingrese al útero o su contacto con el óvulo. Se presentan como jaleas, cremas, espumas u óvulos, usándose como sistema complementario a los anticonceptivos de barrera<sup>[74]</sup>.



Se estudió el diterpeno **7** (ver Figura 9), el cual inhibió significativamente la unión del espermatozoide a la zona pelúcida humana, incluso con una concentración de 0,015 mM, y se observó un fuerte efecto sobre la motilidad espermática<sup>[59]</sup>.

Se comprobó la propiedad hipoglucemiante de *Azorella compacta* usando infusiones de a una concentración de 40% p/v. Además se estudiaron tres diterpenos aislados desde la planta donde dos de ellos, el diterpeno **2** y **16** (ver Figura 9), presentan los efectos deseados<sup>[60]</sup>.

El diterpeno **2** (ver Figura 9) presentó una gran actividad antiinflamatoria de forma tópica, incluso con un efecto es similar al de la referencia<sup>[65]</sup>.

También se realizaron estudios para conocer la actividad antimicrobiana de los metabolitos secundarios de *A. compacta*, enfocándose principalmente en la enfermedad de tuberculosis. La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium tuberculosis*, una bacteria que ataca preferentemente a los pulmones, y está presente en todo el mundo aunque, en la actualidad, el mayor número de casos han sido en Asia sudoriental y Regiones del Pacífico occidental. Sólo en el año 2014 9,6 millones de personas enfermaron de tuberculosis y 1,5 millones murieron a causa de ella<sup>[75]</sup>.

Para determinar la actividad antibacteriana se utilizaron diterpenos naturales y semisintéticos. Uno de los derivados, el diterpeno **24** (ver Figura 9), es el más activo contra dos cepas de *M. tuberculosis*. Por otro lado el compuesto

natural **7** (ver Figura 9) también resultó ser muy activo contra las cepas de esta bacteria, seguido de los diterpenos **2**, **25** y **26** (ver Figura 9)<sup>[54,76]</sup>.

De forma general se determinó que el extracto acuoso de *Azorella compacta* presenta una alta actividad antioxidante a una concentración de 0,1-0,3% p/v<sup>[77]</sup>.

Recientemente se han realizado estudios sobre el efecto de los diterpenos de *A. compacta* sobre úlceras gástricas. Las úlceras pépticas son lesiones en la piel o membrana mucosa que recubre el sistema digestivo. Son llagas abiertas en forma de cráter que pueden presentarse en el estómago (úlcera gástrica) o intestino delgado (úlceras duodenales). Las causas que provocan las úlceras son la presencia de la bacteria *Helicobacter pylori*, reflujo duodeno-gástrico, estrés, exceso de ácido y los fármacos, entre otras.

Se ha determinado que los diterpenos **2**, **20** y **25** (ver Figura 9), tienen una considerable actividad gastroprotectora, mostrando una efectividad comparable con la referencia<sup>[62]</sup>.

## 2.6 Antecedentes ensayos antibacterianos.

En la naturaleza existen dos tipos de células, las procariotas y las eucariotas; las primeras menos evolucionadas, encontrándose solo como seres unicelulares y constituyen las bacterias. El resto de los organismos uni y pluricelulares están conformados por células eucariotas.

Se cree que todos los organismos evolucionaron a partir de un procariote común a través de un proceso de mutación y selección natural. La célula procariota (pre-núcleo) es el organismo celular más simple, está formada por un único compartimiento citoplasmático que contiene todos los componentes celulares, el material genético se encuentra compactado y carece de una membrana nuclear. Las células procariotas tienen una pared celular que brinda rigidez, y se dividen mediante bipartición<sup>[78,79]</sup>.

Aunque algunos grupos de células procariotas presentan diferencias estructurales entre sí, son diferencias relativamente pequeñas, por lo tanto, las células procariotas o bacterias muestran una gran uniformidad en forma y tamaño.

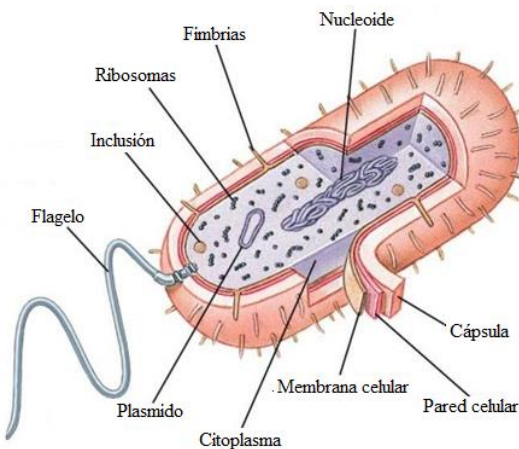


Figura 10: Estructura de las bacterias.

Las bacterias poseen un tamaño entre 2 – 10  $\mu\text{m}$ , tienen su citoplasma repleto de ribosomas y su material genético forma un conglomerado denominado nucleóide carente de membrana nuclear (ver Figura 10). Tienen una membrana citoplasmática y además una pared celular dura y elástica, de 10 a 25  $\mu\text{m}$  de espesor, que según su composición y estructura

se pueden clasificar en Gram-positivas y Gram-negativas. Las bacterias Gram-positivas tienen una pared celular compuesta por varias capas de peptidoglicano, además contiene ácidos teicoicos compuestos principalmente por un alcohol y fosfato. En cambio, las bacterias Gram-negativas están compuestas por una o muy pocas capas de peptidoglicano y una membrana externa de lipopolisacáridos, lipoproteínas y fosfolípidos. Entre ambas capas se encuentra el periplasma, sustancia gelatinosa con una alta concentración de enzimas degradantes y proteínas de transporte. Las bacterias Gram-negativas carecen de ácidos teicoicos<sup>[80,81]</sup> (ver Figura 11).

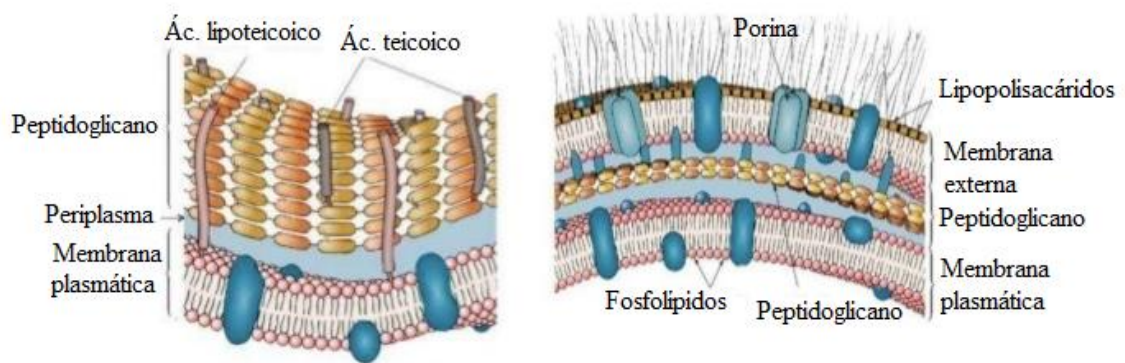


Figura 11: Pared celular de las bacterias Gram-positivas (izq.) y Gram-negativas (der.).

Algunas bacterias presentan una cápsula rodeando la pared celular compuesta por polisacáridos y fosfatos, cumple la función de proteger a la bacteria de la desecación y de los materiales tóxicos del medio ambiente, y promueve la concentración de nutrientes en la superficie celular. Las bacterias también pueden presentar flagelos, apéndices filamentosos helicoidales de unos 15 a 25  $\mu\text{m}$  de largo que surgen de la membrana citoplasmática y se extienden a través de la pared celular hasta el medio.

Está compuesto por subfibrillas de la proteína flagelina y son cumplen la función de brindar movilidad a las bacterias.

Existen unos apéndices finos y rígidos, llamados fimbrias (pili), que se encuentran casi exclusivamente en la membrana celular de las bacterias Gram-negativas, miden de 3 a 25 nm de diámetro y de 10 a 20  $\mu\text{m}$  de largo y están compuestos por una proteína llamada fimbrilina. Las fimbrias son responsables de la adherencia y hemaglutinación de las bacterias<sup>[82,83]</sup>.

Por su morfología las bacterias se clasifican en “cocos”, cuando tienen forma redondeada, “bacilos”, cuando muestran morfología cilíndrica o alargada y “espirilos” si tienen forma de espiral. Al reproducirse, las bacterias se agrupan dando lugar a formaciones típicas: los cocos se agrupan en parejas (*Neisseria*), en cadenas (*Streptococcus*), en racimos (*Staphylococcus*) y en tétradas (*Micrococcus*); los bacilos se agrupan en parejas, formando cadenas (*Bacillus anthracis*), en empalizada (*Listeria*) y en letras o caracteres (*Corynebacterium*); los espirilos no se agrupan pero si se presentan con una sola curva (*Vibrio*) o con más de una curva (*Espiroquetas*)<sup>[83]</sup>.

Para el desarrollo del metabolismo algunas bacterias necesitan oxígeno (bacterias aeróbicas), para otras el oxígeno puede ser letal (bacterias anaeróbicas), mientras que hay un tercer grupo que pueden multiplicarse tanto en presencia como en ausencia de oxígeno (bacterias facultativas)<sup>[84]</sup>.

En 1867, Robert Koch aísla el bacilo del Ántrax, comprobando que existían microorganismos con vida que eran capaces de provocar enfermedades,

describiendo los resultados de sus investigaciones en 1876. En 1882, Koch logra aislar el bacilo de la tuberculosis, y al año siguiente, el del cólera<sup>[85]</sup>.

Las bacterias que producen enfermedades se conocen como patógenas (*phatos*: enfermedad), mientras que al organismo causante de las enfermedades se le conoce como agente etiológico (*aitia*: causa).

Las bacterias pueden causar enfermedades mediante dos formas: por la invasividad, que corresponde a la habilidad del microorganismo de proliferar en un huésped, o por su toxicidad asociada a la habilidad de producir sustancias químicas (toxinas) que dañan los tejidos del huésped. Hay bacterias que ocupan ambos mecanismos para provocar enfermedades mientras que otras son únicamente invasivas o toxigénicas.

La mayoría de las enfermedades por bacterias se conocen como infecciosas o contagiosas, diseminándose entre la población a través de diferentes medios como los alimentos, el agua, el aire, por contacto directo con una persona infectada, por picaduras o mordeduras de animales o insectos, o por contacto con objetos inanimados contaminados<sup>[86]</sup>.

Debido a estas enfermedades que siguen afectando de forma constante a la población mundial a causa de microorganismos que se hacen resistentes a los fármacos utilizados, es que es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas para la síntesis de medicamentos. La opción frecuente para el desarrollo de estas nuevas rutas son los productos naturales, especialmente obtenidos a partir de plantas, ya que son estas las que se han utilizado desde las primeras civilizaciones como medicina alternativa.

Es por esto, y basándose en la información obtenida acerca de las características medicinales de *Azorella compacta* que nos han brindado

tanto los pueblos andinos, como las pruebas desarrolladas *in vitro* en laboratorio, es que es de gran interés ampliar las investigaciones y la información que se conoce actualmente sobre los metabolitos secundarios de *A. compacta*, específicamente sus diterpenos, y su potencial bioactividad.

## **HIPÓTESIS**



Basados en la información reseñada en la sección anterior se plantean las siguientes hipótesis:

1. Los diterpenos mayoritarios de *A. compacta* presentan propiedades antibacterianas.
2. La actividad biológica de los diterpenos se incrementa al realizar transformaciones químicas.
3. Mediante el uso de soluciones micelares se incrementa la hidrofilia de los diterpenos, aumentando la actividad biológica.

## **OBJETIVOS**

#### 4.1 Objetivo general

- Modificaciones semi-sintéticas de diterpenos mayoritarios aislados de *A. compacta* y determinación de actividad biológica.

#### 4.2 Objetivos específicos

- Aislamiento e identificación de los diterpenos mayoritarios de *Azorella compacta*.
- Transformaciones químicas sobre diterpenos (deshidrataciones, oxidaciones, esterificaciones, reducciones y modificaciones de solubilidad).
- Determinación estructural de los nuevos derivados de diterpenos.
- Evaluaciones de la actividad antibacteriana.

CAPÍTULO II

**PARTE EXPERIMENTAL**

## 5.1 Consideraciones generales

### Cromatografía en Columna:

Las columnas del tipo *flash* y presión normal se realizaron con gel de sílice Merck 60 G tamaño partícula 10 – 15  $\mu\text{m}$  (fina) y P60 tamaño partícula 40-63  $\mu\text{m}$  (mediana). Los eluyentes utilizados fueron acetato de etilo y éter de petróleo en gradiente de polaridad.

### Cromatografía en capa fina:

Se realizaron en placas cromatográficas Merck 60 GF<sub>254</sub>. Fueron eluidas con mezclas de acetato de etilo y éter de petróleo en diferentes proporciones, para posteriormente ser visualizadas con luz UV (254 nm). Las placas se revelaban con rociándolas con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/MeOH 10%, para luego calentarlas a una temperatura de 100°C durante unos segundos.

### Cromatografía en capa preparativa (o gruesa):

Realizadas en placas cromatográficas Merck 60 F<sub>254</sub> 20 x 20 cm, de 1 y 2 mm de espesor, eluidas con mezclas de éter de petróleo y acetato de etilo en diferentes proporciones. Fueron reveladas visualizándolas bajo luz UV (254 nm) y en el caso de ser necesario, rociándolas con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/MeOH 10%, para luego calentarlas a una temperatura de 100°C.

HPLC preparativa:

La purificación de compuesto se llevó a cabo en el equipo ISOLERA Biotage HPLC preparativa, con columnas Biotage HP-sphere 25  $\mu\text{m}$  de 10 y 25 gramos. Como eluyente se utilizaron mezclas en gradiente de éter de petróleo/acetato de etilo y diclorometano/metanol, aumentando la polaridad, según las características de solubilidad de los compuestos a separar.

Punto de Fusión (p.f.):

Fueron determinados con un equipo Thermo Scientific.

Espectros de Infrarrojos (IR):

Los espectros de IR fueron registrados en discos de KBr con frecuencias comprendidas entre 500-4000  $\text{cm}^{-1}$ , en un espectrómetro Bruker, en el Laboratorio de Química Espectroscopica Vibracional (Departamento de Química) de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

Espectros de Resonancia Magnética Nuclear ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HMBC, HMQC y NOESY):

Los espectros de RMN fueron registrados en soluciones de  $\text{CDCl}_3$  (salvo que se especifique otro solvente), y utilizando TMS como referencia interna de desplazamiento químico, operando a las frecuencias de 400,13 MHz y 100,62 MHz en la Unidad Central de Instrumentación de la Facultad de Química de la Universidad Católica de Chile. El equipo utilizado es un espectrómetro Bruker Avance.

## 5.2 Abreviaciones de RMN

s	: singulete
d	: doblete
t	: triplete
da	: doblete ancho
dd	: doble doblete
dt	:doble triplete
ddd	: doblete de doble doblete
m	: multiplete
sa	: señal ancha
DEPT	: Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (Aumento sin Distorción por Transferencia de Polarización)
NOESY	: Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (Espectroscopía Nuclear de Efecto Overhauser)
HMBC	: Heteronuclear Multiple Bond Correlation (Correlación Heteronuclear de Múltiples Enlaces)
HMQC	: Heteronuclear Multiple Quantum Correlation (Correlación Heteronuclear Múltiple Cuántica)

### 5.3 Abreviaciones químicas

HPLC	: High-Performance Liquid Chromatography (Cromatografía Líquida de Alta Eficacia)
CCF	: Cromatografía en Capa Fina
CCP	: Cromatografía en Capa Preparativa
AMCPB	: Ácido <i>meta</i> -cloroperoxibenzoico
DMSO	: Dimetilsulfóxido
AcOEt	: Acetato de etilo
E.P.	: Éter de petróleo
MeOH	: Metanol
TMS	: Trimetilsilano
DCM	: Diclorometano
THF	: Tetrahidrofurano



#### 5.4 Abreviaciones biológicas

IPPF	: Pirofosfato de isopentenilo
DMAPF	: Pirofosfato de dimetilalilo
HMG-CoA	: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA
M5PF	: 5-pirofosfato del ácido mevalónico
GPF	: Pirofosfato de geranilo
FPF	: Pirofosfato de farnesilo
GGPF	: Pirofosfato de geranilgeranilo
MEF	: Fosfato de metileritritol
ARN	: Ácido ribonucleico
AND	: Ácido desoxirribonucleico
TBC	: Tuberculosis
MH	: Mueller Hinton
UFC	: Unidad formadora de colonias
MIC	: Minimum Inhibitory Concentration (Concentración Inhibitoria Mínima)

### 5.5 Recolección de *Azorella compacta*

El día 7 de mayo del año 2013, a las 9:00 horas aproximadamente, se recolectó *Azorella compacta* desde el altiplano de la segunda Región de Antofagasta, específicamente en el sector del Tatio a 4.200 msnm, la planta se trasladó inmediatamente a Santiago para comenzar con las extracciones. Una vez en Santiago, la planta se separó en hojas y tallos, se dejó secar a temperatura ambiente, evitando la exposición directa al sol, durante 3 días, y luego realizó la extracción de la parte aérea (4,3 kg). Una muestra de la especie fue dejada en el Herbario del Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, bajo el código n° 0513<sup>[87]</sup>.

Se comenzó a extraer con éter de petróleo y posteriormente con acetato de etilo, en tres ocasiones con cada solvente, luego de obtenidos los extractos se llevaron a sequedad bajo presión reducida en un rotavapor<sup>[58]</sup>. Se obtuvieron cuatro extractos, tres con éter de petróleo (127 g, 2,9%; 51 g, 1,18%; 15 g, 0,34%), y un extracto de acetato de etilo (95 g, 2,2%), los cuales fueron guardados en frío para su conservación.

Se tomó una fracción del extracto de éter de petróleo (127 g) el cual presentaba un color verde oscuro y un aspecto aceitoso muy denso. En primer lugar se observó un precipitado de color blanco amarillento, cuando a la muestra se le adicionó metanol, por lo que se comenzó con la separación de este compuesto, el cual se determinó mediante RMN <sup>1</sup>H, que eran grasas sin interés

Una vez separado este compuesto se comenzó a preparar la primera cromatografía en columna *flash* (C1). Se disolvió el crudo (95 g) en diclorometano y se impregnó sobre la menor cantidad posible de sílica gel fina. Se compactó la sílica en una columna *flash* y se montó la cabeza para comenzar a eluir la fase líquida, que consistía en una mezcla en gradiente de éter de petróleo y acetato de etilo, comenzando con éter 100%, en cantidades de 400 mL.

Los extractos fueron concentrados y comparados mediante cromatografía en capa fina (CCF) para combinarlos en el caso de que presentaran una composición semejante de compuestos. Se finalizó la columna *flash* eluyendo MeOH para arrastrar los compuestos más polares y secarla completamente. Se obtuvo en total de 10 fracciones (10,3 g, 10,8%; 18,4 g, 19,3%; 13,6 g, 14,3%; 8,1 g, 8,5%; 3,3 g, 3,5%; 4,8 g, 5,1%; 11,9 g, 12,5%; 12,1 g, 12,7%; 4,9 g, 5,2%; 1,3 g, 1,4%).

## 5.6 Descripción de compuestos

### Ácido mulinólico (1)

Mientras se desarrollaba la columna *flash* (C1) se separó un sólido que sólo se disolvía en MeOH, este fue recristalizado en DCM y se registró espectro RMN <sup>1</sup>H para identificarlo. Se determinó, mediante el espectro de RMN <sup>1</sup>H, y por comparación en CCF con patrones obtenidos anteriormente desde *A. compacta*, que el sólido correspondía a 1,7 g (1,78%) de ácido mulinólico (ver Figura 12).

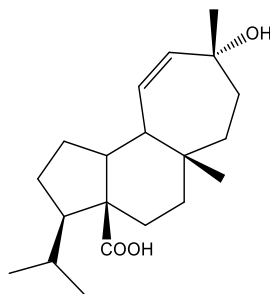


Figura 12: Estructura ácido mulinólico.

Compuesto **1**. P.f.: 178-180°C; RMN  $^1\text{H}$   $\delta$  (ppm): 0,86 (d,  $J = 5,8$  Hz, 3H, H-18); 0,94 (s, 3H, H-17); 1,04 (d,  $J = 5,8$  Hz, 3H, H-19); 1,32 (s, 3H, H-16); 5,23 (dd,  $J = 8,2$  y 12,9 Hz, 1H, H-11) y 5,44 (d,  $J = 12,9$  Hz, 1H, H-12).

#### Azorellanol (**2**)

En la fracción siete, obtenida desde la columna C1, de polaridad 5-10% E/A se observaron precipitados que fueron comparados entre sí. El sólido fue recristalizado y se registró espectro RMN  $^1\text{H}$ . A través de la espectroscopía y la comparación en CCF con patrones de diterpenos aislados anteriormente, se determinó que el sólido recristalizado era azorellanol (3,9 g, 32,8%; ver Figura 13).

Compuesto **2**. P.f.: 149°C; RMN  $^1\text{H}$   $\delta$  (ppm): 0,13 (t,  $J = 5,6$  Hz), 1H, H-12); 0,69 (ddd,  $J = 1,1, 6,0$  y 9,8 Hz, 1H, H-11 $\beta$ ); 0,78 (dd,  $J = 5,6$  y 9,8 Hz, 1H, H-11 $\alpha$ ); 0,91 (s, 3H, H-20); 2,03 (s, 3H, OAc); 2,20 (dd,  $J = 7,0$  y 13,8 Hz, 1H, H-6 $\alpha$ ); 2,40 (dd,  $J = 7,1$  y 12,4 Hz, 1H, H-10) y 5,28 (dd,  $J = 7,0$  y 11,4 Hz, 1H, H-7).

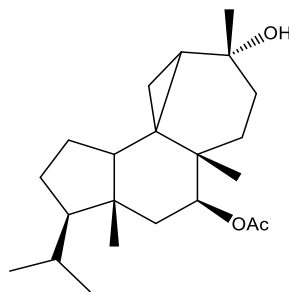


Figura 13: Estructura azorellanol.

Se tomó la fracción ocho de la columna C1, con una masa de 12,1 g, que presentaba un precipitado incoloro entre un aceite amarillo muy denso, para comenzar con la separación de los compuestos haciendo en primer lugar una columna cromatográfica a presión normal (C2) usando sílica gel mediana como fase estacionaria y una mezcla en gradiente de E.P. y AcOEt como fase móvil.

### Ácido mulin-12-en-11,14-diona-20-oico (3)

Se tomó una de las fracciones obtenidas de la columna C2 para realizar una nueva columna cromatográfica (C3), donde en las fracciones finales se observó la presencia de un sólido. Se combinaron las fracciones y se insertaron en el equipo HPLC preparativa, para aislar el compuesto de interés. Se depositaron 350 mg de mezcla a separar, obteniéndose 65 mg (18,57%) de un sólido amarillo suave. Se determinó la estructura del diterpeno mediante espectroscopía RMN  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  (ver Figura 14).

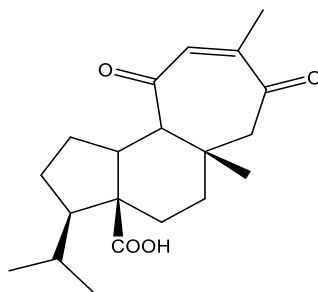


Figura 14: Estructura del ácido mulin-12-en-11,14-diona-20-oico.

Compuesto **3**. P.f.: 181-182°C; IR (cm<sup>-1</sup>): 3434, 1685, 1681 y 1674; RMN <sup>1</sup>H δ (ppm): 0,87 (d, *J* = 5,5 Hz, 3H, H-18); 1,03 (d, *J* = 5,5 Hz, 3H, H-19); 1,06 (s, 3H, H-17); 2,01 (s, 3H, H-16); 2,15 (m, 1H, H-10); 2,44 (d, *J* = 13,3 Hz, 1H, H-15β); 2,74 (d, *J* = 12,4 Hz, 1H, H-9); 3,30 (d, *J* = 13,3 Hz, 1H, H-15α) y 6,29 (s, 1H, H-12). RMN <sup>13</sup>C δ (ppm): 20,27 (c); 22,28 (c); 22,64 (c); 24,36 (t); 28,60 (t); 28,92 (c); 31,65 (t); 32,50 (d); 35,67 (s); 40,91 (t); 48,44 (d); 53,16 (t); 57,24 (s); 57,52 (d); 62,82 (d, C-9); 133,31 (d, C-12); 147,26 (s, C-13); 178,40 (s, C-20); 202,06 (s, C-14) y 202,35 (s, C-11).

#### Ácido mulin-11,13-dien-20-oico (**4**)

Se realizó una cuarta columna cromatográfica (C4), utilizando sílica gel fina como fase estacionaria y mezcla de P.E./AcOEt como eluyente, para separar los compuestos de la fracción dos de la columna C1. Esta fracción presentaba un aspecto sólido de color amarillo con una masa de 18,4 gramos. De la columna C4 se separó un compuesto sólido de color blanco conocido como ácido mulin-11,13-dien-20-oico (2,3 g, 12,5%; ver Figura 15).

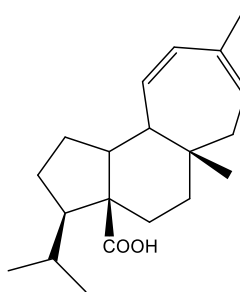


Figura 15: Estructura del ácido mulin-11,13-dien-20-oico.

Compuesto **4**. P.f.: 85°C; RMN  $^1\text{H}$  (ppm): 1,66 (dd,  $J = 7,6$  y 14,0 Hz, 1H, H-15); 1,77 (m, 1H, H-10); 2,38 (dd,  $J = 5,6$  y 9,5 Hz, 1H, H-9); 5,65 (dd,  $J = 5,6$  y 12,4 Hz, 1H, H-11); 5,51 (d,  $J = 7,6$  Hz, 1H, H-14) y 5,73 (d,  $J = 12,4$  Hz, 1H, H-12).

#### Ácido mulínico (**5**)

Se tomó la fracción seis de la columna C1 (4,8 g) y se llevó a cabo una quinta columna cromatográfica (C5) utilizando P.E./AcOEt en gradiente como eluyente. Mediante CCF se determinó la presencia de un compuesto en abundancia el cual fue separado por cromatografía HPLC preparativa con mezcla de solventes en gradiente de E.P./AcOEt. Se obtuvo un sólido incoloro descrito como ácido mulínico (140 mg, 2,9%; ver Figura 16).

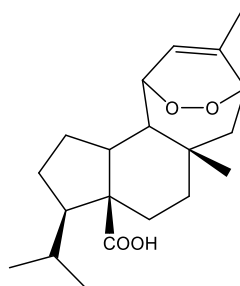


Figura 16: Estructura del ácido mulínico.

Compuesto **5**. P.f.: 185-186°C; RMN <sup>1</sup>H (ppm): 1,71 (ddd, *J* = 3,6, 11,2 y 15,4 Hz, 1H, H-15β); 2,11(td, *J* = 8,4, 11,7 y 11,8 Hz, 1H, H-10); 2,26 (d, *J* = 15,4 Hz, 1H, H-15α); 4,37 (d, *J* = 3,6 Hz, 1H, H-14); 4,56 (m, 1H, H-11) y 6,10 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H, H-12).

### Lactona del ácido mulin-9-hidroxi-11-en-20-oico (**6**)

Se tomó la fracción siete de la columna cromatográfica C5, la cual tenía un peso de 437 mg, observándose la presencia de un compuesto de color amarillo intenso, el cual se comparó mediante CCF con patrones de diterpenos descritos. El compuesto correspondió a una lactona aislada recientemente la cual se separó mediante HPLC preparativa usando como solvente E.P./AcOEt en gradiente, obteniéndose 34 mg (7,8% rendimiento, ver Figura 17).

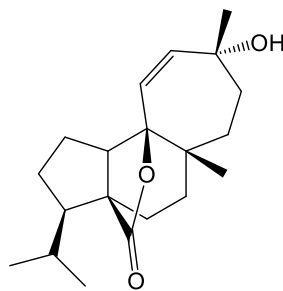


Figura 17: Estructura de lactona del ácido mulin-9-hidroxi-11-en-20-oico.

Este compuesto se aisló recientemente desde extractos de *A. madreporica*, como un nuevo diterpeno, la información referente a su estructura está en proceso de publicación. En esta oportunidad se aisló por primera vez en *A. compacta*.



Compuesto **6**. IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3488 y 1748; RMN  $^1\text{H}$   $\delta$  (ppm): 0,84 (d,  $J = 5,7\text{Hz}$ , 3H, H-18); 1,01 (s, 3H, H-17); 1,06 (d,  $J = 5,7\text{ Hz}$ , 3H, H-19); 1,32 (s, 3H, H-16); 2,59 (dt,  $J = 13,0\text{ Hz}$ , 1H, H-15 $\alpha$ ); 3,07 (t,  $J = 8,6$ , 1H, H-10); 5,62 (d,  $J = 12,3\text{Hz}$ , 1H, H-11) y 5,68 (d,  $J = 12,3\text{ Hz}$ , 1H, H-12). RMN  $^{13}\text{C}$   $\delta$  (ppm): 70,10 (s, C-13); 91,89 (s, C-9); 134,86 (d, C-11); 135,08 (d, C-12) y 179,3 (s, C-20).

### Epiazorellanol (**27**)

En ciertas fracciones de la columna C2 precipitó el sólido transparente que correspondía a una mezcla de azorellanol y su epímero. En primera instancia se separó 14 mg (0,12% rendimiento) de epiazorellanol (ver Figura 18) para realizar espectroscopía RMN.

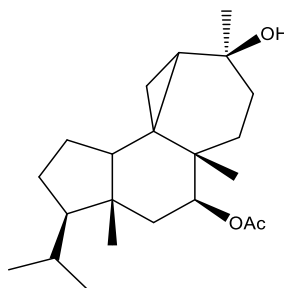


Figura 18: Estructura de epiazorellanol.

Compuesto **27**. P.f.:  $183^\circ\text{C}$ ; RMN  $^1\text{H}$   $\delta$  (ppm): 0,47 (sa, 1H, H-12); 0,76 (sa, 2H, H-11); 0,91 (s, 3H, H-20); 2,03 (s, 3H, OAc); 2,18 (dd,  $J = 7,0$  y  $13,8\text{ Hz}$ , 1H, H-6 $\alpha$ ); 2,35 (dd,  $J = 7,1$  y  $12,5\text{ Hz}$ , 1H, H-10) y 5,20 (dd,  $J = 7,0$  y  $11,4\text{ Hz}$ , 1H, H-7).

## Ácido epimulinólico (28)

El ácido epimulinolico (ver Figura 19) precipitó mientras se desarrollaba la columna cromatográfica C2. El sólido, que sólo se disuelve en MeOH, se recristalizó con DCM, obteniéndose 260 mg de cristales incoloros (2,2% rendimiento). Se determinó la estructura mediante la comparación del compuesto con un patrón anteriormente aislado y descrito, y con datos de literatura<sup>[88]</sup>.

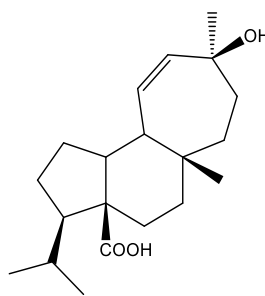


Figura 19: Estructura del ácido epimulinólico.

## Ácido 16-normulin-11-en-13-ona-20-oico (29)

Se insertaron 300 mg de una mezcla de compuestos en el equipo HPLC preparativa para separar una mayor cantidad de azorellanol (**2**). Además de obtener el compuesto **2**, se obtuvieron 15 mg del compuesto **29** (5% rendimiento, ver figura 20), un sólido incoloro al que se le realizó espectroscopía  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -RMN, IR y masa.

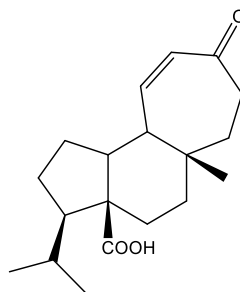


Figura 20: Estructura del ácido 16-normulin-11-en-13-ona-20-oico.

Compuesto **29**. P.f.: 105-107°C; UV/Vis  $\lambda_{\max}$  (MeCN) nm ( $\log \epsilon$ ): 232,5; IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3424, 1692 y 1639; HRMS-FAB:  $m/z$  [ $M + H^+$ ] Calculado para  $C_{19}H_{28}O_3$ : 304,2, Encontrado: 304,0; EIMS  $m/z$  (%): 304,0 [ $M^+$ ] (21,94), 291,0 (14,18), 276,0 (98,90), 258,0 (34,40), 242,90 (26,58), 229,0 (14,81), 221,0 (41,42), 215,0 (100,0), 203,0 (25,94), 189,0 (32,63), 175,0 (48,65), 161,0 (19,80), 147,0 (30,19), 123,0 (50,12), 105,0 (49,58), 95,0 (48,51), 91,0 (54,68), 79,0 (52,51), 67,0 (36,49), 55,0 (72,05); RMN  $^1H$   $\delta$  (ppm): 0,87 (d,  $J = 5,9$  Hz, 3H, H-18); 1,05 (d,  $J = 5,9$  Hz, 3H, H-19); 1,08 (s, 3H, H-17); 1,20 (ddd,  $J = 4,9, 9,1$  y  $12,2$  Hz, 1H, H-15); 1,47 (ddd,  $J = 4,6, 9,0$  y  $12,3$  Hz, 1H, H-15); 1,51 (d,  $J = 6,8$  Hz, 1H, H-6); 1,83 (ddd,  $J = 3,6, 8,3$  y  $11,4$  Hz, 1H, H-10); 2,44 (dd,  $J = 6,5$  y  $11,4$  Hz, 1H, H-9); 2,53 (ddd,  $J = 4,3, 8,9$  y  $12,3$  Hz, 1H, H-14 $\beta$ ); 2,71 (ddd,  $J = 4,2, 8,7$  y  $12,4$  Hz, 1H, H-14 $\alpha$ ); 5,95 (d,  $J = 13,2$  Hz, 1H, H-12); 6,27 (dd,  $J = 6,5$  y  $13,2$  Hz, 1H, H-11) y 9,53 (s, 1H, H-20). RMN  $^{13}C$   $\delta$  (ppm): 22,8 (q, C-19); 23,0 (q, C-18); 25,1 (t, C-1); 27,3 (q, C-17); 29,0 (t, C-2); 29,2 (t, C-15); 32,1 (d, C-4); 32,5 (t, C-6); 36,0 (s, C-8); 39,9 (t, C-14); 42,5 (t, C-7); 50,8 (d, C-9); 51,7 (d, C-10); 57,6 (d, C-3); 58,6 (s, C-5); 131,0 (d, C-12); 146,3 (d, C-11); 180,0 (s, C-20) y 204,4 (s, C-13).

7-acetoxi-13-metoxiepiazorellano (**30a**) y 7-acetoxi-13-metoxiazorellano (**30b**)

Se impregnaron 50 mg de una mezcla de azorellanol y epi-azorellanol en 5 gramos de sílica gel mediana para luego calentar en una plancha calefactora durante un día. Al no observarse cambios en la reacción, por medio de CCF, se agregaron 50 mL de MeOH y se dejó bajo reflujo durante doce horas. Por medio de CCF se detectó la presencia de dos productos formados, los que fueron separados mediante HPLC preparativa, obteniéndose 6 mg del compuesto **30a** (12%, ver Figura 21) y 25 mg del compuesto **30b** (49%, ver Figura 22), ambos sólidos cristalinos de color blanco.

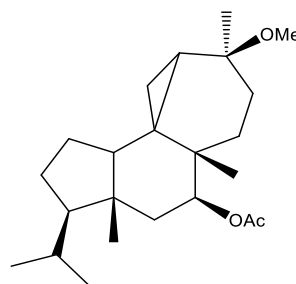


Figura 21: Estructura de 7-acetoxi-13-metoxiepiazorellano.

Compuesto **30a**. P.f.: 167°C; IR (cm<sup>-1</sup>): 1740; RMN <sup>1</sup>H δ (ppm): 0,48 (m, 1H, H-11); 0,63 (m, 1H, H-12); 0,75 (m, 1H, H-11); 1,29 (s, 3H, H-16); 2,05 (s, 3H, OAc); 2,20 (dd, *J* = 7,1 y 13,8 Hz, 1H, H-6α), 2,40 (m, 1H, H-10); 3,77 (s, 3H, MeO) y 5,05 (dd, *J* = 7,1 y 11,4 Hz, 1H, H-7).

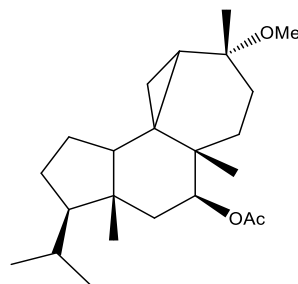


Figura 22: Estructura de 7-acetoxi-13-metoxiazorellano.

Compuesto **30b**. P.f.: 133-134°C; IR (cm<sup>-1</sup>): 1718; RMN <sup>1</sup>H δ (ppm): 0,11 (m, 1H, H-12); 0,71 (m, 2H señal solapada, H-11); 1,15 (s, 3H, H-16); 1,99 (s, 3H, OAc); 2,17 (dd, *J* = 7,1 y 13,8 Hz, 1H, H-6α); 2,37 (dd, *J* = 7,2 y 12,4 Hz, 1H, H-10); 3,13 (s, 3H, MeO) y 5,24 (dd, *J* = 7,1 y 11,3 Hz, 1H, H-7).

#### 7-acetoximulin-9,12-dieno (**31**)

Para la deshidratación y apertura del anillo de ciclopropano en azorellanol (**2**) se utilizaron tres ácidos diferentes para comparar los efectos de cada uno de ellos. En primer lugar se disolvieron 25 mg de azorellanol en 15 mL DCM para luego agregar gotas de ácido sulfúrico concentrado, la solución se torna de color café de forma inmediata y, a través de CCF, se determina la formación de producto. La reacción se neutraliza con una solución de NaOH 1,0 M y se separa en un embudo de decantación, para posteriormente secar las trazas de agua con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y extraer el solvente en un rotavapor. El compuesto **31** (ver Figura 23) fue separado mediante HPLC preparativa y luego fue determinado a través de espectroscopía RMN <sup>1</sup>H (13 mg: 56%).

En una segunda reacción se disolvieron 50 mg de azorellanol (**2**) en 30 mL MeOH, agregando 40 mg de AMCPB. La reacción se mantuvo con agitación magnética y a temperatura ambiente durante un día observándose por medio de CCF la formación del compuesto **31** (34 mg: 71%). Para terminar la reacción se neutralizó la solución con NaHCO<sub>3</sub> y se evaporó el metanol en un rotavapor. El producto se extrajo con tres porciones de DCM en un embudo de decantación, se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se evaporó el solvente al vacío.

Por último se llevó a cabo la misma reacción pero usando ácido *para*-toluensulfónico, donde se obtuvo el mayor rendimiento. Se disolvieron 50 mg de azorellanol (**2**) en 50 mL diclorometano y se adicionaron 40 mg del ácido, la reacción se mantuvo en reflujo, con agitación magnética durante tres horas, y se detuvo enfriándola y agregando una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> para neutralizar. El producto fue secado del mismo modo que la reacción anterior, obteniéndose 39 mg de un aceite incoloro (compuesto **31**, 84%).

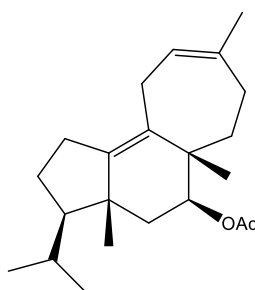


Figura 23: Estructura de 7-acetoximulin-9,12-dieno.

Compuesto **31**. IR (cm<sup>-1</sup>): 1732; RMN <sup>1</sup>H δ (ppm): 2,05 (s, 3H, OAc); 2,22 (dd, *J* = 5,6 y 13,8 Hz, 1H, H-6α); 2,47 (dd, *J* = 8,2 y 16,1 Hz, 1H, H-11); 2,74 (da, *J* = 16,2 Hz, 1H, H-11); 4,96 (dd, *J* = 5,6 y 10,5 Hz, 1H, H-7) y

5,41 (da,  $J = 8,2$ , 1H, H-12). RMN  $^{13}\text{C}$   $\delta$  (ppm): 21,25 (c); 21,36 (c); 22,44 (d), 22,86 (c); 22,97 (c); 25,44 (t); 25,63 (c); 27,28 (t); 27,63 (t); 30,01 (t); 30,87 (d); 34,39 (t); 35,34 (t); 41,04 (s), 43,06 (s); 54,51 (d); 72,66 (d, C-7); 121,41 (d, C-12); 131,85 (s, C-10); 136,62 (s, C-13); 142,03 (s, C-9) y 170,73 (s, OAc).

### 7-acetoxi-13- $\alpha$ -metoximulin-9-eno (**31a**)

De la reacción de azorellanol y AMCPB se separó un compuesto minoritario mediante HPLC preparativa, el sólido blanco aislado, fue descrito como 7-acetoxi-13- $\alpha$ -metoximulin-9-eno (5 mg: 10%, ver Figura 24).

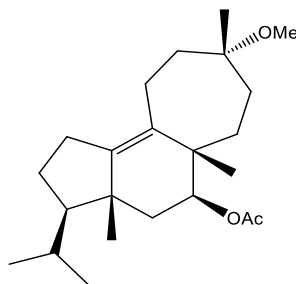


Figura 24: Estructura de 7-acetoxi-13- $\alpha$ -metoximulin-9-eno.

Compuesto **31a**. RMN  $^1\text{H}$   $\delta$  (ppm): 2,05 (s, 3H, OAc); 2,28 (dd,  $J = 6,3$  y 13,7 Hz, 1H, H-6 $\alpha$ ); 3,16 (s, 3H, MeO) y 4,83 (dd,  $J = 6,3$  y 11,3 Hz, 1H, H-7). RMN  $^{13}\text{C}$   $\delta$  (ppm): 21,39 (c); 21,90 (c); 22,40 (d); 22,80 (t); 23,05 (c); 23,35 (c); 24,58 (t); 25,71 (c); 27,20 (t); 28,01 (t); 31,01 (d); 31,36 (t); 35,62 (t); 40,67 (t); 40,77 (s); 43,15 (s); 48,77 (d); 54,18 (q, MeO); 72,54 (d, C-7); 74,48 (s, C-16); 132,97 (s, C-10); 144,08 (s, C-9) y 170,85 (s, OAc).

En la reacción de azorellanol (**2**) con ácido sulfúrico se separó un compuesto muy poco polar, y en baja cantidad, a través de cromatografía CCP. Se impregnaron 10 mg de la mezcla del compuesto en la placa preparativa y se eluyó con 100% éter de petróleo. Al compuesto cristalino aislado **31b** se le registró espectroscopía  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -RMN, HMBC y HMQC. Sin embargo, la información obtenida no permitió plantear una estructura definitiva.

Compuesto **31b**. RMN  $^1\text{H}$   $\delta$  (ppm): 0,80 (s, 3H); 0,89 (d,  $J = 5,8$  Hz, 3H); 0,92 (d,  $J = 5,8$  Hz, 3H); 1,55 (s, 2H); 1,66 (sa, 3H); 1,94 (dd,  $J = 1,7$  y 11,6 Hz, 1H); 2,13 (m, 1H); 2,56 (dd,  $J = 2,0$  y 4,2 Hz, 1H); 4,77 (t,  $J = 1,6$  Hz, 1H); 4,90 (t,  $J = 1,6$  Hz, 1H) y 5,10 (m, 1H). RMN  $^{13}\text{C}$   $\delta$  (ppm): 19,67 (c); 22,20 (c); 22,94 (c); 23,32 (c); 27,97 (t); 28,68 (t); 31,72 (d); 32,13 (t); 36,61 (d); 36,68 (d); 37,34 (d); 328,19 (t); 43,67 (s); 44,57 (t); 53,75 (d); 106,61 (t); 115,97 (d); 140,24 (s) y 158,06 (s).

### 7-desacetil-azorellanol (**16**)

Se disolvieron 500 mg de azorellanol (**2**) en 200 mL de MeOH, para luego agregar 600 mg de  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , manteniendo la solución con agitación magnética y bajo reflujo durante dos horas. La reacción se sigue mediante CCF, y una vez que se observa la formación de compuesto, se termina enfriándola y neutralizándola con HCl 0,1 M. Se seca el solvente de la solución en un rotavapor y se extrae el producto con tres porciones de DCM, se agrega  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se concentra al vacío. El producto se purificó a través de una columna HPLC preparativa, donde se obtiene 425 mg de un sólido cristalino incoloro (92%, ver Figura 25).



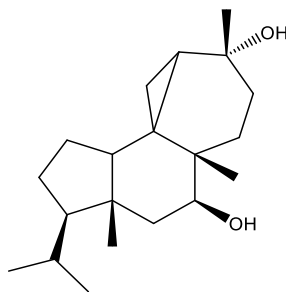


Figura 25: Estructura de 7-desacetil-azorellanol.

Compuesto **16**. P.f.: 157°C; IR (cm<sup>-1</sup>): 3351; RMN <sup>1</sup>H δ (ppm): 0,12 (t, *J* = 5,7 Hz, 1H, H-12); 0,65 (m, 1H, H-11); 0,77 (dd, *J* = 5,7 y 9,8 Hz, 1H, H-11); 2,22 (dd, *J* = 6,8 y 13,9 Hz, 1H, H-6α); 2,32 (dd, *J* = 7,1 y 12,5 Hz, 1H, H-10) y 4,04 (dd, *J* = 6,8 y 11,3 Hz, 1H, H-7). RMN <sup>13</sup>C δ (ppm): 12,13 (t); 17,62 (c); 17,98 (c); 21,01 (t); 22,46 (c); 22,95 (c); 25,84 (d); 26,86 (s); 28,15 (t); 30,43 (c); 31,27 (t); 31,79 (d); 32,44 (t); 35,29 (s); 42,53 (s); 43,61 (t); 47,38 (d); 58,96 (d); 70,34 (s) y 76,82 (d).

### Azorellanona (**7**)

A partir de azorellanol hidrolizado (**16**) se realizó una oxidación del alcohol secundario para obtener una cetona. Se disolvieron 50 mg del compuesto **16** en 20 mL acetona, y se agregaron 50 mg de KMnO<sub>4</sub> en 30 mL de agua, junto con 5 mL de ácido acético 90%. La solución se mantuvo con agitación magnética durante dos horas a temperatura ambiente sin observarse cambios. Se aumentó la temperatura a aproximadamente 45°C por una hora y luego se dejó sólo con agitación magnética durante toda una noche. La reacción se siguió mediante CCF y al confirmarse la formación de producto, se secó el solvente al vacío y se neutralizó la solución con NaHCO<sub>3</sub> para luego extraer el producto con cuatro porciones de 20 mL de DCM.

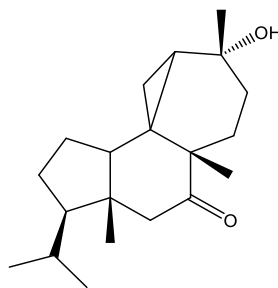


Figura 26: Estructura de azorellanona.

El producto se separó mediante HPLC preparativa con fase móvil de éter de petróleo y acetato de etilo en gradiente desde 8% hasta 70%, obteniéndose 15 mg de un sólido incoloro (26% rendimiento, ver Figura 26).

Compuesto **7**. P.f.: 166-168°C; IR (cm<sup>-1</sup>): 3448 y 1688; RMN <sup>1</sup>H δ (ppm): 0,20 (t, *J* = 6,2 Hz, 1H, H-12); 0,69 (m, 2H, H-11); 1,96 (dd, *J* = 7,8 y 11,9 Hz, 1H, H-10); 2,53 (d, *J* = 17,9 Hz, 1H, H-6α) y 2,72 (d, *J* = 17,9 Hz, 1H, H-6β). RMN <sup>13</sup>C δ (ppm): 9,86 (c); 16,08 (c); 20,89 (t); 22,14 (c); 22,42 (c); 24,71 (t); 25,70 (d); 26,70 (d); 26,82 (t); 27,09 (d); 29,87 (t); 30,62 (t); 31,06 (s); 43,26 (s); 44,66 (s); 52,20 (d, C-10); 53,22 (t, C-6); 60,38; 69,05 (s, C-13) y 217,69 (s, C-7).

#### 9-β-hidroximulin-12-en-7-ona (**7a**)

Para la reacción anterior se separó un producto minoritario, por medio de una HPLC preparativa. Se obtuvieron 6 mg de un sólido blanco, correspondiente al compuesto **7a** (ver Figura 27), con un rendimiento del 12%.

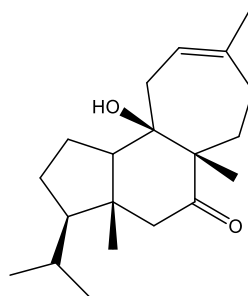


Figura 27: Estructura de 9-β-hidroximulin-12-en-7-ona.

Compuesto **7a**. IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3538 y 1687; RMN  $^1\text{H}$   $\delta$  (ppm): 0,82 (s, 3H, H-20); 0,83 (d,  $J = 6,5$ , 3H, H-18); (0,86, d,  $J = 6,5$ , 3H, H-19); 1,23 (s, 3H, H-17); 1,72 (s, 3H, H-16); 1,77 (d,  $J = 14,5$  Hz, 1H, H-11 $\alpha$ ); 2,51(d,  $J = 13,3$  Hz, 1H, H-6 $\alpha$ ); 2,60 (dd,  $J = 1,5$  y 14,5 Hz, 1H, H-11 $\beta$ ); 2,66 (d,  $J = 13,3$  Hz, 1H, H-6 $\beta$ ) y 5,31 (da,  $J = 1,5$  Hz, 1H, H-12). RMN  $^{13}\text{C}$   $\delta$  (ppm): 14,94 (c); 15,12 (c); 19,62 (c); 21,95 (c); 22,74 (c); 25,24 (t); 27,63 (d); 28,46 (t); 30,34 (t); 35,18 (t); 38,05 (t); 45,47 (s); 49,09 (d); 53,18 (t); 57,27 (s); 58,66 (d); 76,41 (s, C-9); 119,61 (d, C-12); 143,10 (s, C-13) y 215,16 (s, C-7).

### Mulin-9,12-dien-7-ol (**32**)

Se disolvieron 50 mg de azorellanol deshidratado (**31**) en 20 mL de metanol para luego adicionar 60 mg de  $\text{K}_2\text{CO}_3$ . La reacción se mantiene con agitación y bajo reflujo durante dos horas. Se siguió el curso de la reacción mediante CCF, y una vez observado el producto, se concentró el solvente de la solución para neutralizarla y separarla en un embudo de decantación, con tres porciones de 20 mL de DCM. El producto obtenido se purificó en una HPLC preparativa aislándose 38 mg de un sólido incoloro correspondiente al compuesto **32** (87%, ver Figura 28).

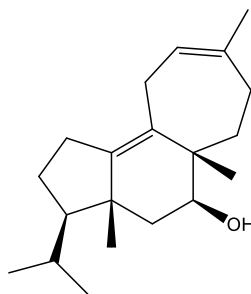


Figura 28: Estructura de mulin-9,12-dien-7-ol.

Compuesto **32**. P.f.: 141°C; IR (cm<sup>-1</sup>): 3408; RMN <sup>1</sup>H δ (ppm): 1,49 (dd, *J* = 11,4 y 13,5 Hz, 1H, H-6β); 2,29 (dd, *J* = 5,8 y 13,5 Hz, 1H, H-6α); 2,46 (dd, *J* = 8,3 y 16,0 Hz, 1H, H-11); 2,76 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H, H-11); 3,73 (dd, *J* = 5,8 Hz, 1H, H-7) y 5,42 (da, *J* = 8,3 Hz, 1H, H-12). RMN <sup>13</sup>C δ (ppm): 20,10 (c); 22,48 (c); 23,26 (c); 23,34 (c); 25,46 (c); 25,67 (t); 27,18 (t); 27,64 (t); 29,98 (d); 30,94 (t); 33,40 (t); 39,26 (s); 42,06 (s); 43,49 (t); 54,30 (d); 69,16 (d, C-7); 121,73 (d, C-12); 132,73 (s, C-10); 136,30 (s, C-13) y 141,84 (s, C-9).

### Mulin-9,12-dien-7-ona (**33**)

En un balón de tres bocas se disolvieron 38 mg del compuesto **32** en 20 mL de acetona, en atmosfera inerte de N<sub>2</sub>. Posteriormente se adicionaron gota a gota 4 mL de Reactivo de Jones hasta que la solución se mantuvo de color naranja, luego de esto, se agregó isopropanol para reducir el exceso de reactivo. El solvente se llevó a sequedad y el producto formado se recuperó utilizando tres porciones de 10 mL de DCM como solvente.

El Reactivo de Jones se preparó añadiendo gota a gota 1,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sobre 1,6 g de CrO<sub>3</sub> dispuesto en un balón con agitador magnético sobre un baño de hielo. Luego se agregaron lentamente 8,5 mL de agua destilada

manteniendo la agitación y dejando la solución por al menos 30 minutos en frío. El producto de la reacción se aisló usando HPLC preparativa obteniéndose 7 mg del compuesto **33** (sólido incoloro, 20%, ver Figura 29).

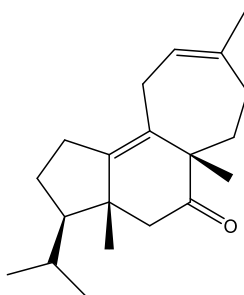


Figura 29: Estructura de mulin-9,12-dien-7-ona.

Compuesto **33**. P.f.:159-160°C; IR (cm<sup>-1</sup>): 3442 y 1705; RMN <sup>1</sup>H δ (ppm): 2,17 señal solapada (d, *J* = 17,1 Hz, 1H, H-11); 2,19 (d, *J* = 14,5 Hz, 1H, H-6β); 2,38 (dd, *J* = 9,2 y 17,1 Hz, 1H, H-11); 2,80 (d, *J* = 14,5 Hz, 1H, H-6α) y 5,46 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, H-12). RMN <sup>13</sup>C δ (ppm): 19,83 (c); 22,71 (c); 22,97 (c); 24,92 (c); 25,12 (t); 25,87 (c); 27,93 (t); 28,38 (t); 29,98 (d); 32,17 (t); 32,48 (t); 46,58 (s); 53,36 (t); 53,43 (s); 59,99 (d); 123,23 (d, C-12); 131,09 (s, C-9); 137,77 (s, C-10); 142,73 (s, C-13) y 218,32 (s, C-7).

Ácido 12-oxo-11,13-α,α-dihidroximulin-20-oico (**34**), ácido 11-oxo-12,13-α,α-dihidroximulin-20-oico (**35**) y ácido 11,12-dioxo-13-α-hidroximulin-20-oico (**36**)

Se disolvieron 300 mg de ácido mulinólico (**1**) en 20 mL de acetona y se agregaron 400 mg de KMnO<sub>4</sub> en 50 mL de agua junto a 5 mL de ácido

acético 90%. La reacción se siguió mediante CCF y se mantuvo con agitación magnética a temperatura ambiente. Una vez finalizada la reacción, se llevó el solvente a sequedad y se neutralizó con una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub>, posteriormente se extrajeron los productos con cuatro porciones de DCM, en un embudo de decantación. La mezcla de los productos se separó en HPLC preparativa, con una mezcla en gradiente de éter de petróleo y acetato de etilo, como eluyente.

Se obtuvieron 56 mg del compuesto **34** (sólido incoloro, 17%, ver Figura 30), 47 mg del compuesto **35** (sólido incoloro, 14%, ver Figura 31) y 36 mg del compuesto **36** (sólido blanco, 11%, ver Figura 32).

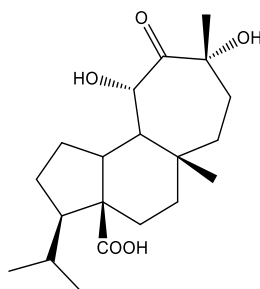


Figura 30: Estructura el ácido 12-oxo-11,13- $\alpha,\alpha$ -dihidroximulin-20-oico.

Compuesto **34**. P.f.: 164-165°C; IR (cm<sup>-1</sup>): 3420, 1704 y 1693; RMN <sup>1</sup>H  $\delta$  (ppm): 1,46 (s, 3H, H-16); 1,94 (da,  $J = 12,0$  Hz, 1H, H-9); 2,26 (dd,  $J = 3,2$  y  $12,0$  Hz, 1H, H-10) y 4,67 (da,  $J = 0,9$  Hz, 1H, H-11). RMN <sup>13</sup>C  $\delta$  (ppm): 22,34 (c); 22,70 (c); 25,14 (c); 26,47 (c); 27,44 (t); 28,51 (d); 29,76 (t); 31,76 (t); 32,30 (t); 34,94 (t); 37,30 (t); 43,88 (s); 48,60 (d); 51,50 (d); 57,89 (d); 58,65 (s); 77,71 (d, C-11); 79,07 (s, C-13); 178,83 (s, C-20) y 215,36 (s, C-12).

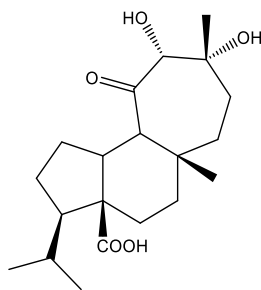


Figura 31: Estructura de ácido 11-oxo-12,13- $\alpha,\alpha$ -dihidroximulin-20-oico.

Compuesto **35**. P.f.:157-158°C; IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3425, 1707 y 1695; RMN  $^1\text{H}$   $\delta$  (ppm): 1,14 (s, 3H, H-16); 2,33 (m, 1H, H-10); 2,50 (d,  $J = 12,3$  Hz, 1H, H-9) y 4,46 (s, 1H, H-12). RMN  $^{13}\text{C}$   $\delta$  (ppm): 22,17 (c); 22,55 (c); 24,01 (c); 25,87 (c); 27,16 (t); 28,64 (d); 29,93 (t); 30,54 (t); 33,41 (t); 35,48 (t); 36,31 (t); 43,58 (s); 48,02 (d); 54,97 (d); 56,62 (d); 59,11 (s); 77,61 (s, C-13); 84,08 (d, C-12); 179,41 (s, C-20) y 212,54 (s, C-11).

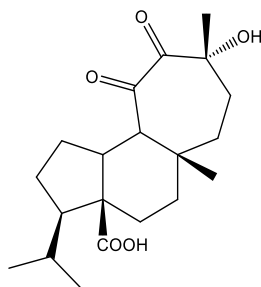


Figura 32: Estructura de ácido 11,12-dioxo-13- $\alpha$ -hidroximulin-20-oico.

Compuesto **36**. P.f.: 173-175°C; IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3445, 1720 y 1706; RMN  $^1\text{H}$   $\delta$  (ppm): 1,36 (s, 3H, H-16); 2,29 (m, 1H, H-10) y 2,57 (d,  $J = 11,5$  Hz, 1H, H-9). RMN  $^{13}\text{C}$   $\delta$  (ppm): 22,43 (c); 22,66 (c); 24,06 (c); 27,38 (c); 27,80 (t); 28,22 (d); 30,79 (t); 31,50 (t); 31,75 (t); 32,03 (t); 35,77 (t); 40,82 (s); 46,19

(d); 56,80 (d); 57,26 (d); 59,69 (s); 75,11 (s, C-13); 178,31 (s, C-20); 209,20 (s, C-11) y 211,23 (s, C-12).

Metil éster del ácido mulin-11,13-dien-20-oico (**37**), metil éster del ácido mulinólico (**38**), metil éster del ácido epimulinólico (**39**), metil éster del ácido 16-normulin-11-en-13-ona-20-oico (**40**), metil éster del ácido mulin-12-en-11,14-diona-20-oico (**41**) y metil éster del ácido 12-oxo-11,13- $\alpha$ -dihidroximulin-20-oico (**42**)

Se metilaron seis compuestos que presentaban un ácido carboxílico en su estructura, estos fueron: ácido mulinólico (**1**), ácido mulin-12-en-11,14-diona-20-oico (**3**), ácido mulin-11,13-dien-20-oico (**4**), ácido epimulinólico (**28**), ácido 16-normulin-11-en-13-ona-20-oico (**29**) y ácido 12-oxo-11,13- $\alpha,\alpha$ -dihidroximulin-20-oico (**34**) (ver Figura 33). Se agregaron 20 mg de cada compuesto de partida en diferentes viales, a estos se les adicionaron 5 mL de una solución de diazometano en éter dietílico, disolviendo por completo los compuestos. Se verificó la formación de los productos metilados mediante CCF, adicionando más diazometano en el caso de ser necesario. Una vez finalizada las reacciones se concentró el éter dietílico. El porcentaje de rendimiento de la reacción es 100%.



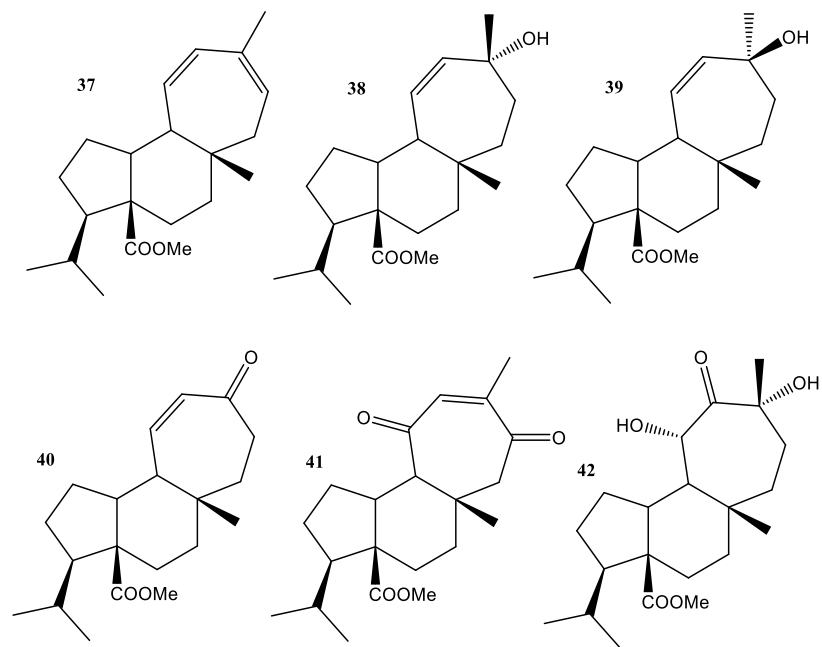


Figura 33: Estructuras de compuestos metilados.

Ácido 14-oxo-13- $\beta$ -hidroximulin-11-en-20-oico (**43**) y ácido 11-epoxi-12,13-dihidroximulin-20-oico (**44**).

Se disolvieron 300 mg de ácido mulin-11,13-dien-20-oico (**4**) en 50 mL de acetona y se adicionaron 400 mg de  $\text{KMnO}_4$  diluido en 50 mL de agua y 5 mL de ácido acético 90%. Mediante CCF se siguió el curso de la reacción, la cual se mantuvo durante un día a temperatura ambiente y con agitación magnética. Una vez finalizada la reacción se concentró la acetona al vacío y se neutralizó la solución con  $\text{NaHCO}_3$ . Se extrajeron los productos con cuatro porciones de 50 mL de DCM, se secó la solución con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se evaporó el solvente en un rotavapor. La mezcla de productos obtenida se separó mediante cromatografía *flash*, y posteriormente por HPLC preparativa con una mezcla en gradiente de E.P./AcOEt.

Se separaron dos productos de la reacción: el compuesto mayoritario es el compuesto **44**, un sólido cristalino incoloro, del cual se obtuvo 130 mg, con un 37% de rendimiento (P.f.:153°C). El producto minoritario es el compuesto **43** (ver Figura 34), un sólido incoloro, del que se aisló 33 mg (9%).

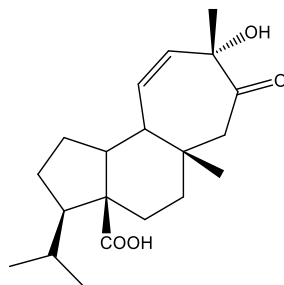


Figura 34: Estructura de ácido 14-oxo-13-β-hidroximulin-11-en-20-oico.

Compuesto **43**. P.f.: 119°C; IR (cm<sup>-1</sup>): 3438, 1697 y 1689; RMN <sup>1</sup>H δ (ppm): 1,94 (m, 1H, H-10); 2,21(dd, *J* = 8,8 y 12,4 Hz, 1H, H-9); 2,31 (d, *J* = 12,5 Hz, 1H, H-15α); 3,18 (d, *J* = 12,5 Hz, 1H, H-15β); 5,58 (d, *J* = 12,1 Hz, 1H, H-12) y 5,78 (dd, *J* = 8,8 y 12,1 Hz, 1H, H-11).

#### Acetilación del compuesto **44**

Se tomaron 15 mg del compuesto **44** y se agregaron diez gotas de piridina seguido de veinte gotas de anhídrido acético, mientras se mantuvo la reacción con agitación magnética, a temperatura ambiente. Luego de diez minutos se realizó CCF identificando la formación de producto, por lo que se secó la solución en un rotavapor. El compuesto formado se separó mediante HPLC preparativa, obteniéndose 10 mg de un aceite amarillo y

denso, correspondiente al compuesto **44** acetilado (60% rendimiento, ver Figura 35).

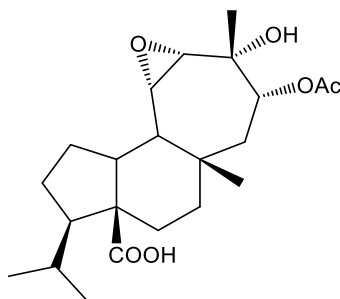


Figura 35: Ácido 11-epoxi-12,13-dihroximulin-20-oico (**44**) acetilado.

Compuesto **44** acetilado (ver Figura 12). IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3346, 3235 y 1691; RMN  $^1\text{H}$   $\delta$  (ppm): 2,06 (s, 3H, OAc); 2,20 (m, 1H, H-9); 2,53 (m, 1H, H-15); 2,82 (d,  $J = 4,4$  Hz, 1H, H-12); 3,20 (dd, 4,4 y 8,0 Hz, 1H, H-11) y 5,09 (dd,  $J = 3,0$  y 11,4 Hz, 1H, H-14). RMN  $^{13}\text{C}$   $\delta$  (ppm): 21,08 (c); 22,42 (c); 22,65 (c); 25,26 (c); 27,12 (c); 27,53 (t); 28,75 (d); 31,51 (t); 31,80 (t); 36,67 (t); 37,60 (s); 42,13 (t); 43,99 (d); 46,19 (d); 56,53 (d); 57,86 (d); 58,42 (s); 59,16 (d); 69,90 (d, C-14); 73,35 (s, C-13); 170,03 (s, OAc) y 179,67 (s, C-20).

#### 7-acetoxi-13-hidroximulin-9-eno (**45**)

Se disolvieron 50 mg de  $\text{Hg}(\text{OAc})_2$  en 5 mL de agua y 5 mL de THF, manteniéndose la solución con agitación magnética a temperatura ambiente. Una vez disuelto el  $\text{Hg}(\text{OAc})_2$  se agregaron 50 mg de 7-acetoxi-mulin-9,12-dieno (**31**) disuelto en THF, manteniéndose la reacción bajo las mismas condiciones durante dos días. La reacción se siguió a través de CCF, y una vez transcurrido el periodo de 48 horas se agregaron 3 mg de  $\text{NaBH}_4$

disuelto en 2 mL de NaOH 3,0 M. Posteriormente la reacción se finalizó agregando 20 mL de una solución saturada de NaCl. La mezcla de productos se extrajo con tres porciones de 20 mL de diclorometano. El producto se separó por medio de HPLC preparativa, obteniéndose 33 mg de un sólido incoloro correspondiente al compuesto **45** (60% rendimiento, ver Figura 36).

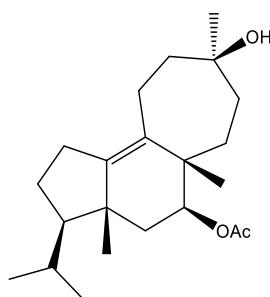


Figura 36: Estructura de 7-acetoxy-13-hidroximulin-9-eno.

Compuesto **45**. P.f.: 158-160°C; IR (cm<sup>-1</sup>): 3450 y 1716; RMN <sup>1</sup>H δ (ppm): 0,87 (d, *J* = 5,9 Hz, 3H, H-18); 0,93 (s, 3H, H-20); 0,96 (s, 3H, H-17); 0,98 (d, *J* = 5,9 Hz, 3H, H-19); 1,15 (s, 3H, H-16); 2,29 (dd, *J* = 6,3 y 13,6 Hz, 1H, H-6α) y 4,82 (dd, *J* = 6,3 y 11,5 Hz, 1H, H-7). RMN <sup>13</sup>C δ (ppm): 21,38 (c); 21,98 (c); 22,39 (c); 23,08 (c); 23,15 (c); 23,33 (t); 24,59 (t); 27,19 (c); 28,70 (t); 30,99 (d); 32,78 (t); 35,58 (t); 35,65 (t); 40,79 (s); 42,70 (s); 43,14 (t); 54,22 (d); 70,97 (s, C-13); 72,50 (d, C-7); 132,62 (s, C-10); 144,28 (s, C-9) y 170,84 (s, OAc).

#### Ácido 11-oxo-14-α-hidroximulin-9-en-20-oico (**46**)

Se disolvieron 50 mg de ácido mulin-12-en-11,14-diona-20-oico (**3**) en 50 mL de etanol:agua (1:1), para luego agregar 12 mg de NaBH<sub>4</sub>. La reacción

se mantuvo con agitación magnética y a temperatura ambiente durante treinta minutos mientras se siguió la formación de producto realizando CCF. Una vez transcurridos los treinta minutos, se detuvo la reacción adicionando HCl 0,1 M, gota a gota, hasta que la solución no burbujeara, y cambiara de color amarillo suave a incoloro. El producto obtenido se separó en HPLC preparativa, obteniéndose 41 mg del compuesto **46** (Sólido amarillo, 81% rendimiento, ver Figura 37).

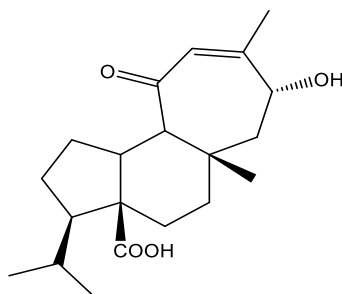


Figura 37: Estructura de ácido 11-oxo-14- $\alpha$ -hidroximulin-9-en-20-oico.

Compuesto **46**. P.f.: 148-149°C; IR (cm<sup>-1</sup>): 3447, 1685 y 1654; RMN <sup>1</sup>H (ppm): 0,83 (d,  $J = 5,5$  Hz, 3H, H-18); 0,99 (d,  $J = 5,5$  Hz, 3H, H-19); 1,09 (s, 3H, H-17); 1,99 (s, 3H, H-16); 1,75 (dd,  $J = 7,5$  y 15,0 Hz, 1H, H-15 $\alpha$ ); 2,51 (m, 1H, H-10); 2,55 (d,  $J = 12,3$  Hz, 1H, H-9); 4,49 (dd,  $J = 2,5$  y 7,5 Hz, 1H, H-14) y 5,79 (s, 1H, H-12). RMN <sup>13</sup>C  $\delta$  (ppm): 22,34 (c); 22,72 (c); 23,66 (c); 28,69 (c); 31,66 (t); 31,98 (d); 33,08 (t); 33,49 (t); 40,83 (t); 46,39 (s); 48,90 (d); 56,64 (t); 57,69 (d); 60,41 (d); 62,82 (s); 71,76 (d, C-14); 127,78 (d, C-12); 153,79 (s, C-13); 178,26 (s, C-20) y 204,09 (s, C-11).

#### Mulin-11,13-dien-20-ol (**47**)

Se agregaron 40 mg de LiAlH<sub>4</sub> en un balón de 3 bocas con 5 mL de THF seco en su interior. La solución se mantuvo bajo reflujo hasta ebullición

tapando el sistema con  $\text{CaCl}_2$ . Posteriormente se adicionaron gota a gota, 100 mg de ácido mulin-11,13-dien-20-oico (**4**) disueltos en THF, manteniendo el reflujo por 15 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de reacción se disminuyó la temperatura del sistema retirándolo de la fuente de calor y depositándolo en un recipiente con agua y hielo, para agregar lentamente una solución de 2 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 10%. Luego se separó la fase orgánica de la acuosa utilizando DCM en un embudo de decantación. Se separó 55 mg del producto **47** (55% rendimiento), un sólido blanco, mediante HPLC preparativa (ver Figura 38).

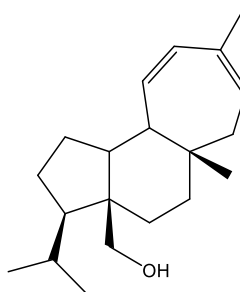


Figura 38: Estructura de mulin-11,13-dien-20-ol.

Compuesto **47**. P.f.: 107-109°C; IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3411; RMN  $^1\text{H}$   $\delta$  (ppm): 0,86 (d,  $J = 5,8$  Hz, 3H, H-18); 0,88 (s, 3H, H-17); 1,04 (d,  $J = 5,8$  Hz, 3H, H-19); 1,81 (s, 3H, H-16); (2,73 (da,  $J = 17,3$  Hz, 1H, H-7 $\beta$ ); 3,57 (d,  $J = 11,5$  Hz, 1H, H-20); 3,80 (d,  $J = 11,5$  Hz, 1H, H-20); 5,46 (m, 2H, H-11 y H-14) y 5,63 (d,  $J = 12,6$  Hz, 1H, H-12). RMN  $^{13}\text{C}$   $\delta$  (ppm): 22,6 (c); 22,7 (c); 24,4 (t); 26,2 (c); 27,1 (c); 29,7 (t); 32,5 (d); 35,0 (t); 35,7 (t); 37,5 (t); 41,0 (t); 49,1 (s); 50,8 (d); 54,1 (d); 55,3 (d); 68,6 (t, C-20); 127,5 (d, C-14); 128,9 (d, C-12); 132,6 (s, C-13) y 133,2 (d, C-11).

### Mulin-11-en-13,20-diol (**48**)

Se agregaron 40 mg de  $\text{LiAlH}_4$  en un balón de 3 bocas con 10 mL de THF seco en su interior. La solución se mantuvo bajo reflujo hasta ebullición tapando el sistema con  $\text{CaCl}_2$ . Posteriormente se adicionaron gota a gota, 100 mg de ácido mulinólico (**1**) disueltos en THF, manteniendo el reflujo por 15 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de reacción se disminuyó la temperatura del sistema retirándolo de la fuente de calor y depositándolo en un recipiente con agua y hielo, para agregar una solución de 20 mL de tartrato de sodio al 10%. Luego se separó la fase orgánica de la acuosa utilizando DCM en un embudo de decantación. Se separó 46 mg del producto **48** (ver Figura 39) mediante HPLC preparativa (sólido incoloro, 46% rendimiento).

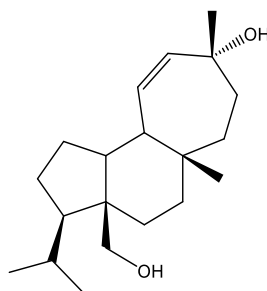


Figura 39: Estructura de mulin-11-en-13,20-diol.

Compuesto **48**. P.f.:  $193^\circ\text{C}$ ; IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3423; RMN  $^1\text{H}$   $\delta$  (ppm): 0,86 (d,  $J = 5,7$  Hz, 3H, H-18); 0,94 (s, 3H, H-17); 1,01 (d,  $J = 5,7$  Hz, 3H, H-19); 1,28 (s, 3H, H-16); 1,98 (dd,  $J = 8,4$  y  $12,5$  Hz, 1H, H-9); 2,12 (da,  $J = 12,5$  Hz, 1H, H-10); 2,61 (ta,  $J = 13,9$  Hz, 1H, H-10 $\alpha$ ); 3,51 (d,  $J = 11,6$  Hz, 1H, H-20); 3,73 (d,  $J = 11,6$  Hz, 1H, H-20); 5,40 (dd,  $J = 8,4$  y  $12,3$  Hz, 1H, H-11) y 5,53 (d,  $J = 12,3$  Hz, 1H, H-12). RMN  $^{13}\text{C}$   $\delta$  (ppm): 21,9 (c); 22,4 (c); 25,3 (t); 27,1 (c); 28,9 (t); 30,2 (t); 32,6 (d); 32,9 (c); 34,4 (t); 35,8 (t); 36,2

(s); 41,9 (t); 48,5 (s); 48,9 (d); 50,8 (d); 54,6 (d); 67,7 (t, C-20); 70,9 (s, C-13); 133,1 (d, C-11) y 136,9 (d, C-12).

### Ácido mulin-20-oico (**49**)

Se disolvieron 200 mg de ácido mulin-11,13-dien-20-oico (**4**) en 10 mL de metanol, dentro de un recipiente de vidrio, de aproximadamente 1 litro de capacidad. El recipiente o botella se dispuso en un sonicador durante 5 minutos para homogeneizar la solución y retirar todo el oxígeno de esta.

Posteriormente, la botella se instaló en un equipo de hidrogenación Parr, se agregó una punta de espátula de Pd/C y se selló completamente el sistema para evitar ingreso de oxígeno y la pérdida de hidrógeno gaseoso. La reacción se mantuvo por dos horas y se determinó mediante CCF la transformación completa del compuesto de partida en producto. Se secó el metanol de la reacción a través de un rotavapor y el compuesto final se separó mediante HPLC preparativa, obteniéndose 145 mg de un sólido blanco correspondiente al producto mayoritario **49** (73% rendimiento, ver Figura 40).

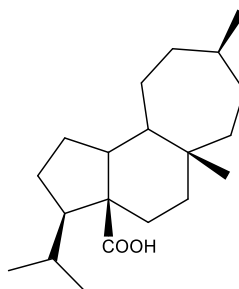


Figura 40: Estructura de ácido mulin-20-oico.

Compuesto **49**. P.f.: 123-124°C; IR (cm<sup>-1</sup>): 3421 y 1687; RMN <sup>1</sup>H δ (ppm): 0,82 (s, 3H- H-17); 0,83 (d, *J* = 5,7 Hz, 3H, H-18); 0,91 (d, *J* = 5,9 Hz, 3H,



H-16); 1,01 (d,  $J = 5,7$  Hz, 3H, H-19); 2,35 (da,  $J = 12,7$  Hz, 1H, H-6 $\beta$ ).  
RMN  $^{13}\text{C}$   $\delta$  (ppm): 22,2 (c); 22,4 (c); 22,8 (c); 24,6 (d); 24,7 (d); 28,5 (c);  
30,5 (t); 30,7 (t); 31,8 (t); 32,8 (d); 33,2 (t); 36,3 (t); 36,6 (s); 41,4 (t); 45,2  
(d); 49,6 (d); 50,3 (d); 57,9 (d); 58,4 (s) y 178,9 (s).

## 5.7 Formación de micelas

Se realizó la solución acuosa del polímero Pluronic F-127 a una concentración de 1 mM, lo que permite que se forme una mayor cantidad de micelas con los diterpenos bien distribuidos. Se tomaron 1,26 gramos de Pluronic y se disolvieron en 100 mL de agua destilada con ayuda de temperatura y agitación de ultrasonido.

Por separado, se tomaron 20 mg de los diterpenos ácido mulinólico (**1**), azorellanol (**2**) y ácido mulin-11,13-dien-20-oico (**4**) los cuales fueron disueltos en 3 mL de DCM. A cada solución se le agregaron 10 mL de Pluronic F-127 y se agitó vigorosamente con ayuda de un agitador vortex, hasta que tomaron un aspecto blanco lechoso y con espuma en la superficie. Luego se evaporó el solvente poniendo las soluciones en baño María por algunos segundos y agitando constantemente, permitiendo la salida de los gases de DCM. Esta acción se realizó repetidamente hasta obtener soluciones traslucidas y sin formación de espuma. Una vez eliminado el solvente orgánico las soluciones se mantuvieron selladas a temperatura ambiente.

El ácido mulinólico (**1**) y el azorellanol (**2**) presentaron un precipitado blanco una vez finalizado el proceso de encapsulamiento en las micelas, por lo que fue necesario disolver nuevamente las soluciones en DCM y agregar 15 mL más del polímero para disolver completamente los compuestos. Se repitió el procedimiento de eliminación del solvente orgánico.

## 5.8 Actividad biológica

### 5.8.1 Microorganismos.

La determinación de la actividad antibacterial de los diterpenos de *Azorella compacta* se realizó utilizando cinco bacterias distintas:

- *Staphylococcus aureus*: Descrita por primera vez 1880, bacteria coco, anaeróbica y Gram-positiva. Provoca enfermedades cutáneas, abscesos, neumonía y gastrointestinales, entre muchas otras.
- *Mycobacterium smegmatis*: Descubierta en 1884, bacteria bacilo, Gram-positiva no patógena. Presenta muy pocas diferencias con *M. tuberculosis* por lo que es usadas para pruebas contra TBC.
- *Escherichia coli*: Descubierta en 1885, es un bacilo Gram-negativo presente en la flora intestinal de animales. Provoca enfermedades intestinales y extra intestinales.

### 5.8.2 Cultivos.

Para los ensayos se cultivaron las bacterias en un caldo Mueller Hinton, preparado con 21,0 gramos del medio para 1 litro de agua desionizada y esterilizada. El pH se mantuvo en  $7 \pm 0,2$  a una temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$  [89]. Se incubó las bacterias a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas.

Posteriormente los caldos fueron estandarizados a 0,5 Mcfarland con una solución salina esterilizada. El ajuste de Mcfarland es un estándar que mide las bacterias en un medio mediante la turbidez de las soluciones, es posible

determinar de este modo las unidades de colonias formadoras (UFC), o el número de bacterias por mL en una escala de 0,5 a 1,0. Los estándares se prepararon mezclando las bacterias en caldo con soluciones de 1% de cloruro de bario (BaCl) y 1% de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), en distintas proporciones <sup>[90,91]</sup>.

Las bacterias estandarizadas fueron depositadas en placas de agar MH preparadas con 18,0 gramos de agar y 21,0 gramos de medio, para 1 litro de solución, con un pH  $7 \pm 0,2$  a 25°C. Las placas de agar fueron incubadas durante 24 horas a 37°C.

### 5.8.3 Ensayos antibacterianos.

#### a) Ensayo en caldo MH

El primer ensayo se realizó con los compuestos **2** y **16** probando su actividad contra *Staphylococcus aureus*. Se disolvieron 4,8 mg de cada uno de los diterpenos en 3,0 mL de una solución acuosa de Pluronic F-127 1 mM, obteniéndose una concentración de 1600µg/mL. De estas soluciones stock se hizo una primera dilución utilizando como solvente el polímero inicial, y posteriormente se realizó una segunda dilución con caldo de cultivo MH (ver Tabla 3).

Tabla 3: Dilución de soluciones stock de compuestos **2** y **16**.

<b>Sol.</b>	<b>1ª Dilución</b>	<b>2ª Dilución</b>	<b>[Final]</b>
1	1 mL Sol. Stock	100µL Sol. 1 + 900 µL Caldo MH	160 µg/mL
2	0,5 mL Sol. 1 + 0,5 mL Pluronic	100µL Sol. 2 + 900 µL Caldo MH	80 µg/mL
3	0,5 mL Sol. 1 + 1,5 mL Pluronic	100µL Sol. 3 + 900 µL Caldo MH	40 µg/mL
4	0,5 mL Sol. 1 + 3,5 mL Pluronic	100µL Sol. 4 + 900 µL Caldo MH	20 µg/mL
5	0,5 mL Sol. 4 + 0,5 mL Pluronic	100µL Sol. 5 + 900 µL Caldo MH	10 µg/mL
6	0,5 mL Sol. 4 + 1,5 mL Pluronic	100µL Sol. 6 + 900 µL Caldo MH	5 µg/mL
7	0,5 mL Sol. 4 + 3,5 mL Pluronic	100µL Sol. 7 + 900 µL Caldo MH	2,5 µg/mL
8	0,5 mL Sol. 7 + 0,5 mL Pluronic	100µL Sol. 8 + 900 µL Caldo MH	1,25 µg/mL
9	0,5 mL Sol. 7 + 1,5 mL Pluronic	100µL Sol. 9 + 900 µL Caldo MH	0,625 µg/mL
10	0,5 mL Sol. 7 + 3,5 mL Pluronic	100µL Sol. 10 + 900 µL Caldo MH	0,313 µg/mL

Una vez obtenidas las concentraciones finales de las soluciones se procedió a la dilución de los compuestos en medio de cultivo incubado con bacterias. Se tomaron 100 µL de cada solución final de los compuestos **2** y **16**, y se disolvieron en 900 µL de bacteria estandarizada ( $\approx 5 \times 10^5$  UFC/mL) dentro

de tubos de ensayo de 10 mL, los cuales se taparon y se agitaron mediante un equipo vortex. Las bacterias junto a los compuestos se incubaron durante 24 horas a 37°C sin agitación. Como blanco positivo se utilizó penicilina a idénticas concentraciones que los diterpenos (ver Tabla 4), mientras que, como blanco negativo se utilizó la solución de Pluronic F-127 sometida a las mismas diluciones con caldo MH.

Tabla 4: Concentración final de compuestos en medio de incubación.

<b>Concentración Final De Compuestos 2, 16 y Penicilina En Caldo Con Bacterias.</b>	
1	16 µg/mL ( $5,0 \times 10^{-5}$ M)
2	8 µg/mL ( $2,5 \times 10^{-5}$ M)
3	4 µg/mL ( $1,25 \times 10^{-5}$ M)
4	2 µg/mL ( $6,0 \times 10^{-6}$ M)
5	1 µg/mL ( $3,0 \times 10^{-6}$ M)
6	0,5 µg/mL ( $1,5 \times 10^{-6}$ M)
7	0,25 µg/mL ( $7,5 \times 10^{-7}$ M)
8	0,125 µg/mL ( $3,8 \times 10^{-7}$ M)
9	0,0625 µg/mL ( $1,9 \times 10^{-7}$ M)
10	0,0313 µg/mL ( $1,0 \times 10^{-8}$ M)

Transcurridas las 24 horas de incubación se retiraron los tubos de la estufa y se dejaron a temperatura ambiente para determinar la turbidez de las soluciones comparándolas con el estándar de Mcfarland.

## b) Ensayo de difusión de disco

Para comenzar con los ensayos de difusión de disco, se realizó en primer lugar una prueba con los compuestos **31** y **36** a una concentración estándar de 100 µg por disco, probando su actividad contra *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium smegmatis* y *Escherichia coli*.

Se tomaron 10,0 mg de cada compuesto y se disolvieron en 0,5 mL de DCM dentro de tubos Eppendorf de 1,5 mL de capacidad, homogeneizando la solución con una suave agitación. Posteriormente, se tomaron alícuotas de 5 µL de cada solución stock y se impregnaron en discos de papel filtro, previamente esterilizados, de 6 mm de diámetro, evaporando el solvente a temperatura ambiente y bajo campana.

La concentración final de los discos fue de 100 µg ( $\approx 3 \times 10^{-7}$  moles).

Para la preparación de las placas de agar se realizó un inóculo de baja turbidez extrayendo 100 µL de bacteria incubada en caldo, y disolviéndolo en 900 µL de caldo MH esterilizado, agitando la solución en un vortex. Luego se humedeció un hisopo de algodón en la dilución de bacterias y se sembraron las placas de agar deslizando el hisopo por toda la superficie del gel de forma homogénea y en diferentes direcciones. Las placas se depositaron boca abajo sobre las tapas para secar su superficie.

Se dispusieron los discos de papel, secos e impregnados con los compuestos, sobre la superficie de las placas de agar inoculadas con bacterias en forma de césped. Como control negativo se usaron discos de papel filtro con DCM (ver Figura 41), mientras que, como control positivo, se utilizó 1 µL Ampicilina a una concentración de 1 mg/mL ( $3 \times 10^{-3}$  M).

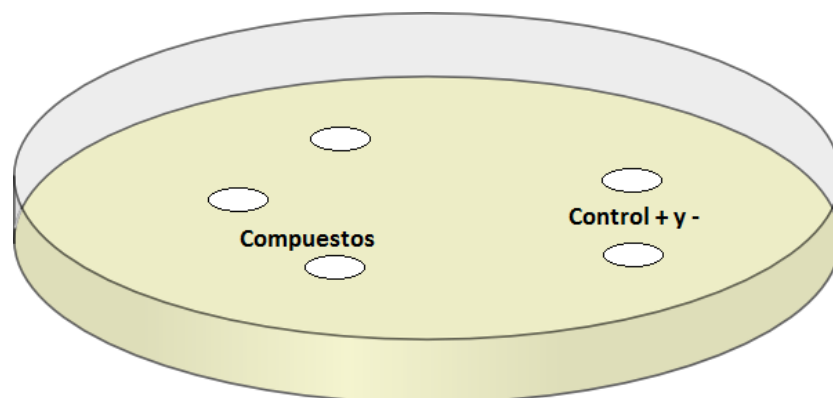


Figura 41: Disposición de discos de papel en ensayo de difusión de disco.

Las placas se incubaron en una estufa a 37°C durante 24 horas, y se midió el halo de inhibición formado alrededor de los discos de papel.

Este ensayo se repitió aumentando la concentración final de los discos de papel de 100 a 500  $\mu\text{g}$  ( $\approx 1,5 \times 10^{-6}$  moles), utilizando todos los compuestos descritos anteriormente. La solución stock inicial de cada compuesto se llevó a cabo disolviendo 10,0 mg de cada uno en 100  $\mu\text{L}$  de DCM e impregnando los discos de papel con alícuotas de 5  $\mu\text{L}$  de cada solución resultante.

### c) Ensayos MIC

Basándose en los resultados de los ensayos descritos en el punto b) se determinó la concentración mínima inhibitoria de uno de los compuestos más activos, probándolo contra las tres bacterias de interés.

Se disolvieron 10,0 mg del compuesto **36** en 250  $\mu\text{L}$  de DCM en un tubo Eppendorf de 1,5 mL de capacidad. Una vez homogeneizada la solución, se



tomaron alícuotas de 1 y 5  $\mu\text{L}$  para impregnar el compuesto en cuadros de papel filtro de 6 mm, previamente esterilizados. Las concentraciones finales de los cuadros de papel fueron: 50, 100, 200, 300 y 400  $\mu\text{g}$  ( $1,4 \times 10^{-7}$ ;  $2,8 \times 10^{-7}$ ;  $5,7 \times 10^{-7}$ ;  $8,6 \times 10^{-7}$ ;  $1,2 \times 10^{-6}$  moles) .

Las placas de agar se sembraron con las diferentes bacterias por separado como se describió en el punto b) y se dispusieron los cuadros de papel con el compuesto impregnado en el centro de la superficie del gel, en fila y en gradiente, incluyendo un cuadro de papel sin compuesto (ver Figura 42).

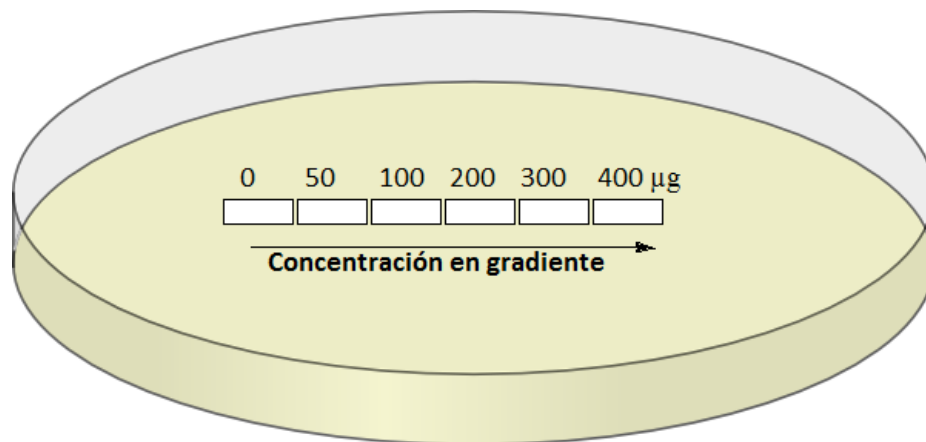


Figura 42: Disposición cuadros de papel en ensayo MIC.

Las placas se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas y se determinó el área de inhibición.

#### d) Ensayos en Caldo MH (DMSO y Pluronic)

Se realizaron los ensayos antibacterianos seleccionando los compuestos más activos en base a los resultados obtenidos en las pruebas descritas en el punto b) utilizando como disolvente DMSO y Pluronic F-127 1 mM para

determinar si la actividad de los diterpenos mejora aumentando su solubilidad. En esta oportunidad solo se utilizó *Staphylococcus aureus* como microorganismo de prueba debido a que los resultados observados fueron mejores contra esta bacteria.

Se disolvieron 2 mg de los compuestos **3**, **29** y **45** en 800  $\mu\text{L}$  de DMSO:H<sub>2</sub>O (1:7) y Pluronic F-127 1,0 mM, por separado, en tubos Eppendorf de 1,5 mL de capacidad, homogeneizando las soluciones con un agitador vortex.

De las soluciones stock se tomaron alícuotas de 10, 20, 40, 60, 80 y 100  $\mu\text{L}$  y se adicionaron a tubos Eppendorf (de 1,5 mL) que contenían 20  $\mu\text{L}$  de caldo de bacterias cada uno. Las soluciones se nivelaron con caldo MH esterilizado hasta completar 500  $\mu\text{L}$  en total, obteniéndose las concentraciones mostradas en la Tabla 5.

Tabla 5: Concentración final de compuestos en 500  $\mu\text{L}$  de medio.

Soluciones	Concentración Final
1	0
2	50 $\mu\text{g/mL}$ ( $1,5 \times 10^{-4}$ M)
3	100 $\mu\text{g/mL}$ ( $3,0 \times 10^{-4}$ M)
4	200 $\mu\text{g/mL}$ ( $6,0 \times 10^{-4}$ M)
5	300 $\mu\text{g/mL}$ ( $9,0 \times 10^{-4}$ M)
6	400 $\mu\text{g/mL}$ ( $1,2 \times 10^{-3}$ M)
7	500 $\mu\text{g/mL}$ ( $1,5 \times 10^{-3}$ M)

Como blanco se utilizó una solución de 20  $\mu\text{L}$  de caldo de bacterias en 480  $\mu\text{L}$  de medio MH esterilizado. Para control positivo se usaron 5  $\mu\text{L}$  de

ampicilina (1 mg/mL), mientras que, como control negativo se utilizó una solución de 100 µL de solvente en 400 µL de caldo MH.

Los tubos se incubaron en una estufa a 37°C durante 24 horas con agitación constante.

Luego del tiempo de incubación los tubos se retiraron de la estufa y se tomaron alicuotas 80 µL de cada solución para determinar su absorbancia mediante el uso de placas microtituladoras de 96 pocillos.

e) Ensayos difusión de disco (DCM y Pluronic F-127)

También se realizaron los ensayos para determinar la variación de actividad biológica aumentando la solubilidad de los compuestos, mediante el método de difusión de disco, empleando como solventes diclorometano y solución acuosa de Pluronic F-127 para impregnar los discos de papel. En esta oportunidad se utilizó *Staphylococcus aureus* para las pruebas debido a los resultados obtenidos en los ensayos anteriores.

Se disolvieron 2,0 mg de los compuestos **3**, **29** y **45** en 100 µL de solvente (DCM y Pluronic) y se tomaron alícuotas de 5 µL para impregnar discos de papel filtro de 6 mm esterilizados. La concentración final de los discos fue de 500 µg ( $1,5 \times 10^{-6}$  moles).

Los discos se secaron bajo campana con ayuda de una manta calefactora para luego depositarlos sobre placas de agar sembradas con bacterias en forma de césped, junto con el control negativo de DCM y Pluronic, y 1 µL de ampicilina (1mg/mL), como control positivo.

Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas y posteriormente se midió el halo de inhibición formado alrededor de los discos de papel.

#### 5.8.4 Ensayos con ácido 16-nor-mulin-11-en-13-ona-20-oico (ver Anexo 1)

CAPÍTULO III

**RESULTADOS Y DISCUSIONES**

## 6.1 Recolección de material

El primer paso para el desarrollo de esta tesis en la recolección del material orgánico para la hacer las extracción de los metabolitos secundarios. La planta escogida fue *Azorella compacta*, debido a que presenta numerosas referencias de ser usada como planta medicinal por los pueblos altiplánicos, para combatir diferentes enfermedades.

El 2.103 se recolectó *A. compacta* en la Región de Antofagasta, a 5.000 msnm, la cual se llevó a Santiago para ser secada y comenzar a separar los compuestos de interés. El secado de la planta se realizó depositando el material en una zona ventilada sin exposición directa al sol, a temperatura ambiente. Si bien es necesario secar la planta para evitar que los extractos presenten abundante agua, es de vital importancia comenzar lo antes posible con la separación de los metabolitos secundarios, ya que estos se pueden descomponer por la luz, calor u otras condiciones que no corresponden a su ambiente natural.

El proceso de las extracciones de los primeros crudos de la planta resultó ser más lenta de lo esperado porque se obtuvo elevados volúmenes de solvente en cada extracción a causa de la gran cantidad de planta trabajada. Además, a pesar del secado previo, las separaciones con acetato de etilo arrastraron el agua remanente de la planta que no se logró secar debido a lo compacto de su estructura. Por este motivo se debió separar el agua presente en los extractos orgánicos por medio de separaciones líquido-líquido en embudos de decantación y usando sulfato de sodio anhidro para poder concentrar los crudos.

## 6.2 Extracción de metabolitos secundarios

Se obtuvo seis extractos crudos a los que se les realizaron CCF para determinar patrones de su composición y se combinaron las fracciones similares, para posteriormente trabajar con una mayor cantidad de compuesto inicial.

Desde los extractos de éter de petróleo y acetato de etilo de las partes aéreas de *Azorella compacta* se aislaron nueve diterpenos con esqueletos del tipo mulinano y azorellano (ver Figura 15).

Se esperaba que la separación de los compuestos, a partir del extracto inicial de la planta, fuera más rápida, obteniéndose una mayor cantidad de producto. Sin embargo, la separación se vio dificultada debido a la cantidad de muestra a separar y, por consiguiente, a los numerosos compuestos que presentaban las fracciones, muchos de ellos solapados entre sí, impidiendo la obtención de productos limpios de forma eficiente.

Es por este motivo, que fue necesario repetir numerosas columnas cromatográficas, para fraccionar los extractos iniciales y disminuir la cantidad de muestra a trabajar. De este modo se obtuvo fracciones de menor masa y con menos compuestos, lo que permitió aislar los diterpenos con una mayor eficiencia, a través de HPLC preparativa o recristalización

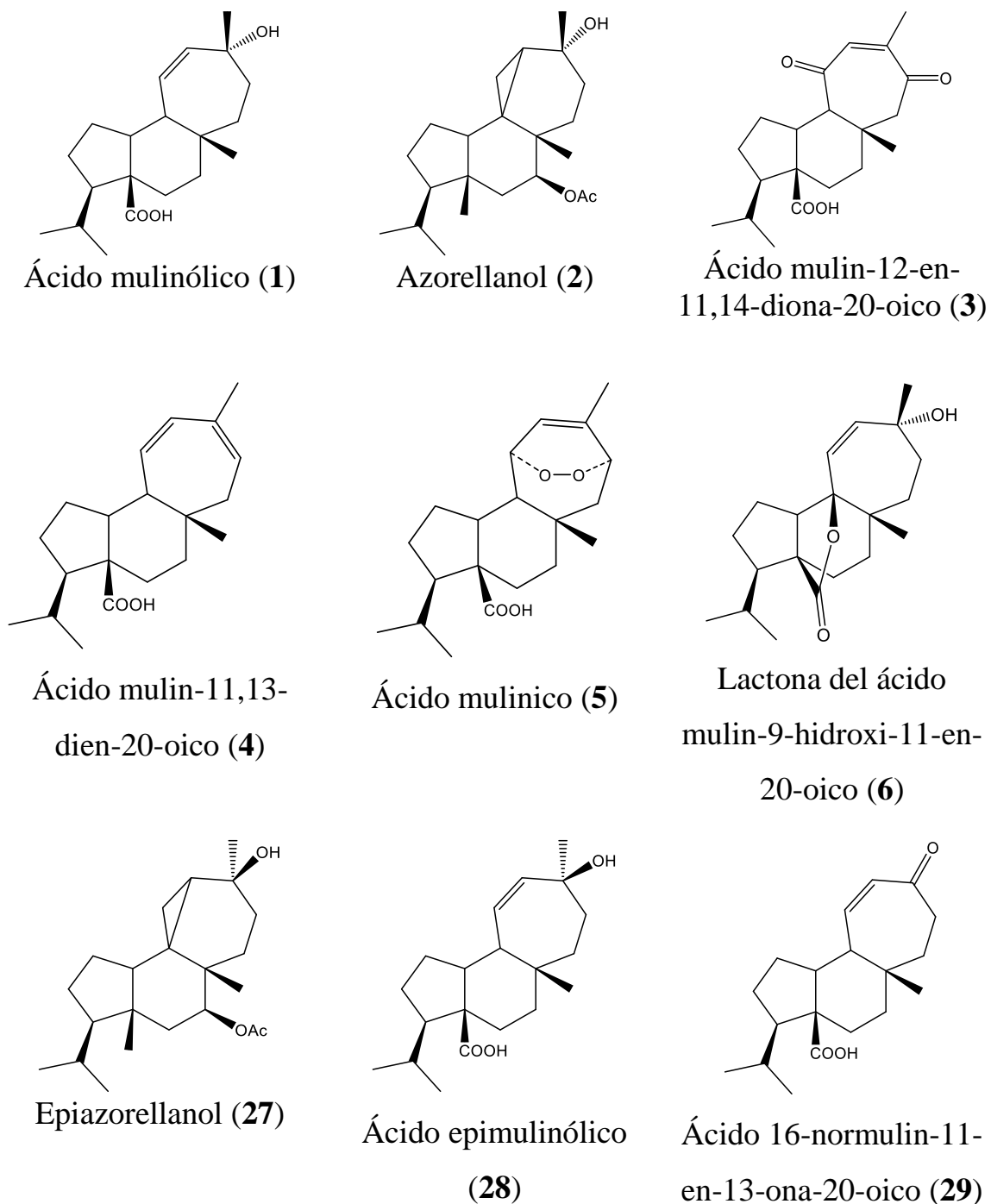


Figura 43: Diterpenos aislados desde partes aéreas de *Azorella compacta*.

De los nueve diterpenos aislados, ocho de ellos (1-6, 27 y 28 ver Figura 43) son conocidos y están descritos detalladamente en la literatura, por lo que su identificación no fue mayormente compleja, ya que existen registros



espectroscópicos de cada uno de ellos, y se cuenta con una base de patrones para comparar mediante CCF los compuestos aislados desde *Azorella compacta*.

### 6.2.1 Determinación estructural del compuesto 29

Uno de los diterpenos aislados fue el compuesto **29**, el cual se separó a través de una HPLC del tipo preparativa. Este presenta una nueva estructura que no había sido descrita en las investigaciones publicadas de *Azorella compacta* u otra especie del mismo género.

La estructura se dilucidó, en primer lugar, realizando comparaciones de los espectros  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -RMN, con una molécula similar ya descrita, y posteriormente con espectroscopia bidimensional y simuladores de RMN.

Se observó en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  que la estructura estaba compuesta por diecinueve carbonos, de los cuales tres eran metilos, seis metilenos, seis metinos y cuatro carbonos cuaternarios, incluyendo dos carbonilos, a diferencia de los esqueletos descritos para los diterpenos aislados de la tribu *Mulinae*, que están compuestos por veinte carbonos. Esta información se confirmó con el espectro de masa, que según la fragmentación, se obtuvo una fórmula molecular  $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_3$ , con una masa molar de 304,43 Da.

Con ayuda del espectro de RMN DEPT y HMQC se logró determinar que el carbono faltante correspondía al metilo dieciséis, ya que se observaron las señales de los metilos dieciocho y diecinueve en:  $\delta_{\text{C-H}}$  (ppm) = 22,66 (c) –

0,87 (d,  $J = 5,9$  Hz, 3H) y  $\delta_{C-H}$  (ppm) = 22,35 (c) – 1,05 (d,  $J = 5,9$  Hz, 3H), y la señal del metilo diecisiete en:  $\delta_{C-H}$  (ppm) = 26,88 (c) – 1,08 (s, 3H).

En el espectro de RMN  $^{13}C$  se presentaron cuatro señales en  $\delta = 131,0$  (d), 146,3 (d), 180,0 (s) y 204,4 (s) ppm, correspondientes a dos carbonos formando un enlace doble, un carbonilo de ácido carboxílico y un carbonilo de una cetona, respectivamente. Esta información se confirmó con los datos obtenidos del espectro de RMN  $^1H$ , donde se observaron las señales de los hidrógenos vinílicos en  $\delta = 5,95$  (d,  $J = 13,2$  Hz, 1H); 6,27 (dd,  $J = 6,5$  y 13,2 Hz, 1H) ppm, y del espectro de IR, que mostró principales absorciones de un grupo hidroxilo en  $3424\text{ cm}^{-1}$  y funciones carbonilo en  $1.692$  y  $1.639\text{ cm}^{-1}$ .

Tanto la cetona, como el enlace doble, sólo podían estar ubicados en el anillo de cicloheptano, ya que el resto de la estructura, es decir, los anillos de ciclopentano y ciclohexano, con sus sustituyentes, se mantenían igual al resto de los diterpenos descritos.

En los registros se contaba con un diterpeno que poseía una cetona  $\alpha,\beta$  insaturada en su estructura, descrito como el ácido mulin-12,14-dien-11-ona-20-oico (ver Figura 44). Sin embargo, este posee un segundo enlace doble en el anillo de cicloheptano, situando la cetona en el carbono-11. Esta estructura no era congruente con el diterpeno aislado, ya que en los espectros de RMN sólo se observó un enlace doble en el anillo de cicloheptano, por lo que se concluyó que el compuesto **5**, era un nuevo diterpeno.

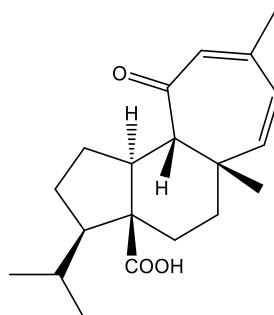


Figura 44: Estructura del ácido mulin-12,14-dien-11-ona-20-oico.

Se determinó que la cetona de la nueva estructura se encontraba en el carbono-13 del anillo de cicloheptano, a través de la multiplicidad de las señales de los hidrógenos vinílicos en posición  $\alpha$  a la cetona. Una de las señales se observó como un doble doblete y la otra como un doblete, esto quiere decir, que el enlace doble está situado entre el carbono de la cetona y un CH. Por lo tanto, se infirió que la cetona se ubicaba en el carbono-13 con el enlace doble entre el carbono-11 y el carbono-12, porque si ambos grupos funcionales se localizaran en otro lugar, la multiplicidad de los hidrógenos vinílicos se modificaría, ya que el enlace doble estaría enlazado a un carbono  $\text{CH}_2$ . Esta información se confirmó una vez identificadas las señales en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  de los hidrógenos del carbono-9 y carbono-11, donde la constante de acoplamiento para ambas es  $J = 6,5$  Hz.

Una vez determinada la estructura del ácido 16-normulin-11-en-13-ona-20-oico se hizo una comparación entre los hidrógenos ubicados en el carbono-10 y carbono-9, para confirmar la orientación de este último.

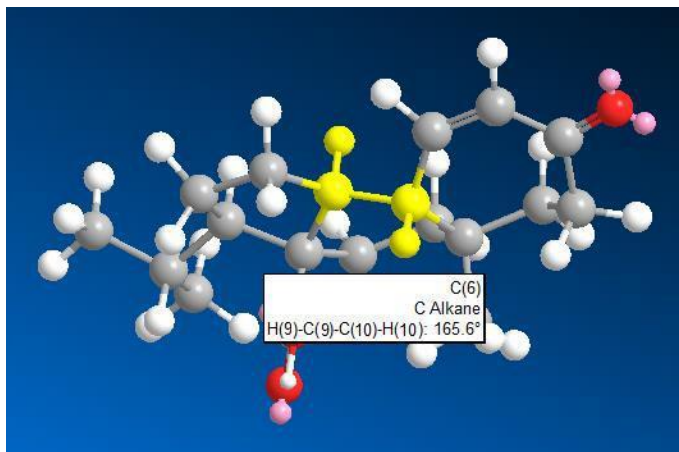


Figura 45: Valor del ángulo diedro entre hidrógenos nueve y diez en posición *trans*.

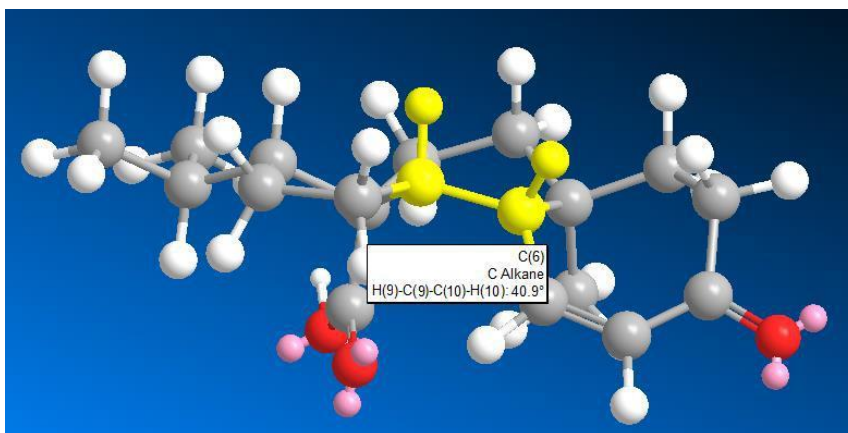


Figura 46: Valor del ángulo diedro entre hidrógenos nueve y diez en posición *cis*.

En posición *cis*, el ángulo entre ambos hidrógenos tiene un valor de  $40,9^\circ$  lo que arrojó un  $J$  calculado cercano a 6,1 Hz para esta estructura (ver Figura 45). Por otro lado, para los hidrógenos en posición *trans*, el ángulo diedro tiene un valor de  $165,6^\circ$  (ver Figura 46), con una constante de acoplamiento calculada de 11,3 Hz (medido según la ecuación Haasnoot-de Leeuw-Altona). El  $J$  observado en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  para ambos hidrógenos

es de 11,4 Hz por lo que se concluyó que están orientados en posición *trans* (ver Figura 47).

Se repitió el espectro de RMN  $^1\text{H}$  usando como solvente benceno- $\text{D}_6$  determinándose un  $J$  de 11,8 Hz lo que ratificó la posición del hidrógeno unido al carbono-9.

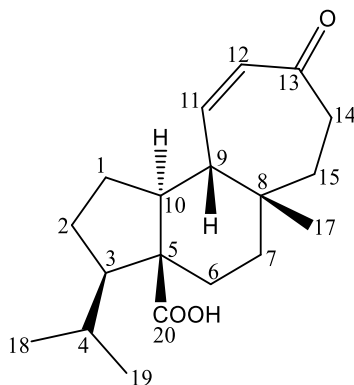


Figura 47: Estructura final del ácido 16-normulin-11-en-13-ona-20-oico (compuesto **29**).

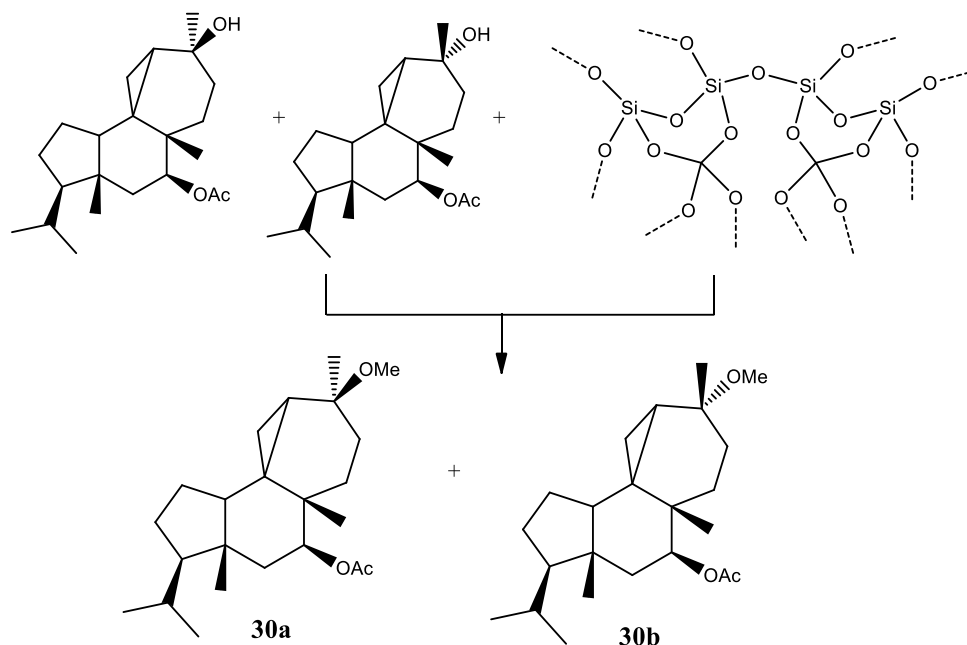
### 6.3 Reacciones químicas sobre diterpenos

#### 6.3.1 Modificaciones sobre azorellanol (2)

Se realizó una reacción con una mezcla de azorellanol (**2**) y epiazorellanol (**27**) impregnados en sílica gel para determinar el efecto de este último sobre los compuestos. En primer lugar la reacción se llevó a cabo sin solvente, aumentando la temperatura utilizando una placa calefactora, y luego mediante microondas, sin observarse formación de productos. Posteriormente se agregó metanol como solvente, manteniéndose bajo

reflujo, y siguiendo la reacción a través de CCF. Se obtuvo una mezcla de dos compuestos mayoritarios, **30a** (12%) y **30b** (49%) (ver Esquema 1).

### ESQUEMA 1. Oxidación del compuesto **2** y **27** sobre sílica gel.

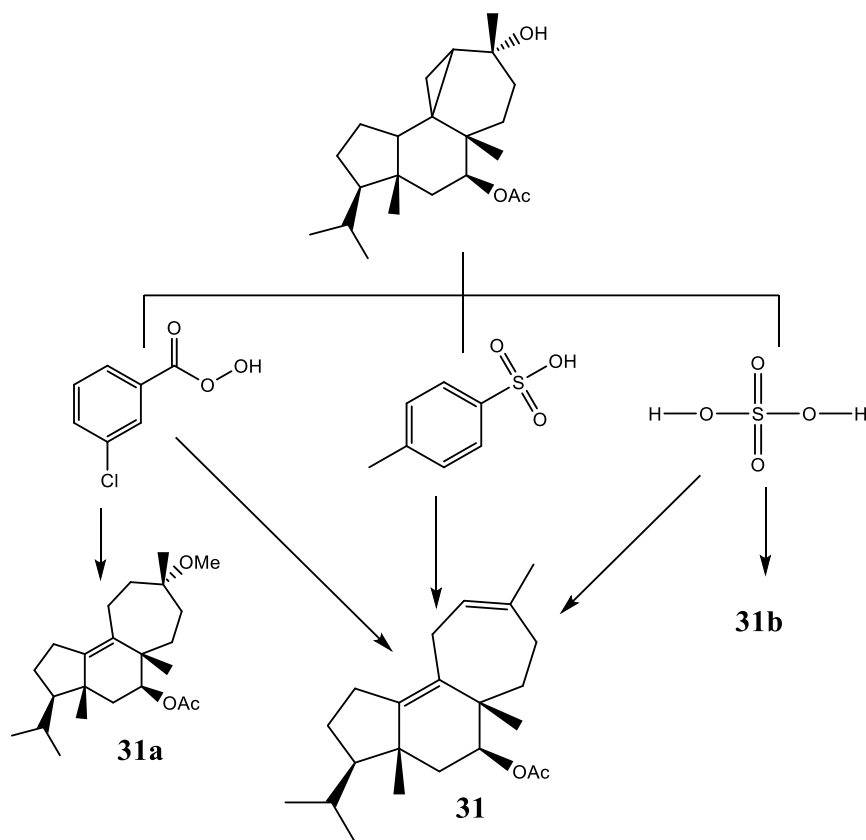


Las estructuras de los productos se determinaron a través de la comparación de sus espectros de RMN  $^1\text{H}$  con los compuestos de partida, donde se observaron los hidrógenos del anillo de ciclopropano, los cuales permiten diferenciar entre ambos epímeros. Para el compuesto **30a** los hidrógenos de los carbono-11 y carbono-12 se encuentran a  $\delta = 0,50$  ppm (m, 1H),  $0,75$  ppm (m, 1H) y  $0,64$  ppm (m, 1H), respectivamente. Mientras que para el compuesto **30b** los hidrógenos del carbono-11 se observan en  $\delta = 0,71$  ppm (m, 2H), en una señal solapada, y el hidrógeno del carbono-12 desplazado en  $\delta = 0,11$  ppm (m, 1H).

El compuesto **30a** presenta: un metilo sobre el carbono-13 en  $\delta = 1,32$  ppm (s, 3H), el hidrogeno del carbono-7, geminal al grupo acetato, en  $\delta = 5,19$  ppm (dd,  $J = 7,1$  y  $11,4$  Hz, 1H), el hidrógeno, orientado en posición  $\alpha$ , del carbono-6 en  $\delta = 2,17$  ppm (dd,  $J = 7,1$  y  $13,8$  Hz, 1H), el hidrógeno del carbono-10 en  $\delta = 2,30$  ppm (m, 1H) y el metoxilo sobre el carbono-13, en  $\delta = 3,67$  ppm (s, 3H). Por otro lado, el compuesto **30b** presenta: el metilo del carbono-13 en  $\delta = 1,15$  ppm (s, 3H), el hidrógeno del carbono-7 en  $\delta = 5,24$  ppm (dd,  $J = 7,1$  y  $11,3$  Hz, 1H), el hidrógeno con orientación  $\alpha$  del carbono-6 en  $\delta = 2,17$  ppm (dd,  $J = 7,1$  y  $13,8$  Hz, 1H), el hidrógeno del carbono-10 en  $\delta = 2,37$  ppm (dd,  $J = 7,2$  y  $12,4$  Hz, 1H) y el metoxilo del carbono-13 en  $\delta = 3,13$  ppm (s, 3H).

Se realizó reacciones para producir la deshidratación y apertura del anillo de ciclopropano en el azorellanol (**2**). Se probó con tres ácidos distintos para determinar si era posible la formación de otros productos mayoritarios, según la acidez y características de los reactivos utilizados. Los ácidos empleados fueron: ácido sulfúrico, ácido 3-cloroperoxibenzoico y ácido *para*-toluensulfónico (ver Esquema 2).

## ESQUEMA 2. Apertura del ciclopropano en medio ácido.



El ácido sulfúrico es un ácido fuerte, por lo que se esperaba, que además de formarse el compuesto de apertura del anillo de ciclopropano por deshidratación del alcohol, se formara otro producto, posiblemente con un enlace doble o con apertura de alguno de los anillos debido a la presencia del grupo acetato en la estructura. En primer lugar, se obtuvo el producto de deshidratación (compuesto **31**) con un rendimiento del 56%. También, se logró separar un producto minoritario que experimentó la ruptura de uno de los anillos, con formación de enlaces dobles e hidrólisis del grupo acetato. Probablemente esto se debió a que el ácido utilizado es muy enérgico.



Se obtuvo 4 mg del compuesto **31b**, se realizó espectroscopía de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HMBC y HMQC, con lo que se logró determinar ciertas características del compuesto, pero no toda su estructura, estas características son:

- El compuesto **31b** está formado por dieciocho carbonos, donde cuatro son metilos, seis metilenos, seis metinos y dos carbonos cuaternarios. Por lo que se concluyó que por lo menos uno de los anillos sufrió ruptura, perdiendo dos carbonos.
- Se elimina el grupo hidroxilo del carbono-16, experimentando la apertura del anillo de ciclopropano.
- Se elimina el grupo acetato.
- Se observa en los espectros de RMN la presencia de cuatro señales de carbonos que forman parte de dos enlaces dobles en  $\delta = 106,61$  ppm (t),  $115,97$  ppm (d),  $140,24$  ppm (s) y  $158,06$  ppm (s), con los hidrógenos desplazados en  $\delta = 4,77$  ppm (t,  $J = 1,6$  Hz, 1H);  $4,90$  ppm (t,  $J = 1,6$  Hz, 1H) y  $5,10$  ppm (m, 1H).
- Uno de los enlaces dobles es terminal con dos hidrógenos vinílicos geminales, mientras que el segundo enlace doble es interno, con un solo hidrógeno vinílico.
- Se observan señales correspondientes a los grupos metilo del fragmento isopropilo del producto de partida en  $\delta = 0,89$  ppm (d,  $J = 5,8$  Hz, 3H) y  $0,92$  ppm (d,  $J = 5,8$  Hz, 3H).

El ácido *meta*-cloroperoxibenzoico es un reactivo utilizado para la formación de epóxidos o productos oxigenados, a partir de reacciones de adición sobre enlaces dobles. En esta oportunidad se esperaba conseguir la formación de productos deshidratados y oxigenados, considerando que en la estructura de azorellanol (**2**) se presenta un anillo de ciclopropano. En esta reacción se logró obtener el producto esperado (compuesto **31**) con un 71% de rendimiento y también fue posible separar un producto minoritario (compuesto **31a**), con un rendimiento del 10%.

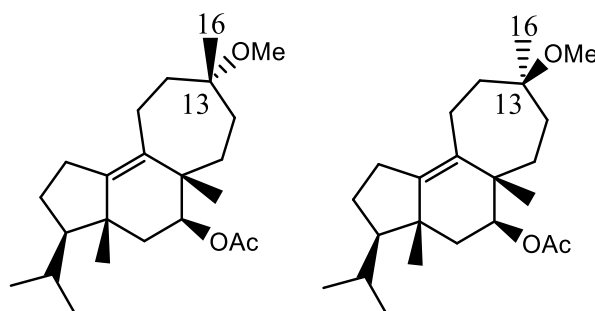
En los espectros de RMN del compuesto **31a**, se aprecia la presencia de un enlace doble en el anillo del ciclohexano y un grupo metoxilo en el carbono C-13, donde anteriormente estaba presente el grupo hidroxilo. Este proceso, conocido como solvólisis, se ve favorecido por la presencia de un buen grupo saliente y un sustrato terciario. De esta forma, ocurrió una reacción de sustitución nucleofílica en la posición C-13 (ver figura 48), seguida de la apertura del anillo del ciclopropano para formar el enlace doble en el anillo de ciclohexano.

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **31a** se observó la señal del grupo metoxilo en  $\delta = 3,16$  ppm (s, 3H), y la señal correspondiente al hidrógeno del carbono-7, geminal al grupo acetato, en  $\delta = 4,83$  ppm (dd,  $J = 6,3$  y  $11,3$  Hz, 1H).

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  se observó la formación de un enlace doble por dos señales observadas en  $\delta = 144,07$  ppm (s) y  $132,98$  ppm (s), asignadas al carbono-9 y carbono-10, respectivamente. También se observaron las señales del carbono-7 en  $\delta = 72,54$  ppm (d), unido al grupo acetato, y del

carbono-16 en  $\delta = 74,48$  ppm (s), unido al metoxilo, además de la presencia de la señal en  $\delta = 170,85$  ppm (s), del carbono carbonílico del grupo acetato.

La estereoquímica del carbono-16 en el compuesto **31a** (ver Figura 48) se propuso a través de la comparación de los espectros RMN  $^1\text{H}$  real y simulados, utilizando programas de RMN (<http://www.nmrdb.org/predictor/>). Se propuso que el grupo metoxilo ubicado en el carbono-13 está en orientación  $\alpha$ , debido a que el espectro simulado para esta estructura presentó una mayor congruencia con el desplazamiento de las señales de los hidrógenos adyacentes al enlace doble y al grupo metoxilo ( $\delta_{\text{H-11};\text{H-12}}$  entre 1,80 y 2,50 ppm calculado/1,70 y 2,30 ppm experimental). Al realizar la simulación del espectro RMN  $^1\text{H}$  con el grupo metilo en orientación  $\beta$ , la señal del hidrógeno de carbono-12 se desplaza a campo bajo, muy cercana a la señal del grupo metoxilo, mientras que la señal del hidrógeno del carbono-11 se desplaza a campo alto, lo que difiere notoriamente del espectro experimental ( $\delta_{\text{H-11};\text{H-12}}$  entre 1,60 y 2,80 ppm teórico).



Figuras 48: Estructuras simuladas para el compuesto **31a**.

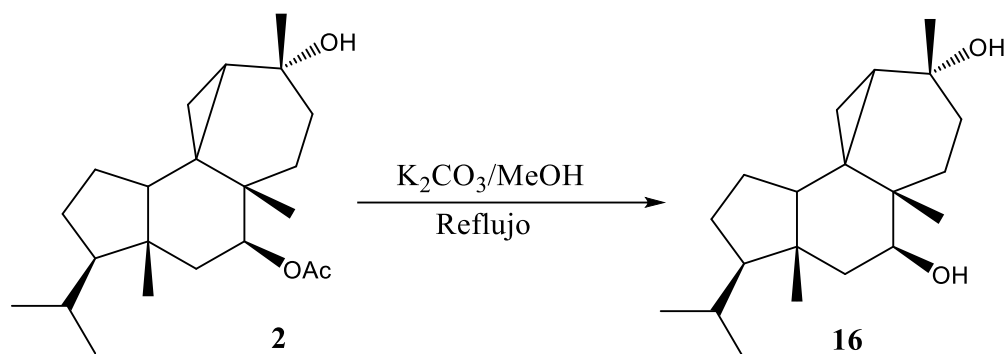
Por último, la reacción que presentó mayor rendimiento, fue la de azorellanol (**2**) con ácido *para*-toluensulfónico, con un 84%, donde se esperaba como producto mayoritario la formación del compuesto de deshidratación, ya que este procedimiento había sido descrito anteriormente [92].

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  del producto **31** se observó un hidrógeno vinílico en  $\delta = 5,41$  ppm (da,  $J = 8,2$  Hz, 1H), y los hidrógenos del carbono-11 en  $\delta = 2,47$  ppm (dd,  $J = 8,2$  y  $16,2$  Hz,) y  $2,74$  ppm (da,  $J = 16,2$  Hz), cada uno integrado para un hidrógeno, lo que indica que el anillo de ciclopropano experimento apertura dando paso a formación de dos enlaces dobles. Se mantiene el grupo acetato observándose dos señales en  $\delta = 2,05$  ppm (s, 3H) y  $4,96$  ppm (dd,  $J = 5,6$  y  $10,5$  Hz, 1H), correspondientes a un grupo acetato y a un hidrógeno, respectivamente, ambos sobre el carbono-7.

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  se observan los cuatro carbonos olefínicos y el carbono carbonílico del grupo acetato en:  $\delta = 121,39$  ppm (d, C-12),  $131,85$  ppm (s, C-10),  $136,62$  ppm (s, C-13);  $142,03$  ppm (s, C-9) y  $170,73$  ppm (s, OAc).

Luego se realizó la reacción de hidrólisis del grupo acetato presente en el carbono-7 de azorellanol (**2**), utilizando  $\text{K}_2\text{CO}_3$  en MeOH bajo reflujo, obteniéndose el producto final con dos alcoholes, uno en el carbono-7 y otro en el carbono-13 (compuesto **16**), con un 92% de rendimiento (ver Esquema 3).

### ESQUEMA 3. Hidrólisis del compuesto 2 utilizando K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.



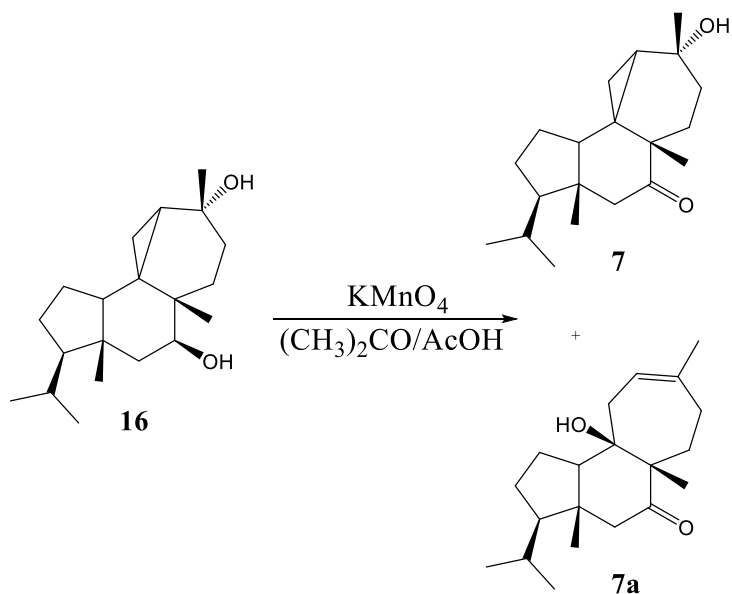
El espectro de RMN <sup>1</sup>H da cuenta de la ausencia del grupo acetato y el desplazamiento de la señal del hidrógeno del carbono-7 a  $\delta = 4,04$  ppm (dd,  $J = 6,8$  y  $11,3$  Hz), la cual está acoplada al hidrogeno en orientación  $\alpha$  del carbono-6 en  $\delta = 2,22$  ppm (dd,  $J = 6,8$  y  $13,9$  Hz), las dos señales integrando para un hidrógeno. Además se observó las señales de los dos hidrógenos del carbono-11 en  $\delta = 0,65$  ppm (m, 1H) y  $0,77$  ppm (dd,  $J = 5,7$  y  $9,8$  Hz, 1H), y la señal del hidrógeno en el carbono-12 en  $\delta = 0,12$  ppm (t,  $J = 5,7$  Hz, 1H). Esto dejó en evidencia que el anillo de ciclopropano no experimentó apertura en la reacción.

En el espectro de RMN <sup>13</sup>C se observó las señales de los carbonos unidos a los grupos hidroxilo en  $\delta = 70,34$  (s) y  $76,82$  (d) ppm, los que corresponden al carbono-13 y carbono-7, respectivamente.

Se realizó la oxidación del alcohol secundario del azorellanol hidrolizado (**16**) para obtener una cetona, utilizándose KMnO<sub>4</sub> en medio ácido como oxidante. Se obtuvo el compuesto **7** con un bajo porcentaje de rendimiento (26%), pudiéndose recuperar parte del compuesto de partida. Posiblemente,

el bajo rendimiento de la reacción este asociado al oxidante usado o al tiempo de reacción. El permanganato de potasio es un oxidante fuerte que pudo haber oxidado la molécula en otras posiciones, generando la apertura de los anillos y descomponiendo la estructura inicial. Esto quedó demostrado con la formación y separación del compuesto **7a**, un producto minoritario de la reacción que fue aislado mediante HPLC preparativa y del cual se obtuvo un 12% de rendimiento (ver Esquema 4).

#### ESQUEMA 4. Oxidación del compuesto 16 utilizando $\text{KMnO}_4$ .



Para el compuesto **7**, el espectro de RMN  $^1\text{H}$  muestra las señales de los hidrógenos en el carbono-6, ubicados en posición  $\alpha$  a la cetona, en  $\delta = 2,53$  ppm (d,  $J = 17,9$  Hz, 1H) y 2,72 ppm (d,  $J = 17,9$  Hz, 1H), estos fueron asignados por el desplazamiento que presentan y su gran constante de acoplamiento.

El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  muestra las señales del carbono-13, unido al grupo hidroxilo, en  $\delta = 69,05$  ppm (s), una señal en  $\delta = 53,22$  ppm (t) asignada al carbono-6, adyacente a la cetona, y una señal desplazada a campo bajo en  $\delta = 217,69$  ppm (s) correspondiente al carbono carbonílico de la cetona.

En el espectro RMN  $^1\text{H}$  de compuesto **7a** se observaron las señales del hidrógeno vinílico, sobre el carbono-12, en  $\delta = 5,31$  ppm (da,  $J = 1,5$  Hz), dos señales correspondientes a los hidrógenos del carbono-11 en  $\delta = 2,60$  ppm (dd,  $J = 1,5$  y  $14,5$  Hz, 1H) y  $1,77$  ppm (dd,  $J = 8,8$  y  $14,5$  Hz, 1H), y las señales de los hidrógenos del carbono-6, adyacente a la cetona, en  $\delta = 2,66$  y  $2,51$  ppm (d,  $J = 13,3$  Hz), cada una integrando para un hidrógeno.

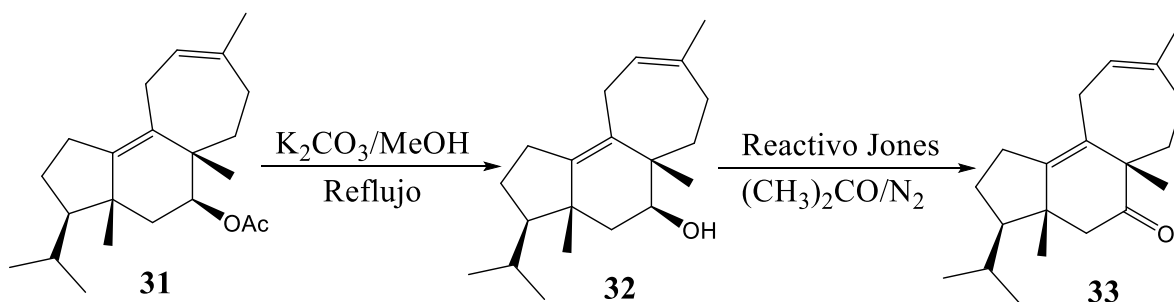
Por otro lado, en los espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  y  $^{13}\text{C}$  DEPT-135 del compuesto minoritario **7a** se observó las señales del carbono-7, del grupo carbonilo de la cetona, en  $\delta = 215,16$  ppm (s), la señal del carbono-9, unido al grupo hidroxilo, en  $\delta = 76,41$  ppm (s), y las señales de dos carbonos que forman parte de un enlace doble en  $\delta = 119,61$  ppm (d) y  $143,10$  ppm (s), las que corresponden al carbonos-12 y carbono-13, respectivamente. Además se observó el desplazamiento a campo bajo de la señal del metilo dieciséis en  $\delta = 1,72$  ppm (s, 3H).

La estereoquímica del carbono-9 del compuesto **7a** se propuso mediante la simulación de los espectros de RMN  $^1\text{H}$ . Al realizar la simulación de los espectros para ambas estructuras se logró determinar que para la orientación  $\alpha$  del hidroxilo en el carbono-9, los hidrógenos del carbono-11 se observan a un mismo desplazamiento, mientras que para la orientación  $\beta$  ambas

señales aparecen distanciadas en aproximadamente en 0,5 ppm, acercándose más al espectro de RMN  $^1\text{H}$  experimental. La separación en el desplazamiento de la señales puede estar asociada a que uno de los hidrógenos del carbono-11 tendría interacción con el grupo hidroxilo del carbono-9 y con el metilo diecisiete, aumentando su desapantallamiento.

Luego se propuso formar nuevamente una cetona partiendo de azorellanol (**2**), pero en esta oportunidad se comenzó con la apertura del anillo de ciclopropano (ver Esquema 5). Partiendo del compuesto **31** se obtuvo el compuesto **32** con un porcentaje de rendimientos del 87%, y posteriormente, se obtuvo el compuesto **33**, con un rendimiento que alcanzó el 20%.

#### ESQUEMA 5. Hidrólisis del compuesto **31** y posterior oxidación.



Las estructuras se determinaron por la comparación de los espectros  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -RMN. Para el compuesto **32** se observó en los espectros de RMN las señales en  $\delta = 5,42$  ppm (da,  $J = 8,3$  Hz, 1H) y en  $\delta = 3,73$  ppm (dd,  $J = 5,8$  y  $11,4$  Hz, 1H) que son asignadas al único hidrógeno vinílico sobre el carbono-12, y al hidrógeno del carbono-7, geminal al grupo hidroxilo,



respectivamente. También se observaron las señales de los dos hidrógenos del carbono-11, ubicado entre los dos enlaces dobles, en  $\delta = 2,46$  ppm (dd,  $J = 8,3$  y  $16,0$  Hz) y  $2,76$  ppm (d  $J = 16,0$  Hz), y los hidrógenos del carbono-6, adyacente al grupo hidroxilo, en  $\delta = 2,29$  ppm (dd,  $J = 5,8$  y  $13,5$  Hz) y  $\delta = 1,49$  ppm (dd,  $J = 11,4$  y  $13,5$  Hz), ambas señales integradas para un hidrógeno.

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto **32**, se observaron los cuatro carbonos que forman parte de los enlaces dobles en  $\delta = 121,73$  ppm (d, C-12),  $132,73$  ppm (s, C-10),  $136,30$  ppm (s, C-13) y  $141,84$  ppm (s, C-9), mientras que el carbono-7, unido al grupo hidroxilo, observó en  $\delta = 69,16$  ppm (d).

Para el compuesto **33**, la señal del hidrógeno en el carbono-7 desaparece y los hidrógenos del carbono-6 se distinguieron como dos dobletes en  $\delta = 2,19$  ppm (1H) y  $2,80$  ppm (1H), con una constante de acoplamiento,  $J = 14,5$  Hz. También se apreció la señal del hidrógeno vinílico del carbono-12 en  $\delta = 5,46$  ppm (d,  $J = 7,8$  Hz, 1H). Los cuatro carbonos que forman parte de los enlaces dobles se observaron en  $\delta = 123,23$  ppm (d, C-12),  $131,09$  ppm (s, C-9),  $137,77$  ppm (s, C-10) y  $142,73$  ppm (s, C-13), mientras que el carbono-7 en  $\delta = 218,32$  ppm (s), el cual corresponde a la cetona.

### 6.3.2 Oxidación de ácido mulinólico (1)

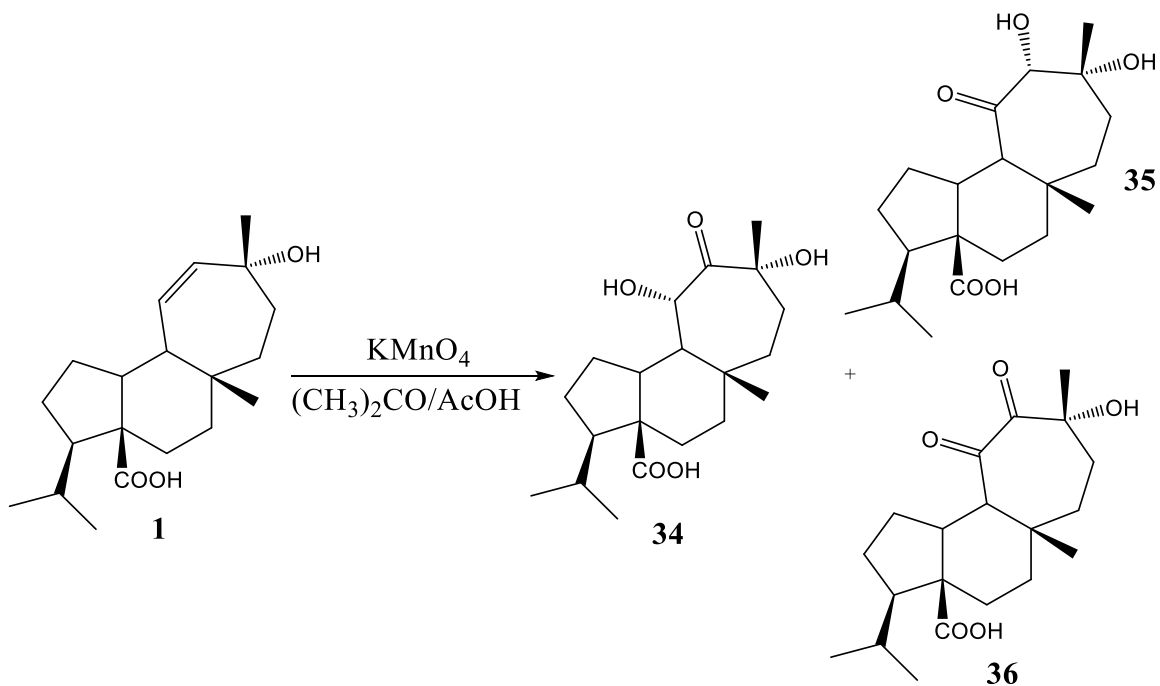
Se realizó la reacción de oxidación con  $\text{KMnO}_4$  en medio ácido con el objetivo de determinar si era posible la formación de un diol en el ácido mulinólico (**1**), como compuesto mayoritario. Sin embargo, se obtuvieron tres compuestos mayoritarios, con diferente grado de oxidación. Es probable que se hayan obtenido estos compuestos por las condiciones en las que se llevó a cabo la reacción.

En primer lugar la reacción se dispuso sobre agua/hielo sin obtener buenos resultados, por este motivo se dejó a temperatura ambiente ( $20^\circ\text{C}$  aproximadamente) durante 12 horas, sin tener un mayor control de la temperatura durante este periodo. Además se agregó un exceso de permanganato de potasio para conseguir la completa oxidación del compuesto inicial.

Posiblemente las condiciones antes descritas no hayan sido las óptimas para obtener un mayor rendimiento de los productos, ya que la temperatura pudo haber sido muy alta para la reacción, que junto al exceso de permanganato de potasio, generaron oxidaciones en otros puntos del diterpeno provocando la ruptura de la estructura.

El rendimiento de la reacción fue de: 17% para el compuesto **34**, 14% para el compuesto **35** y 11% para el compuesto **36** (ver Esquema 6).

## ESQUEMA 6. Oxidación del compuesto 1 utilizando $\text{KMnO}_4$ .



La determinación de la estructura de los productos se realizó mediante espectroscopía  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -RMN, comparando los resultados experimentales, con los simulados a través de programas de RMN (MestReNova y ChemBio).

Para el compuesto **34**, se observó en el espectro RMN  $^{13}\text{C}$  la presencia de dos señales desplazadas a campo bajo, en  $\delta = 178,72$  ppm (s) y  $215,35$  ppm (s), correspondientes a los carbonos carbonílicos del ácido carboxílico y de la cetona, respectivamente. También se apreciaron las señales en  $\delta = 77,71$  ppm (d) y  $79,07$  ppm (s), asignadas al carbonos-11 y carbono-13, unidos a grupos hidroxilo. En el espectro RMN  $^1\text{H}$  se confirmó que el doble enlace fue oxidado, ya que no se observaron las señales de los hidrógenos vinílicos. En cambio, sólo se observó la señal a campo bajo correspondiente

al hidrógeno del carbono-11, geminal al grupo hidroxilo, en  $\delta = 4,67$  ppm (d,  $J = 0,9$  Hz, 1H).

Con los datos de multiplicidad de la señal del hidrógeno del carbono-11, y su constante de acoplamiento, fue posible conocer la ubicación y orientación del hidroxilo en el carbono-11 del compuesto **34**.

A través del cálculo del ángulo diedro formado entre los hidrógenos del carbono-9 y carbono-11, se logró describir la estereoquímica del carbono-11. Para los hidrógenos en posición *cis*, el ángulo diedro calculado es  $47,8^\circ$  (ver Figura 49), lo que arrojó en una constante de acoplamiento  $J = 3,5$  Hz. Por otro lado, para los hidrógenos en posición *trans*, el ángulo diedro tiene un valor de  $178,9^\circ$  (ver Figura 50), con una constante de acoplamiento de 11,7 Hz.

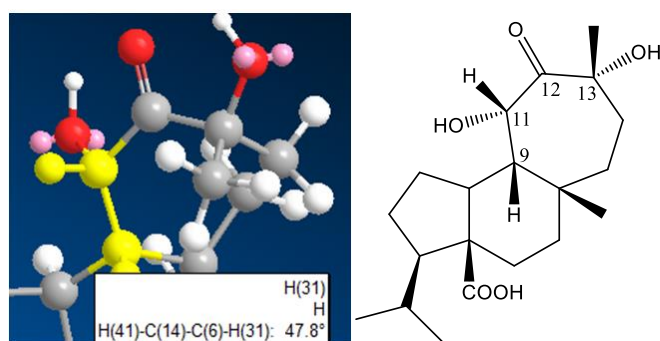


Figura 49: Determinación ángulo diedro con hidrógenos en posición *cis* del compuesto **34**.

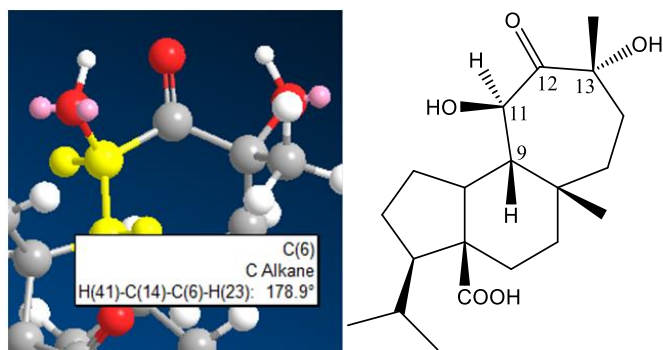


Figura 50: Determinación ángulo diedro con hidrógenos en posición *trans* del compuesto **34**.

Por lo tanto, con los hidrógenos del carbono-9 y carbono-11 en posición *cis*, la constante de acoplamiento calculada es pequeña al igual que la constante de acoplamiento experimental ( $J \approx 1$  Hz), cuyo valor difiere radicalmente del valor de  $J$  obtenida teóricamente con los hidrógenos en posición *trans*.

Los espectros de RMN del compuesto **35** presentaron señales similares al compuesto **34**, por lo que se dedujo que se pudo haber formado una cetona y un grupo hidroxilo, pero en esta oportunidad cambiando las posiciones de los carbonos. En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  se observó una señal en  $\delta = 4,46$  ppm (s, 1H) que corresponde al hidrógeno del carbono-12, geminal al grupo hidroxilo, y una señal en  $\delta = 2,50$  ppm (da,  $J = 12,3$  Hz, 1H), que se asignó al hidrógeno del carbono-9, ubicado en posición  $\alpha$  con respecto a la cetona. Por otro lado, en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  se observaron las señales del carbono-12 y carbono-13, unidos a los grupos hidroxilo, en  $\delta = 84,08$  ppm (d) y  $77,61$  ppm (s), respectivamente, y las señales de los carbonos carbonílicos en  $\delta = 179,41$  ppm (s), para el ácido carboxílico, y  $\delta = 212,54$  ppm (s), para la cetona.

La orientación del hidroxilo del carbono-12 del compuesto **35**, se propuso realizando la simulación de los espectros para las estructuras con el hidroxilo en orientación  $\alpha$  y  $\beta$ . Los desplazamientos experimentales de los hidrógenos del carbono-12 y del metilo dieciséis, son semejantes a los desplazamientos del espectro simulado para la estructura con orientación  $\alpha$  ( $\delta_{\text{H-12}} = 4,39$  ppm calculado/4,46 ppm experimental;  $\delta_{\text{H-16}} = 1,14$  ppm cal./1,14 ppm exp.). Por el contrario, para el hidroxilo con orientación  $\beta$ , ambas señales se desplazan debido al acoplamiento que generaría tener los hidroxilos en posición *trans* ( $\delta_{\text{H-12}} = 4,19$  ppm calculado;  $\delta_{\text{H-16}} = 1,16$  ppm teor.).

Por último, en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto **36** se observaron dos señales en  $\delta = 209,20$  ppm (s) y 211,23 ppm (s) ppm que se asignan a dos cetonas formadas en el carbono-11 y carbono-12, respectivamente. Además se observaron las señales del carbono carbonílico del ácido carboxílico en  $\delta = 178,31$  ppm (s) y la del carbono-13, unido al grupo hidroxilo, en  $\delta = 75,11$  ppm (s). Esto se confirmó con la presencia de dos señales desplazadas a campo bajo en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  en  $\delta = 2,29$  ppm (m, 1H) y 2,57 ppm (d,  $J = 11,5$  Hz, 1H), correspondientes a los hidrógenos del carbono-10 y carbono-9, respectivamente.

### 6.3.3 Metilación de los diterpenos **1**, **3**, **4**, **28**, **29** y **34**

Se realizaron reacciones de metilación en los diterpenos que en su estructura presentaban un ácido carboxílico, esto se llevó a cabo utilizando diazometano, como agente metilante. Este reactivo no generó subproductos y el exceso se volatilizó rápidamente por lo que no fue necesario separar o

purificar los productos obtenidos. El rendimiento de la reacción fue de un 100%.

Los productos obtenidos se determinaron mediante comparación en CCF con los compuestos de partida (ver Figura 51). Los compuestos metilados fueron: ácido mulinólico (**1**), ácido mulin-12-en-11,14-diona-20-oico (**3**), ácido mulin-11,13-dien-20-oico (**4**), ácido epimulinólico (**28**), ácido 16-normulin-11-en-13-ona-20-oico (**29**) y el compuesto **34**.

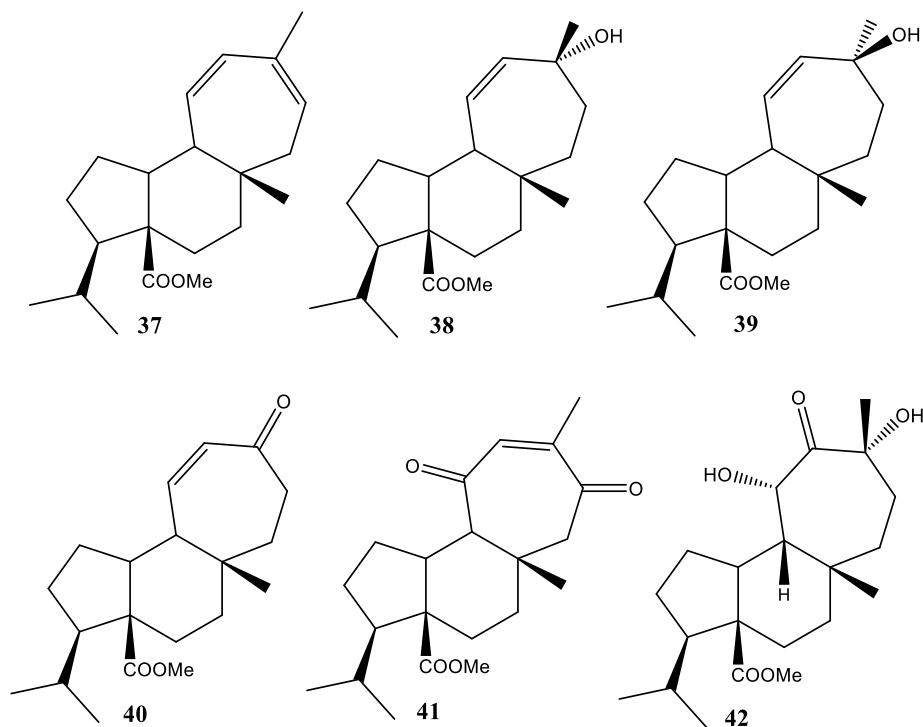


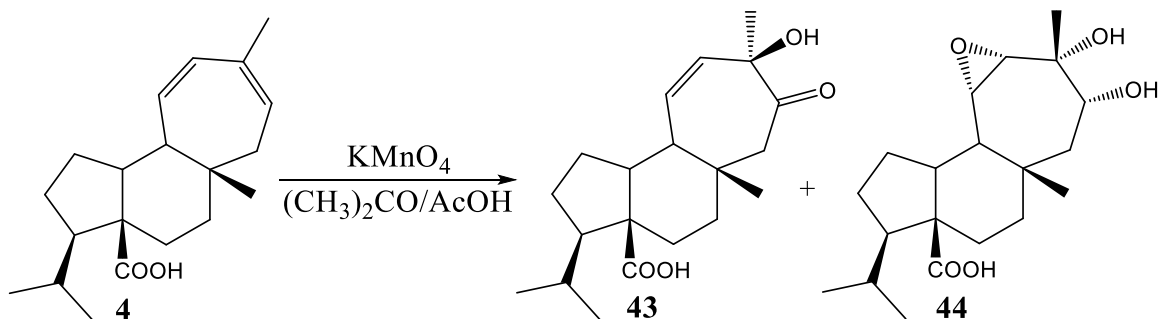
Figura 51: Estructura de compuesto metilados.

#### 6.3.4 Reacciones sobre ácido mulin-11,13-dien-20-oico (**4**)

El ácido mulin-11,13-dien-20-oico (**4**) es uno de los diterpenos más abundantes presentes en *Azorella compacta* es por esto que fue uno de los compuestos de partida para algunas reacciones.

En primer lugar se realizó la oxidación de este compuesto utilizando  $\text{KMnO}_4$  en medio ácido y a temperatura ambiente, obteniéndose el compuesto **44** como producto mayoritario con un rendimiento de 37%, y el compuesto **43** con un rendimiento del 9% (ver Esquema 7).

#### ESQUEMA 7. Oxidación del compuesto **4** utilizando $\text{KMnO}_4$ .



El compuesto **43** se determinó mediante espectroscopía de RMN  $^1\text{H}$ , observándose las señales de los hidrógenos del carbono-15, ubicado en posición  $\alpha$  con respecto a la cetona, en  $\delta = 3,18$  ppm (d,  $J = 12,5$  Hz, 1H) y 2,31 ppm (d,  $J = 12,5$  Hz, 1H). También se aprecian dos señales correspondientes a los hidrógenos del carbono-11 y carbono-12, los cuales



forman parte del enlace doble, en  $\delta = 5,58$  ppm (d,  $J = 12,1$  Hz) y en  $5,78$  ppm (dd,  $J = 12,1$  Hz,  $8,8$  Hz), donde cada señal integra para un hidrógeno.

Se propuso la estereoquímica del carbono-13 del compuesto **43** mediante la simulación de los espectros de RMN  $^1\text{H}$ , considerando al hidroxilo en orientación  $\alpha$  y  $\beta$ . En este último fue donde se registraron las mayores similitudes, ya que se pudo observar que el hidrógeno del carbono-12 presentó el mismo desplazamiento con respecto al espectro de RMN  $^1\text{H}$  experimental ( $\delta_{\text{H-12}} = 5,78$  ppm calculado/ $5,78$  ppm exp.), mientras que la señal del metilo dieciséis se observó  $\delta_{\text{H-16}} = 1,46$  ppm calc./ $1,41$  ppm exp. Además, las señales de los hidrógenos del carbono-10 y carbono-9 se presentaban a una misma diferencia de desplazamiento ( $\Delta\delta_{\text{C10-C9}} = 0,20$  ppm calc./ $0,27$  ppm exp.).

Por el contrario, en la simulación del espectro de RMN  $^1\text{H}$  con orientación  $\alpha$ , la señal del hidrógeno del carbono-12 se registró a  $\delta_{\text{H-12}} = 5,68$  ppm, mientras que la señal de los hidrógenos del metilo dieciséis se observó a  $\delta_{\text{H-16}} = 1,51$  ppm, observándose también que las señales de los hidrógenos del carbono-9 y carbono-10 se encontraban solapadas ( $\Delta\delta_{\text{C10-C9}} \approx 0$ ).

Otra señal importante que se comparó fue la de los hidrógenos del carbono-15, las cuales se observaron solapadas en el espectro simulado para la estructura con orientación  $\alpha$ , a diferencia del espectro de RMN  $^1\text{H}$  experimental, donde las señales de dichos hidrógenos se encontraban distanciadas, del mismo modo que en la simulación de la estructura con orientación  $\beta$  ( $\Delta\delta_{\text{H15}\alpha\text{-H15}\beta} = 0,3$  ppm calc./ $0,9$  ppm exp.). El desplazamiento de la señales de los hidrógenos del carbono-15 se puede explicar por la

posible interacción con el grupo hidroxilo, que estaría en posición  $\beta$ , y el metilo diecisiete.

Por otro lado, el compuesto mayoritario presentaba una gran polaridad, haciendo que su elucidación estructural fuese confusa debido a que difícilmente se disolvía en metanol. Por este motivo fue necesario acetilar el compuesto **44** para mejorar su solubilidad luego de esta reacción. Una vez realizada la acetilación el producto fue purificado y se verificó que fuese soluble en solventes como diclorometano o cloroformo, para registrar espectros de RMN. Finalmente se realizó espectroscopía  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -RMN, disolviendo la muestra en cloroformo deuterado.

El espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **44** acetilado mostró la presencia de un grupo acetato en  $\delta = 2,06$  ppm (s, 3H), y de un hidrógeno geminal a este grupo, en  $\delta = 5,09$  ppm (dd,  $J = 3,0$  Hz, 11,4 Hz), ambos ubicados el carbono-14. También se observaron dos hidrógenos en  $\delta = 2,82$  ppm (d,  $J = 4,4$  Hz, 1H) y 3,20 ppm (dd,  $J = 4,4$  Hz, 8,0 Hz, 1H), los cuales corresponden al carbono-12 y carbono-11, respectivamente, los que, de acuerdo a su desplazamiento y multiplicidad, estarían formando un anillo de epóxido. Esta información se verificó con el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  donde se observó que el compuesto está constituido por veintidós carbonos, donde dos de ellos corresponden al grupo acetato, y sólo dos señales entre  $\delta$  60 y 80 ppm, que corresponden a los carbonos unidos al grupo acetato e hidroxilo. En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto **44** acetilado se observaron las señales del carbono carbonílico del grupo acetato en  $\delta = 170,3$  ppm (s), del carbono-14 en  $\delta = 73,35$  ppm (d), del carbono-13, unido al hidroxilo no acetilado, en  $\delta = 69,90$  (s) y dos señales en  $\delta = 58,41$  ppm

(d) y 59,16 ppm (d), las que corresponderían al carbono-11 y carbono-12, que forman parte del epóxido.

La estereoquímica de los carbonos del anillo de cicloheptano se determinaron a través de espectroscopía RMN NOESY, donde se observó que el hidrógeno del carbono-14 ( $\delta = 5,09$  ppm) muestra interacción espacial con el metilo diecisiete, con el metilo dieciséis y con el hidrógeno del carbono-12 (ver Figura 22).

El metilo diecisiete está descrito para todos los diterpenos aislados desde las especies de la tribu *Mulinae*, en orientación  $\beta$ , por lo que se determinó que el hidrógeno del carbono-14, y todos los grupos con los que está acoplado, presentan la misma orientación. Se confirmó esta información observando el hidrógeno del carbono-11, el cual está acoplado con el metilo diecisiete y con los hidrógenos del carbono-12 y carbono-9 (ver Figura 52).

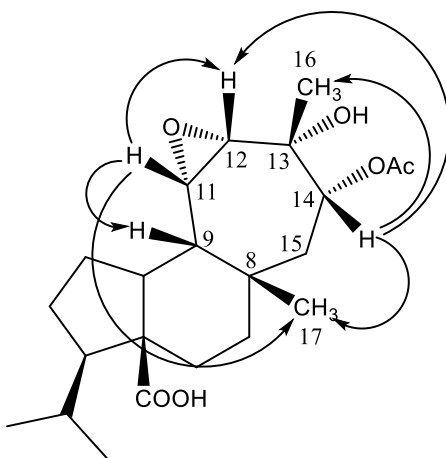
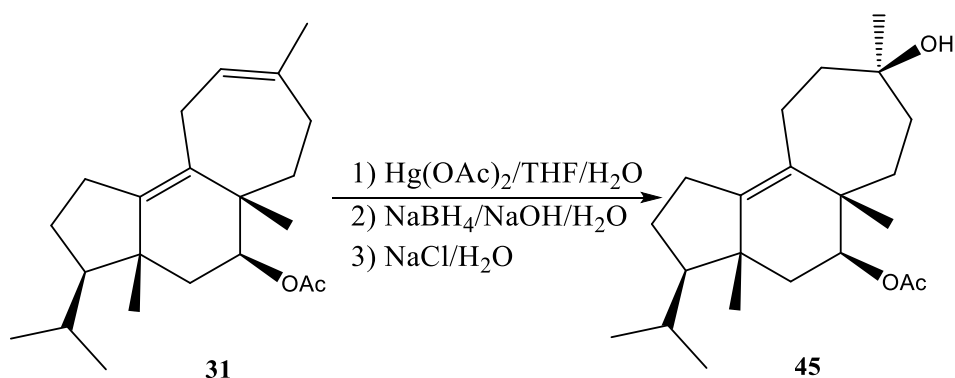


Figura 52: Interacciones NOESY del compuesto **44** acetilado.

### 6.3.5 Otras reacciones

Se llevó a cabo una reacción de oxidación sobre un diterpeno semisintético que presentaba en su estructura dos enlaces dobles (compuesto **31**), con el objetivo de obtener un alcohol mediante el método de la oximercuración con  $\text{Hg}(\text{OAc})_2$  (ver Esquema 8).

#### ESQUEMA 8. Oxidación del compuesto **31** utilizando $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ .



Se obtuvo una mezcla de productos que fueron separados mediante HPLC preparativa, aislando el producto de mayoritario, con un 60% de rendimiento (compuesto **45**).

Se determinó, mediante espectroscopía de RMN  $^{13}\text{C}$ , que el producto **45** presentaba un enlace doble con las señales desplazadas en  $\delta = 132,62$  ppm (s) y  $144,28$  ppm (s), correspondientes al carbono-10 y carbono-9, respectivamente. Además se observó un carbono unido a un grupo hidroxilo en  $\delta = 70,97$  ppm (s), asignado como el carbono-13. Otras señales

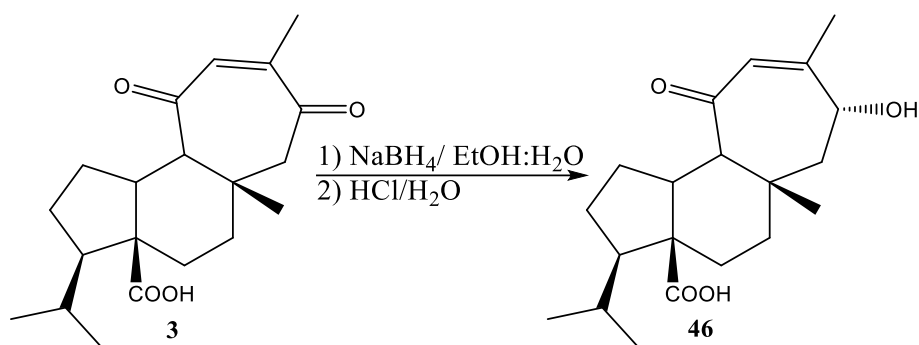
que se observaron fueron en  $\delta = 170,84$  ppm (s) y  $72,50$  ppm (d), que corresponden al carbono carbonílico del grupo acetato y al carbono-7, unidos a este grupo.

Por otro lado, en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  se observó la señal del hidrógeno del carbono-7, geminal al grupo acetato, en  $\delta = 4,79$  ppm (dd,  $J = 6,3$  y  $11,5$  Hz), y la señal del hidrógeno con orientación  $\alpha$  del carbono-6, en  $\delta = 2,25$  ppm (dd,  $J = 6,3$  y  $13,6$  Hz).

Para determinar la estereoquímica del carbono-13 del compuesto **45** se realizó espectroscopía NOESY, donde no se observaron interacciones con el metilo diecisiete que tiene orientación  $\beta$ , sólo se observaron interacciones entre dicho metilo y otros hidrógenos de la estructura, que tampoco están acoplados con sustituyentes en orientación  $\alpha$ . Con esta información no se puede confirmar la orientación de los sustituyentes, ya que el NOESY, por sí sólo, no es resolutivo. Sin embargo, utilizando los datos obtenidos, sumados al mecanismo de reacción es posible determinar la orientación del metilo dieciséis, el cual está orientado en posición  $\alpha$ .

Posteriormente se realizó la reducción del compuesto **3** con  $\text{NaBH}_4$ , el cual presenta dos cetonas. El objetivo fue obtener la reducción de las cetonas que se encuentran en el anillo de cicloheptano, para dar paso a dos alcoholes. Se formó un producto mayoritario que se separó mediante HPLC preparativa, obteniéndose un 81% de rendimiento en la reacción (ver Esquema 9).

### ESQUEMA 9. Reducción del compuesto 3 utilizando NaBH<sub>4</sub>.



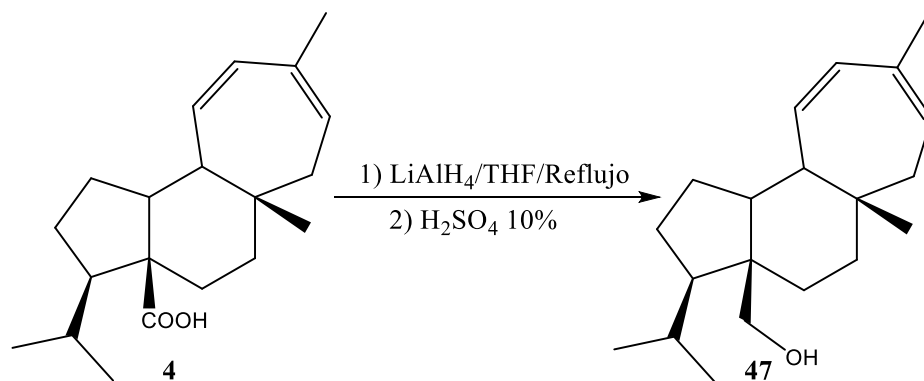
El compuesto **46** se determinó mediante espectroscopía <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C-RMN, donde en este último se observaron señales en  $\delta = 204,09$  (s), 153,7 (s) y 127,78 ppm (d), que corresponden al carbono carbonílico de la cetona, y al carbono-13 y carbono-12, respectivamente, que forman parte del enlace doble. También se observó la señal del carbono-14, unido al grupo hidroxilo, en  $\delta = 71,76$  ppm (d). Con estos datos se infiere que solo una cetona fue reducida a alcohol, dejando a la segunda cetona intacta.

En el espectro de RMN <sup>1</sup>H se observaron las señales correspondientes al hidrógeno del carbono-12, en  $\delta = 5,79$  ppm (s, 1H), y al hidrógeno del carbono-14, geminal al grupo hidroxilo, en  $\delta = 4,49$  ppm (dd,  $J = 2,5$  y 7,5 Hz, 1H). Con estos datos se confirmó que el carbonilo que sufrió la reducción fue el que estaba ubicado en el carbono-14, ya que si hubiese reaccionado el carbonilo del carbono-12 la señal del hidrógeno vinílico se observaría como un doblete, y además se podrían observar las señales de los hidrógenos del carbono-15, que se ubicaría adyacente a la cetona, como dos dobletes desplazados a campo bajo.

La estereoquímica del carbono-14 del compuesto **46** se determinó comparando los espectros de RMN  $^1\text{H}$  experimental y simulado, con las estructuras con el grupo hidroxilo orientado en  $\alpha$  y  $\beta$ .

Para el grupo hidroxilo orientado en  $\beta$ , la señal del hidrógeno del carbono-14 se observó desplazada a campo bajo con una constante de acoplamiento pequeña ( $\delta_{\text{H-14}} = 5,05$  ppm dd,  $J = 2,5$  y  $3,5$  Hz calculado), a diferencia de la estructura con el grupo hidroxilo orientado en  $\alpha$ , donde la señal del hidrógeno del carbono-14 se observó a un desplazamiento similar al registrado en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  experimental ( $\delta_{\text{H-14}} = 4,25$  ppm dd,  $J = 1,7$  y  $9,9$  Hz calculado/ $4,49$  ppm dd  $J = 2,5$  y  $7,5$  Hz experimental).

#### ESQUEMA 10. Reducción del compuesto **4** utilizando $\text{LiAlH}_4$ .



Se realizó una reacción con el compuesto (**4**) y  $\text{LiAlH}_4$  con el objetivo de reducir el ácido carboxílico a alcohol. Para la neutralización de la reacción se utilizó  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 10% disponiendo el balón en agua-hielo para disminuir la temperatura de la solución y evitar la posible deshidratación. Se obtuvo un compuesto sólido incoloro con un 55% de rendimiento (ver Esquema 10).

El compuesto **47** se determinó mediante espectroscopía RMN  $^1\text{H}$  donde se observan las señales en  $\delta = 3,57$  (d,  $J = 11,5$ , 1H) y  $\delta = 3,80$  (d,  $J = 11,5$ , 1H), que corresponden a los átomos de hidrógeno situados en el carbono-20, unidos al grupo hidroxilo formado en la reacción.

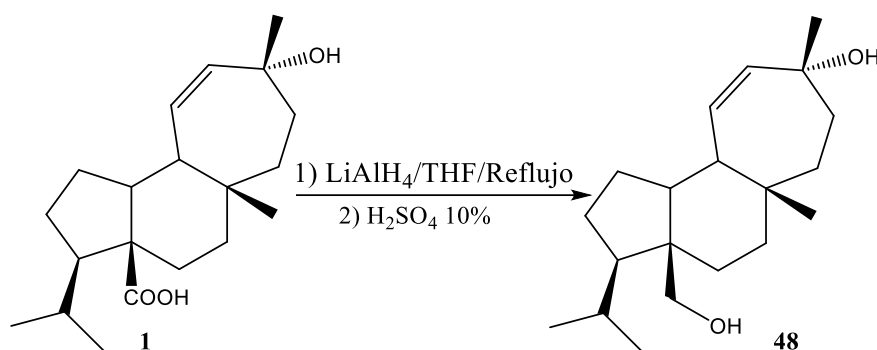
La reacción anteriormente descrita se repitió utilizando ácido mulinólico (**1**) como compuesto de partida. En primer lugar la reacción se detuvo y neutralizó usando  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 10%, lo que provocó la eliminación por deshidratación del grupo hidroxilo terciario ubicado sobre el carbono-13, obteniéndose el producto **47**, como compuesto mayoritario. A pesar de disminuir la temperatura de la reacción, disponiendo el balón sobre agua-hielo, la reactividad del alcohol terciario, debido a la estabilidad del carbocatión formado, facilitó la eliminación del grupo OH en forma de agua.

Debido a lo anterior se tomó un camino alternativo para finalizar la reacción utilizando tartrato de sodio, el cual neutraliza el hidruro restante de la reacción permitiendo la dilución del producto formado para extraerlo con solventes orgánicos (ver Esquema 11).

El rendimiento de la reacción fue de un 46% obteniéndose un sólido incoloro.

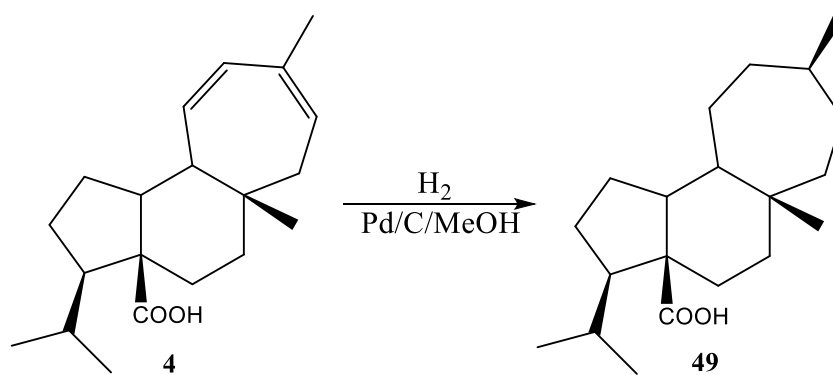


### ESQUEMA 11. Reducción del compuesto 1 utilizando LiAlH<sub>4</sub>.



La estructura del compuesto **48** se determinó por las señales observadas en el espectro de RMN <sup>1</sup>H que demuestran la presencia del grupo hidroxilo a través de las señales en  $\delta = 3,51$  (d,  $J = 11,6$ , 1H) y  $\delta = 3,73$  (d,  $J = 11,6$ , 1H) correspondientes a los átomos de hidrógenos del carbono 20, el cual se redujo pasando de un ácido carboxílico a un alcohol. Se mantienen las señales de los hidrógenos que indican la presencia del doble enlace en  $\delta = 5,40$  (dd,  $J = 8,4$  y  $12,3$ , 1H,) y  $\delta = 5,53$  (d,  $J = 12,3$ , 1H), además de las señales de los hidrógenos del metilo dieciséis, geminal al grupo OH, en  $\delta = 1,28$  (s, 3H).

### ESQUEMA 12. Hidrogenación del compuesto 4 utilizando H<sub>2</sub>.



La estructura del compuesto **49** se determinó por medio de espectroscopía  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -RMN donde se observó la ausencia de las señales de los hidrógenos olefínicos y las señales correspondientes a los carbonos que forman los dos dobles enlaces.

La orientación del metilo del carbono-16 se determinó mediante espectroscopía NOESY donde se observaron señales que dan cuenta de la interacción de los hidrógenos del carbono-16 con los correspondientes al carbono-17, además de señales menos intensas que indican interacción con los hidrógenos de los carbonos 18 y 19 (ver Figura 53). Esta orientación en  $\beta$  del carbono-16 se puede explicar mediante el mecanismo de reacción de la hidrogenación catalítica, ya que la molécula interactúa con los hidrógenos unidos al catalizador por su lado menos impedido, orientando a los sustituyentes hacia el lado contrario.

El compuesto **49** se separó como producto mayoritario de la reacción. Sin embargo, en el crudo de la reacción se observó un compuesto secundario minoritario que posiblemente corresponda al epímero del compuesto **49**, es decir, a la estructura con la orientación del carbono-16 en posición  $\alpha$ .

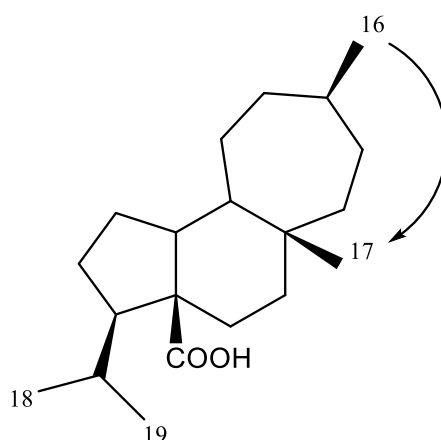


Figura 53: Estructura y numeración del compuesto **49**.

#### 6.4 Formación de micelas

Para realizar los ensayos biológicos, los diterpenos se deben disolver en soluciones acuosas ayudados de solventes como DMSO. Sin embargo, esto no es suficiente para solubilizar por completo el compuesto en agua, por lo que la concentración real de la solución se ve alterada, debido a que parte del producto se mantiene en suspensión. Es por este motivo que es necesario aumentar la hidrofilia de los diterpenos para que se puedan solubilizar en soluciones acuosas. Una de las opciones propuestas fue la formación de micelas, utilizando un polímero conocido como Pluronic F-127.

En primer lugar, se probaron tres diterpenos para determinar si era posible su completa solubilización en agua, mediante el encapsulamiento con el polímero. Los diterpenos usados fueron: ácido mulinólico (**1**), azorellanol (**2**) y ácido mulin-11,13-dien-20-oico (**4**).

El ácido mulinólico (**1**) y el azorellanol (**2**) presentaron un precipitado blanco una vez finalizado el proceso de encapsulamiento. Por este motivo se solubilizó nuevamente los compuestos en DCM y se agregó 15 mL más de la solución del polímero para disolver los compuestos.

La formación de estos precipitados se produjo debido a la cantidad de compuesto que se utilizó, en relación a la concentración de micelas que agregaron a la solución, y al tamaño y rigidez que presentan los diterpenos a causa de los tres anillos de su estructura.

## 6.5 Ensayos biológicos

La actividad antibacterial de los diterpenos de *Azorella compacta* se determinó *in vitro* mediante el método de difusión en discos de papel y cultivo en caldo. Los organismos testeados fueron: *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium smegmatis* y *Escherichia coli*. Las bacterias fueron inoculadas en el caldo Mueller Hinton e incubadas a 37°C durante 24 horas.

### 6.5.1 Resultados de ensayos en caldo MH

El primer ensayo en caldo que se realizó se hizo con el objetivo de determinar un rango de concentración para los ensayos antibacterianos posteriores y para verificar que el uso de Pluronic no afectara negativamente en los resultados. Esto se probó disolviendo el control positivo en la solución acuosa del polímero, que en este caso fue Penicilina.

En esta oportunidad sólo se trabajó con *Staphylococcus aureus* como microorganismo de prueba.

Tabla 6: Resultados ensayos compuestos **2**, **16** y Penicilina en Pluronic.

Concentración	Compuesto 2	Compuesto 16	Penicilina
	<i>Staphylococcus aureus</i>		
<b>5,0 x 10<sup>-5</sup> M</b>	-	-	+
<b>2,5 x 10<sup>-5</sup> M</b>	-	-	+
<b>1,25 x 10<sup>-5</sup> M</b>	-	-	+
<b>6,0 x 10<sup>-6</sup> M</b>	-	-	+
<b>3,0 x 10<sup>-6</sup> M</b>	-	-	+
<b>1,5 x 10<sup>-6</sup> M</b>	-	-	+
<b>7,5 x 10<sup>-7</sup> M</b>	-	-	+
<b>3,8 x 10<sup>-7</sup> M</b>	-	-	+
<b>1,9 x 10<sup>-7</sup> M</b>	-	-	-
<b>1,0 x 10<sup>-8</sup> M</b>	-	-	-

(-): no se observa inhibición de crecimiento bacteriano.

(+): se observa inhibición del crecimiento bacteriano.

Los resultados se obtuvieron mediante la comparación visual de los medios de cultivo inoculados con bacterias, y con los compuestos de interés disueltos en Pluronic F-127, contra el estándar 0,5 Mcfarland (ver Tabla 6). Se determinó en este primer ensayo que los diterpenos azorellanol (**2**) y 7-desacetil-azorellanol (**16**) no presentan actividad biológica a las concentraciones testeadas ya que no se observó inhibición del crecimiento bacteriano. Sin embargo, la penicilina arrojó resultados positivos inhibiendo el crecimiento bacteriano a una concentración mínima (MIC) de  $3,8 \times 10^{-7}$  M (dilución de [1:100]  $\mu\text{g/mL}$ ). Sobre esta concentración, la bacteria no creció por lo que la solución se mantuvo con una turbidez similar al estándar Mcfarland.

Con estos resultados se concluyó que la disolución de los compuestos en Pluronic F-127 es efectiva por lo que no interfiere en el crecimiento bacteriano dentro de los medios de cultivo y no inhibe la capacidad antimicrobiana de compuestos activos conocidos como la penicilina, ya que esta presentó una actividad a muy baja concentración, como era de esperarse.

### 6.5.2 Resultados de los ensayos de difusión de disco

En una primera instancia este ensayo se realizó solo con los diterpenos 7-acetoxi-mulin-9,12-dieno (**31**) y ácido 11,12-dioxo-13- $\alpha$ -hidroximulin-20-oico (**36**) para conocer la concentración final de los discos a la cual se iba a trabajar la totalidad de los compuestos, esto con el fin de ocupar las muestras de forma eficiente. La concentración final de los discos usados fue de 100  $\mu\text{g}$ .

Tabla 7: Resultados ensayos de difusión de disco.

<b>Compuesto</b>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>M. smegmatis</i>
<b>31</b>	-	-	-
<b>36</b>	-	-	-
<b>Ampicilina</b>	29,33 $\pm$ 1,15	26,67 $\pm$ 1,53	18,67 $\pm$ 1,15

(-): no se observa halo de inhibición.

Los resultados observados en la Tabla 7 demostraron que los diterpenos no son activos contra las bacterias testeadas a la concentración final determinada. Por lo tanto se repitieron los ensayos aumentando la concentración de los discos a 500  $\mu\text{g}$ .

Tabla 8: Resultados usando 500 µg de los compuestos **31** y **36** (mm).

<b>Compuesto</b>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>M. smegmatis</i>
<b>31</b>	6,13 ± 0,06	9,13 ± 0,32	-
<b>36</b>	8,27 ± 0,64	7,0 ± 0	6,70 ± 0,17
<b>Ampicilina</b>	29,33 ± 1,15	26,67 ± 1,53	18,67 ± 1,15

(-): no se observa halo de inhibición.

Los resultados obtenidos para el ensayo de difusión de disco con los compuestos **31** y **36** utilizando 500 µg ( $1,5 \times 10^{-6}$  moles) de cada uno impregnados en los discos de papel se observan en la Tabla 8. Se logró determinar que los diterpenos son levemente activos contra los microorganismos testeados, salvo en el caso del compuesto **31** que no inhibió el crecimiento bacteriano de *Mycobacterium smegmatis*, a la concentración determinada. Con estos resultados se dio paso a la siguiente etapa que comprendió la prueba de todos los compuestos contras las tres bacterias de interés utilizando una concentración de  $1,5 \times 10^{-6}$  moles, por disco, los resultados se pueden observar en la Tabla 9.

Tabla 9: Resultados antibacterianos difusión de disco.

<b>Compuesto</b>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>M. smegmatis</i>
<b>1</b>	-	-	-
<b>2</b>	-	-	-
<b>3</b>	8,13 ± 0,12 <sup>a</sup>	9,0 ± 0*	-
<b>4</b>	-	-	-
<b>5</b>	-	-	-
<b>6</b>	-	-	-

<b>7</b>	-	-	-
<b>16</b>	-	-	9,13 ± 0,12 <sup>a</sup>
<b>27</b>	6,13 ± 0,11 <sup>b</sup>	-	7,33 ± 0,29 <sup>*,b</sup>
<b>28</b>	-	-	-
<b>29</b>	10,90 ± 0,17	9,93 ± 0,12 <sup>*</sup>	-
<b>30b</b>	-	-	-
<b>31</b>	6,13 ± 0,06 <sup>b,c</sup>	9,13 ± 0,32 <sup>a</sup>	-
<b>32</b>	7,63 ± 0,12 <sup>d</sup>	-	7,80 ± 0,17 <sup>*,c</sup>
<b>33</b>	-	-	8,57 ± 0,12 <sup>d</sup>
<b>34</b>	8,33 ± 0,41 <sup>a,e</sup>	9,2 ± 0,3 <sup>*,a</sup>	7,17 ± 0,29 <sup>*,b</sup>
<b>35</b>	6,73 ± 0,25 <sup>e</sup>	-	-
<b>36</b>	8,27 ± 0,64	7,0 ± 0 <sup>b</sup>	6,70 ± 0,17 <sup>e</sup>
<b>38</b>	-	-	-
<b>39</b>	-	-	7,03 ± 0,15 <sup>*,b</sup>
<b>40</b>	6,73 ± 0,25 <sup>b,c,e</sup>	-	-
<b>41</b>	-	-	-
<b>42</b>	7,30 ± 0,17 <sup>d,f</sup>	-	8,33 ± 0,29 <sup>*,c,d</sup>
<b>43</b>	7,57 ± 0,12 <sup>f</sup>	-	-
<b>44</b>	-	-	-
<b>45</b>	9,50 ± 0,30 <sup>e</sup>	6,97 ± 0,06 <sup>b</sup>	9,13 ± 0,12 <sup>a</sup>
<b>46</b>	-	-	-
<b>47</b>	-	-	6,87 ± 0,15 <sup>*,b,e</sup>
<b>48</b>	-	-	-
<b>Ampicilina</b>	33,33 ± 1,15	27,33 ± 2,08	18,67 ± 2,08

(-): no se observa halo de inhibición.

(\*): se observa velo de inhibición (swarming).

(a-f): indican que no hay significancia entre valores obtenidos.



#### a) Resultados de inhibición de crecimiento

En la tabla 9 se observan los resultados de los ensayos antibacterianos de los diterpenos naturales y semisintéticos de *Azorella compacta*.

Para determinar la actividad inhibitoria de crecimiento de los diterpenos se estimó que los valores sobre 8,0 mm se interpretarían como activos, considerando 2 mm de inhibición con respecto al diámetro del disco de papel (6mm).

Bajo este fundamento los compuestos más activos contra *Staphylococcus aureus* fueron el ácido mulin-12-en-11,14-diona-20-oico (**3**), ácido 16-normulin-11-en-13-ona-20-oico (**29**), ácido 12-oxo-11,13- $\alpha,\alpha$ -dihidroximulin-20-oico (**34**) (ver Figura 54) y 7-acetoxi-13-hidroximulin-9-eno (**45**). Mientras que para *Escherichia coli*, los diterpenos más activos fueron el ácido mulin-12-en-11,14-diona-20-oico (**3**), ácido 16-normulin-11-en-13-ona-20-oico (**29**), ácido 12-oxo-11,13- $\alpha,\alpha$ -dihidroximulin-20-oico (**34**), los tres con un halo de inhibición con características de velo o “swarming”, como se observa en la Figura 55. Este tipo de crecimiento describe un cambio en la movilidad bacteriana, por lo que se infiere que el compuesto tiene un efecto sobre la microorganismo, sin embargo, este se adapta y continua el crecimiento y desplazamiento, pero disminuyendo su velocidad y concentración.



Figura 54: Halo de inhibición (*S. aureus*) del compuesto **34**.

Por otro lado los compuestos activos contra *Mycobacterium smegmatis* fueron 7-desacetil-azorellanol (**16**), Mulin-9,12-dien-7-ona (**33**), metil éster del ácido 12-oxo-11,13- $\alpha$ -dihidroximulin-20-oico (**42**) y 7-acetoxi-13-hidroximulin-9-eno (**45**). Para el compuesto **42** se observó un velo de inhibición por lo que se consideró que no inhibe el crecimiento bacteriano. Con esta información podemos determinar que las bacterias son sensibles a los compuestos probados y que estos presentan un efecto bacteriostático sobre ellas.

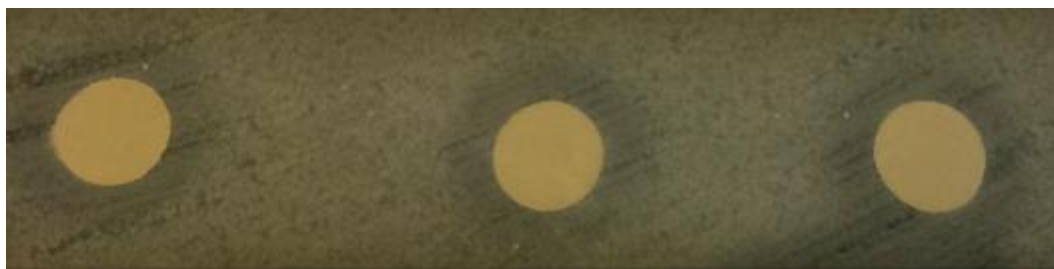


Figura 55: Velo de inhibición (*E. coli*) del compuesto **34**.

Mediante análisis estadístico de Mann-Whitney se calculó si los valores de halos de inhibición obtenidos por los compuestos son significativos con respecto a la ampicilina. En el caso de las tres bacterias probadas se obtuvieron valores de P entre 0,034 y 0,043 (*S. aureus*), 0,037 y 0,047 (*E. coli*) y 0,043 y 0,046 (*M. smegmatis*), lo que indica que las diferencias si son significativas. Sin embargo, los halos de inhibición obtenidos por los compuestos presentan un diámetro mucho menor con respecto al antibiótico (ver Figura 56). Por lo tanto, se infiere que los diterpenos no presentan una actividad biológica considerable, comparable con el control positivo, incluso realizándose los ensayos con una mayor concentración de diterpeno.

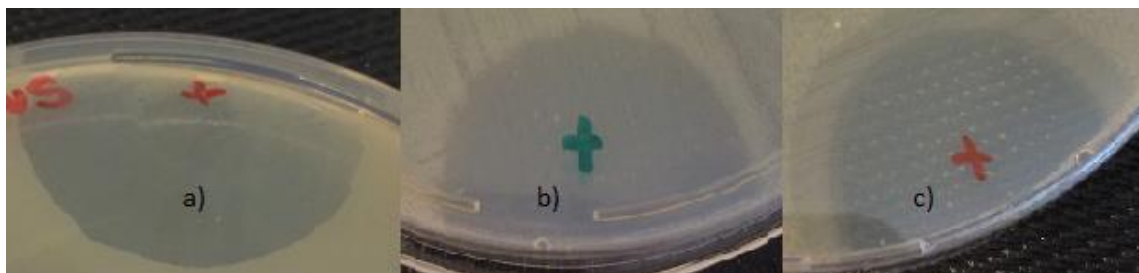


Figura 56: Halo inhibición ampilicina para a) *S. aureus*, b) *E. coli* y c) *M. smegmatis*.

Por otro lado en la Tabla 9 se logra observar que los diterpenos presentaron una mejor actividad contra *Staphylococcus aureus* y *Mycobacterium smegmatis*, a diferencia de *Escherichia coli*, lo que se explica por la diferencia entre las conformaciones de la pared celular de estos microorganismos. Tanto *S. aureus* y *M. smegmatis* son bacterias Gram-positivas, mientras que, *E. coli* es Gram-negativa, es decir, que su pared celular presentan una doble membrana que les permite protegerse de los agentes externos, además una de estas membranas contiene una alta cantidad de enzimas y embudos de proyección o poros que expulsan sustancias que hayan podido ingresar.

#### b) Aumento de actividad biológica por modificación estructural

En la Tabla 9 se observa que sólo tres, de los nueve diterpenos de origen natural, presentan inhibición del crecimiento bacteriano. Sin embargo, la lista muestra otros diterpenos semisintéticos que si presentan resultados positivos, este es el caso de los compuestos **16**, **32**, **33** y **45** que son derivados del compuesto azorellanol (**2**), el cual no demuestra inhibir el crecimiento bacteriano. Lo mismo ocurre con los compuestos **34**, **35**, **39**,

**42**, **43** y **47** que derivan de los diterpenos naturales ácido mulinólico (**1**), ácido mulin-11,13-dien-20-oico (**4**) y ácido epimulinólico (**28**), los que tampoco presentan actividad antibacteriana.

Sin embargo, no todas las modificaciones están relacionadas con un aumento de la actividad biológica, como es el caso del compuesto **28**, que al metilar su ácido carboxílico se mantiene sin efecto sobre las bacterias testeadas. Lo mismo ocurre con el compuesto **40**, que si bien inhibe el crecimiento bacteriano, los resultados no son mejores que su predecesor natural, el ácido 16-normulin-11-en-13-ona-20-oico (**29**).

Por otro lado, las distintas modificaciones en una misma estructura no significaron una mejora en la actividad biológica de los diterpenos, y en base a estos resultados se podría inferir cual es la zona activa del compuesto o la que jugaría un papel importante dentro del mecanismo de acción antimicrobiano.

En el caso de los compuestos **1** y **34** se realizaron cambios en la zona del ácido carboxílico obteniéndose los compuestos **38** y **42**, respectivamente, los cuales mantuvieron su nula inhibición en el crecimiento de los microorganismos, o disminuyeron notoriamente la actividad, como es el caso del diterpeno **42**. Mientras que al modificarse la zona del enlace doble del compuesto **1**, la actividad aumento significativamente, por lo que se concluye que esta zona sería importante en el mecanismo de acción.

Del mismo modo, al abrir el ciclopropano ubicado en el ciclo de siete de carbonos del azorellanol (**2**), obteniéndose el compuesto **31**, no se generó aumento en la actividad biológica. Sin embargo, al modificar la zona del

grupo acetato presente en el carbono-7 de ambos diterpenos, se logró inhibir el crecimiento de *S. aureus* y *M. smegmatis*, por lo que esta zona se consideraría como activa dentro las estructuras de los compuestos **16**, **32** y **33**.

Mediante el análisis estadístico de Wilcoxon se calculó si la variación en la estructura genera un aumento significativo en el halo de inhibición. En este caso se determinó que los valores obtenidos por los compuestos semisintéticos no son significativos con respecto a los valores de los compuestos de partida **1**, **2**, **4**, **28** y **29**, obteniéndose valores de P entre 0,083 y 0,109, los que están por encima del límite de error P = 0,050.

### 6.5.3 Resultados de ensayos MIC en difusión de disco

Se realizó una prueba de difusión de disco con el diterpeno **45**, el cual es uno de los compuestos más activos descritos anteriormente, para determinar cuál sería la concentración inhibitoria mínima de este, y así conocer el rango de concentración aproximado en el cual los diterpenos naturales y semisintéticos de *A. compacta* tendrían actividad biológica.

Tabla 10: Resultados MIC del compuesto **45**.

Compuesto	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>M. smegmatis</i>
<b>45</b>	100 µg	200 µg	200 µg

- 100 µg =  $3,0 \times 10^{-7}$  moles; 200 µg =  $6,0 \times 10^{-7}$  moles.

Los resultados observados en la Tabla 10 muestran que el rango de concentración a la cual los diterpenos más activos de *Azorella compacta* tendrían la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano sería entre 100 y

200  $\mu\text{g}$ , para los microorganismos probados. En la Figura 57 se puede observar el método utilizado para este ensayo (6 = 0  $\mu\text{g}$ , 1 = 400  $\mu\text{g}$ ;  $1,2 \times 10^{-6}$  moles).



Figura 57: Ensayo MIC difusión de disco con *S. aureus*.

#### 6.5.4 Resultados de ensayos DMSO vs Pluronic (caldo y disco)

Para los ensayos de solubilidad se utilizaron tres de los compuestos con mayor actividad biológica según los resultados anteriormente expuestos, y fueron probados contra *S. aureus*. Los diterpenos son: Ácido mulin-12-en-11,14-diona-20-oico (**3**), ácido 16-normulin-11-en-13-ona-20-oico (**29**) y 7-acetoxi-13-hidroximulin-9-eno (**45**).

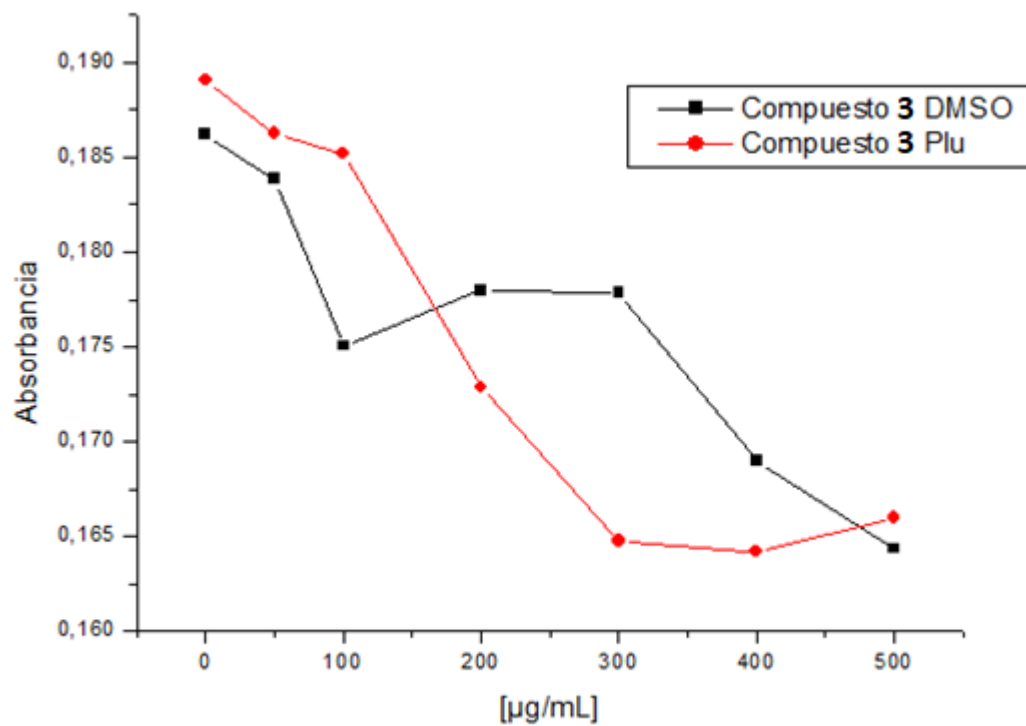


Figura 58: Gráfico Absorbancia vs concentración compuesto 3.

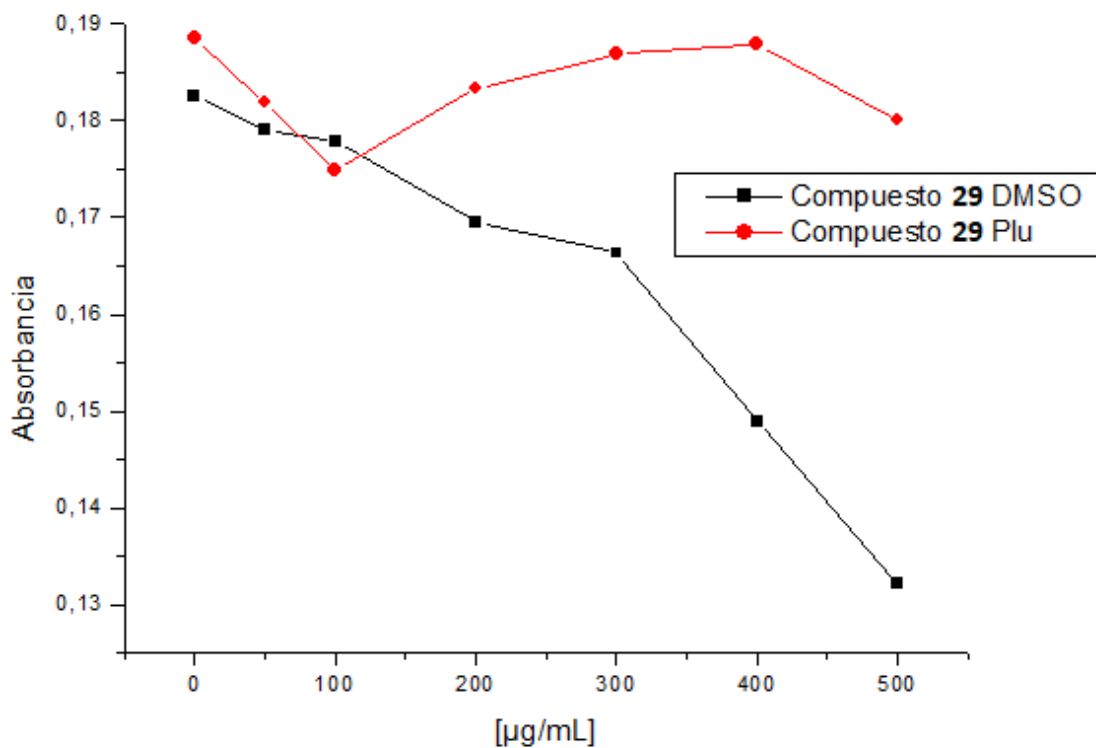


Figura 59: Gráfico Absorbancia vs concentración compuesto 29.

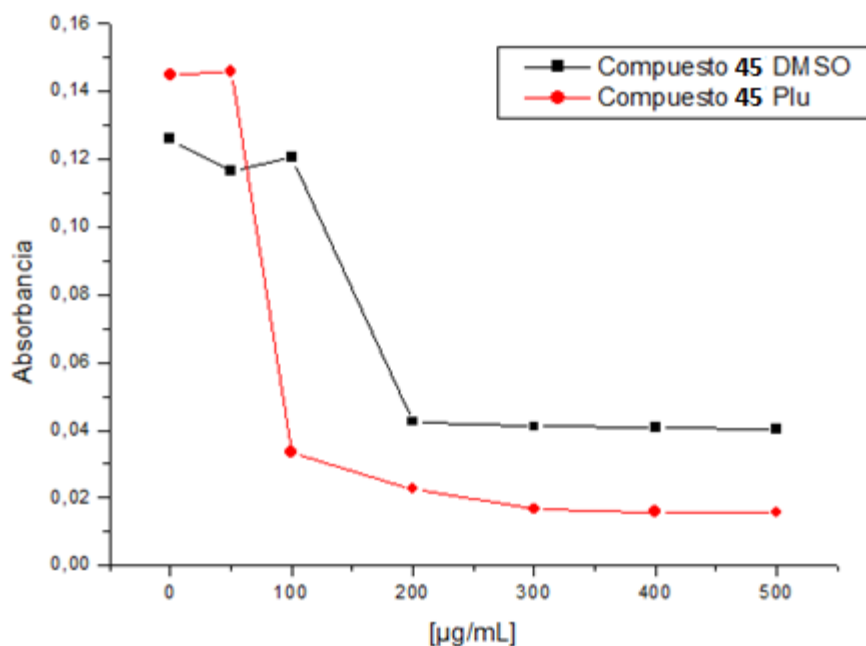


Figura 60: Gráfico Absorbancia vs concentración compuesto **45**.

Se determinó la absorbancia de los cultivos para determinar el crecimiento bacteriano en cada tubo con distinta concentración. Esta medición se realizó en simultáneo para todos los compuestos y concentraciones utilizando placas de microtitulación de 96 pocillos. La absorbancia de cada muestra se comparó con la de una solución estándar de cultivo bacteriano sin antibiótico.

Los resultados obtenidos en estos ensayos demostraron que es posible la dilución de los compuestos en solución acuosa de DMSO y Pluronic F-127, sin embargo, esto no asegura que la actividad biológica del compuesto aumente con respecto a su solubilidad. En el caso del compuesto **3** en solución de Pluronic, este muestra un aumento en la inhibición del



crecimiento bacteriano entre los 100 y 400  $\mu\text{g}$ , mejor que la solución del mismo diterpeno en DMSO, pero considerando bajas concentraciones, la actividad en ambos es similar (ver Figura 58).

Por otro lado, como se observa en la Figura 59, el compuesto **29** en solución de DMSO tiene una tendencia a disminuir el crecimiento bacteriano en concentraciones sobre 300  $\mu\text{g}$ , a diferencia de la solución acuosa de Pluronic donde no se observan mayores cambios en los valores de absorbancia, infiriendo que el crecimiento bacteriano es similar en todos los cultivos.

El mejor resultado obtenido fue con el compuesto **45**, como muestra la Figura 60, la actividad antibacteriana del compuesto disuelto en Pluronic aumenta significativamente luego a una concentración del 100  $\mu\text{g}$ , mejorando con respecto a la dilución en DMSO. Sin embargo, la actividad a mayores concentraciones (sobre 200  $\mu\text{g}$ ) se mantiene constante en ambos casos.

Estos resultados se complementan con los obtenidos en los ensayos de difusión de disco, donde se probaron los mismos compuestos impregnando los discos de papel utilizando DCM y Pluronic F-127. Los resultados se observan en la Tabla 11, donde se muestra que el compuesto **45** tiene un mayor aumento en la actividad antibacteriana con respecto a sus pares **3** y **29**, donde el halo de inhibición aumenta su diámetro, pero en un valor mucho menor.

Utilizando el método de análisis estadístico de Wilcoxon se calculó si la variación en los datos obtenidos en la prueba que contrasta la solubilidad de

los diterpenos en DCM versus Pluronic son significativos. Para los tres compuestos probados (**3**, **29** y **45**) se determinó que la diferencia de los valores no es significativa obteniéndose valores de P de 0,109, 0,102 y 0,083, respectivamente. Por lo que no hay una relación entre el aumento de la hidrofilia con la actividad biológica de los diterpenos.

Tabla 11: Ensayo solubilidad DCM vs Pluronic en difusión de disco.

<b>Compuesto [1,5 x 10<sup>-6</sup> moles]</b>	<b>DCM</b>	<b>Pluronic f-127</b>
<b>3</b>	8,07 ± 0,12	8,87 ± 0,15
<b>29</b>	10,67 ± 0,15	11,40 ± 0,17
<b>45</b>	9,40 ± 0,17	11,45 ± 0,23

Si bien el uso de Pluronic F-127 ayudó a solubilizar los diterpenos en soluciones acuosas, hubo compuestos a los que se le debió agregar una mayor cantidad de solvente para obtener una dilución óptima, lo que interfiere en los resultados de solubilidad de diterpenos.

Posiblemente las estructuras de los diterpenos son muy voluminosas para el tamaño de las micelas formadas, lo que dificultó la solubilidad con bajas cantidades de Pluronic. Por otro lado, se deben considerar las interacciones de los grupos funcionales de los diterpenos con la estructura del polímero utilizado, ya que esto influye en el traspaso o contacto del diterpeno con la pared celular de las bacterias, ya que, si la interacción del polímero con el diterpeno, o del polímero en forma micelar, es mayor, el compuesto quedaría retenido en la solución.

Los resultados obtenidos en el trabajo realizado para esta tesis se pueden resumir en los siguientes puntos:

- a) Se separaron ocho diterpenos mayoritarios de *Azorella compacta* a través de métodos convencionales como las columnas *flash* y recristalizaciones.
- b) Mediante espectroscopía  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -RMN, IR y masa fue posible describir el nuevo norditerpeno aislado desde *Azorella compacta* (compuesto **29**).
- c) A través de reacciones químicas sencillas como deshidrataciones, oxidaciones, reducciones y metilaciones, se obtuvieron veinticinco derivados de diterpenos.
- d) Mediante espectroscopía  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -RMN, IR y espectros simulados a través de programas de predicción de RMN, se logró determinar la estructura de los derivados de diterpenos.
- e) En los ensayos antibacterianos realizados, se determinó que tres diterpenos naturales (**3**, **27** y **29**) presentaron inhibición de crecimiento bacteriano. Sin embargo sólo los compuestos **3** y **29** se consideran activos contra las tres bacterias probadas.
- f) De los ensayos biológicos se observó que once derivados presentaron inhibición de crecimiento bacteriano contra *S. aureus*, *E. coli* y *M. smegmatis*. Sin embargo, sólo seis diterpenos

semisintéticos (**16**, **31**, **33**, **34**, **36** y **45**) presentaron actividad biológica contra las bacterias mencionadas.

- g) Con los ensayos biológicos se logró determinar que la inhibición de crecimiento bacteriano aumenta al realizar transformaciones químicas como es el caso de los compuestos **16**, **31**, **32**, **33** y **45**, que derivan del diterpeno natural azorellanol (**2**). Lo mismo ocurre con los compuestos **34**, **35** y **42**, que derivan del ácido mulinólico (**1**).
- h) Fue posible la disolver los compuestos **3**, **29** y **45** en soluciones acuosas mediante la formación de micelas, con ayuda del polímero Pluronic F-127. Sin embargo, la actividad biológica de los compuestos disueltos en solución acuosa no aumenta de manera considerable.

## **CONCLUSIONES**

Con los resultados expuestos en el resumen de la sección anterior y en relación a las hipótesis planteadas al comienzo de esta tesis, se concluye lo siguiente:

**1. Los diterpenos mayoritarios de *A. compacta* presentan propiedades antibacterianas.**

Con los resultados expuestos en el punto e) se determina que esta hipótesis es parcialmente correcta, ya que sólo dos de los nueve diterpenos naturales presentan actividad biológica contra las bacterias probadas. Además, el diterpeno **29** presentó actividad contra bacterias bucales en ensayos realizados en España (ver Anexo 1).

**2. La actividad biológica de los diterpenos se incrementa al realizar transformaciones químicas.**

Esta hipótesis es parcialmente correcta ya que con los resultados expuestos en los puntos d) y f) se determina que sólo ocho derivados presenta un incremento en la actividad biológica, mientras que en otros casos la actividad es insignificativa o nula.

**3. Mediante el uso de soluciones micelares se incrementa la hidrofilia de los diterpenos, aumentando la actividad biológica.**

Con los resultados expuestos en el punto h) se determina que la hipótesis planteada es incorrecta, ya que la variación de actividad biológica de los compuestos disueltos en solución de Pluronic no aumenta de forma

considerable, además sólo se probaron tres diterpenos debido a la baja actividad que presentan.

## **BIBLIOGRAFÍA**



- [1] MESFIN, K., TEKLE, G. Y TEFAY, T. 2013. Ethnobotanical Study of Traditional Medicinal Plants Used by Indigenous People of Gemad District, Northern Ethiopia. *Medicinal Plants Studies* 1(4): 32-37.
- [2] BELOV, M. 2005. Regiones Vegetales. [en línea] <[http://www.florachilena.cl/Regiones\\_Vegetales/regiones\\_vegetales.htm](http://www.florachilena.cl/Regiones_Vegetales/regiones_vegetales.htm)> [consulta: 10 Junio 2014].
- [3] CASTRI, F. Y HAJEK, E. 1975. Bioclimatografía de Chile. Santiago, Universidad Católica de Chile.
- [4] AMESTO, J., KALIN, M., SQUEO, F. Y VILLAGRAN, C. 1998. Effects of aridity on plant diversity in the northern Chilean Andes: Result of natural experiment. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 75:55-78.
- [5] TRIVELLI, M. 2014. Reseña de la vegetación de Chile, Servicio Agrícola y Ganadero. [en línea] <[http://www.sag.cl/sites/default/files/la\\_flora\\_de\\_chile\\_continental\\_5f\\_junio\\_2014\\_final2.pdf](http://www.sag.cl/sites/default/files/la_flora_de_chile_continental_5f_junio_2014_final2.pdf)> [consultado: 27 Mayo 2016].
- [6] MEYEN, F. 1834. Sobre los últimos avances en la anatomía y fisiología de las plantas. Berlín.
- [7] REICHE, K. 1966. Estudios críticos sobre la flora de Chile. Santiago, Universidad de Chile.
- [8] ARMESTO, J., KALIN, M. Y VILLAGRAN, C. 1981. Vegetation in a high Andean transect between Turi and Cerro León in Northern Chile. *Vegetatio* 48:3-16.

- [9] ARMESTO, J., KALIN, M., MARTICORENA, C. Y VILLAGRAN, C. 1982. Flora y relaciones biogeográficas en Los Andes del norte de Chile (18-19°S). Pág. 72-90.
- [10] QUERELLE. 2013. Flora y fauna zona norte. [en línea] <<http://www.profesorenlinea.cl/Chilegeografia/FloraFaunaNorte.htm>> [consultado: 27 Mayo 2016].
- [11] CASTRO, V. Y VILLAGRÁN, C. 2004. Ciencia indígena de los Andes del norte de Chile. Santiago, Universitaria. 317p.
- [12] VEGA, J. 2012. Flora y vegetación: geisers del Tatio. [en línea] <<http://www.ceachile.cl/humedales/tatio/cartillas/Cartilla%20Flora%20Tatio.pdf>> [consultado: 27 Mayo 2016].
- [13] BIBLIOTECA NACIONAL DE LA UNIVERSIDAD DE CHILE. 1993. Ecosistemas. [en línea] <[http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias\\_veterinarias\\_y\\_pecuarias/simposio1993/03areaecosistema.html/25a.html](http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_veterinarias_y_pecuarias/simposio1993/03areaecosistema.html/25a.html)> [consultado: 25 Mayo 2016].
- [14] CAPRILES, J. Y TRIPCEVICH, N. 2016. The Archaeology of Andean Pastoralism. Estados Unidos, Universidad de México. 99p.
- [15] CALIXTO, J. 2005. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personal view. *Journal Of Ethnopharmacology* 100:131-134.
- [16] UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS. 1999. Umbelliferae (apiaceae). [en línea] <<http://herbarivirtual.uib.es/cas-uv/familia/1948.html>> [consultado: 25 Mayo 2016].

- [17] ASTURNATURA. 2004. Umbelliferae, umbelíferas. [en línea]<<http://www.asturnatura.com/familia/umbelliferae.html>> [consultado: 25 Mayo 2016].
- [18] DIAZ, G. 2010. Plantas tóxicas de importancia en salud y producción animal en Colombia. Bogotá, Universidad Nacional de Colombia. 67p.
- [19] MARTINEZ, S. 1993. Sinopsis del género *Azorella* (*apiaceae*, *hydrocotyloideae*). Darwiniana 32: 171-184.
- [20] MARTINEZ, S. 1989. El género *Azorella* (*apiaceae*, *hydrocotyloideae*) en la Argentina. Darwiniana 29: 139-178.
- [21] BELOV, M. 2005. *Azorella*. [en línea] <[http://www.florachilena.cl/Niv\\_tax/Angiospermas/Ordenes/Apiales/Apiaceae/Azorella/Azorella.htm](http://www.florachilena.cl/Niv_tax/Angiospermas/Ordenes/Apiales/Apiaceae/Azorella/Azorella.htm)> [consultado: 20 Junio 2014].
- [22] MORAGA, J. 2007. Yerbas y curanderos: testimonios del Valle del Huasco. Santiago, La Calabaza del Diablo. 60p.
- [23] CASTRO, V. Y VILLAGRÁN, C. 2004. Ciencia indígena de los Andes del norte de Chile. Santiago, Universitaria. 134p.
- [24] CASTRO, V. Y VILLAGRÁN, C. 2004. Ciencia indígena de los Andes del norte de Chile. Santiago, Universitaria. 135p.
- [25] MELCHER, E. 2004. El norte de Chile: su gente, desiertos y volcanes. Santiago, Universitaria. 104p.
- [26] BELOV, M. 2013. *Azorella compacta*. [en línea] <<http://www.chileflora.com/Florachilena/FloraSpanish/HighResPages/SH2013.htm>> [consultado: 25 Mayo 2016]

- [27] KLEIER, C. Y RUNDEL, P. 2004. Microsite requirements, population structure and growth of the cushion plant *Azorella compacta* in the tropical Chilean Andes. *Austral Ecology* 29:461-470.
- [28] LARIUSHIN, B. 2012. *Apiaceae Family: Volume 2*. Barking, Reino Unido, CreateSpace. 70p.
- [29] GEBHARDT, Y., FORKMANN, G., LUKACIN, R., MARTENS, S., MATERN, U. Y WITTE, S. 2005. Molecular evolution of flavonoids dioxygenases in the family Apiaceae. *Phytochemistry* 66:1273-1284.
- [30] BRANDT, K. Y CHRISTENSEN, L. 2006. Bioactive polyacetylenes in food plants of the Apiaceae family: Occurrence, bioactivity and analysis. *Journal Of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41:683-693.
- [31] CHERNG, J., CHIANG, W. Y CHIANG, L. 2008. Immunomodulatory activities of common vegetables and spices of Umbelliferae and its related coumarins and flavonoids. *Food Chemistry* 106:944-950.
- [32] BUDĚSÍNSKY, M. Y HOLUB, M. 1986. Sesquiterpene lactones of the *Umbelliferae*. *Phytochemistry* 25:2015-2026.
- [33] RAZAVI, S. Y ZARRINI, G. 2010. Bioactivity of aviprin and aviprin-3"-*O*-Glucoside, two linear furanocoumarins from Apiaceae. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 36(3):359–362
- [34] ELLMERER, E., GANZERA, M., GREIL, R., JÖHRER, K., MADER, J., SCHUBERT, B., SIGMUND, E., STUPPNER, H. Y ZIDORN, C. 2005. Polyacetylenes from the Apiaceae vegetables carrot, celery, fennel, parsley, and parsnip and their cytotoxic activities. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 53:2518–2523.

- [35] HARRORNE, J. Y WILLIAMS, C. 1972. Flavonoids Patterns in the fruits of the Umbelliferae. *Phytochemistry* 11:1741-1750.
- [36] ABOLHASANI, F. Y NICKAVAR, B. 2009. Screening of antioxidant properties of seven Umbelliferae fruits from Iran. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 22(1):30-35.
- [37] BAGGIO, R., BUSTOS, D., COLLOCA, C., GARLAND, M. GIL, R., PAPPANO, D. Y SOSA, V. 2004. Azorellane diterpenes from *Azorella cryptantha*. *Phytochemistry* 65:2085-2089.
- [38] FORTUNATO, R., FRANZBLAU, S., MONTENEGRO, G., SAAVEDRA, E., SUAREZ, E., TIMMERMANN, B. Y WÄCHTER, G. 1998. A new antitubercular Mulinane diterpenoids from *Azorella madreporica* Clos. *Journal of Natural Products* 61:965-968.
- [39] VIDA, LA CIENCIA DE LA BIOLOGÍA. 2009. Por David Sadava “et al”. 8ª Ed. Madrid, Panamericana. 841p.
- [40] ANAYA , A. 2003. Ecología Química. México, Plaza y Valdés. 77p.
- [41] TAIZ, L. Y ZEIGE, E. 2006. Metabolitos secundarios y defensa de las plantas. En: *Fisiología vegetal*, Volumen 1. 3ª Ed. España, Universitat Jaume I, pp. 284-308.
- [42] CASTILLO, E. Y MARTINEZ, I. 2007. Manual de fitoterapia. Barcelona, Elsevier Mason. 25p.
- [43] ECOLOGÍA Y MEDIO AMBIENTE.2005. Por Teresa Valverde “et al”. México, Pearson Educación. 62p.

- [44] ORTUÑO, M. 2006. Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. España, Aiyana. 15p.
- [45] MARCANO, D. Y HASEGAWA, M. 2002. Terpenos. En: Fitoquímica orgánica, 2° Ed. Venezuela, Torino. pp. 237-420.
- [46] DANNY E. GARCÍA. 2004. Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. Pastos y Forrajes 27(1):1-12.
- [47] METZLER, D. 2003. Polyprenyl (isoprenoid) compounds. En: Biochemistry: The chemical reactions of living cells, Volume 2. 2a Ed. Estados Unidos, Academic Press. pp. 1226-1271.
- [48] BEYER, H. Y WOLFGANG, W. 1987. Manual de química orgánica. 19ª Ed. Barcelona, Reverté. 727p.
- [49] PRIMO, E. 2007. Terpenos. Carotenoides. En: Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria, Vol. 2. Barcelona, Reverté. pp. 851-871.
- [50] LOYOLA, L., BORQUEZ, J., MORALES, G. Y SAN MARTIN, A. 1998. 11,12-epoxy-mulin-13-en-20-oic acid, a diterpenoid from *Azorella compacta*. Phytochemistry 49:1091-1093.
- [51] SALGADO, F., ARECHE, C., SEPÚLVEDA, B., SIMIRGIOTIS, J., CÁCERES, F., QUISPE, C., QUISPE, L. Y CANO, T. 2014. A new mulinane diterpenoid from the cushion shrub *Azorella compacta* growing in Perú. Pharmacogn. Mag.10:543-548.
- [52] WÄCHTER, G., MATOOQ, G., HOFFMANN, J., MAIESE, W., SINGH, M., MONTENEGRO, G. Y TIMMERMANN, N. 1999. Antibacterial diterpenoid acids from *Azorella compacta*. J. Nat. Prod. 62:1319-1321.

[53] ARDILES, A., MOLINA-SALINAS, G., BÓRQUEZ, J., GONZÁLEZ-COLLADO, I., LOYOLA, L., SAID-FERNÁNDEZ, S., SAN-MARTÍN, A., Y PEÑA-RODRÍGUEZ, L. 2010. Antituberculosis activity of natural a semisynthetic azorellane and mulinane diterpenoids. *Fitoterapia* 81:50-54.

[54] ARDILES, A., BECERRIL-MONTES, P., BÓRQUEZ, J., ESCALANTE-EROSA, F., GONZÁLEZ-COLLADO, I., LOYOLA, L., MOLINA-SALINAS, G., SAID-FERNÁNDEZ, S., SAN MARTÍN, A., PEÑA-RODRÍGUEZ, L. Y YAM-PUC, A. 2010. Bioactive metabolites from the Andean flora. Antituberculosis activity of natural and semisynthetic azorellane and mulinane diterpenoids. *Phytochemistry Reviews*.9:271-278.

[55] BORQUEZ, J., LOYOLA, L., MANRIQUEZ, V., MORALES, G., SAN-MARTIN, A., Y WITTKE, O. 1998. Azorellanol: A diterpenoid with a new carbon skeleton from *Azorella compacta*. *Tetrahedron* 54:15533-15540.

[56] ARAYA, J., NEIRA, I., SILVA, S., MORTARA, R., MANQUE, P., CORDERO, E., SAGUA, H., LOYOLA, A., BORQUEZ, J., MORALES, G. Y GONZALEZ, J. 2003. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98: 413-418.

[57] LOYOLA, L., BORQUEZ, J., MORALES, G., ARAYA, J., GONZALEZ, J., NEIRA, I., SAGUA, H. Y SAN MARTIN, A. 2001. Diterpenoids from *Azorella yareta* and their trichomonocidal activities. *Phytochemistry* 56:177-180.

[58] LOYOLA, A., BORQUEZ, J., MORALES G. Y SAN MARTIN, A. 1997. Diterpenoids from *Azorella compacta*. *Phytochemistry* 44:649-651.

[59] BÓRQUEZ, J., KONG, M., LOYOLA, L., MORALES, G., MORALES, P., PASTEN, C. Y PIZARRO, E. 2003. Effect of azorellanone, a diterpene from *Azorella yareta* Hauman, on human sperm physiology. *Journal Of Andrology* 24:364-370.

[60] BORQUEZ, J., FUENTES, N., LOYOLA, L., MORALES, G., SAGUA, H., SAN MARTÍN, A. Y SOTO, J. 2005. Experimental

antihyperglycemic effect of diterpenoids of *Azorella compacta* (Umbelliferae) Phil in rats. *Phytotherapy Research* 19:713-716.

[61] BORQUEZ, J., ARDILES, A., LOYOLA, L., PEÑA-RODRIGUEZ, L., MOLINA-SALINAS, G., VALLEJOS, J., COLLADO, I. Y SIMIRGIOTIS, M. 2014. Further mulinane and azurellane diterpenoids isolated from *Mulinum crassifolium* and *Azorella compacta*. *Molecules* 19:3898-3908.

[62] ARECHE, C., CAMPOS-BRIONES, C., LIMA, C., PÉREZ, E., ROJAS-ALVAREZ, F. Y SEPÚLVEDA, B. 2013. Further mulinane diterpenoids from *Azorella compacta*. *Journal Of Pharmacy And Pharmacology* 65:1231-1238.

[63] LOYOLA, L., BORQUEZ, J., MORALES, G., SAN MARTIN, A., DARIAS, J., FLORES, N. Y GIMENEZ, A. 2004. Mulinane-type diterpenoids from *Azorella compacta* display antiplasmodial activity. *Phytochemistry* 65:1931-1935.

[64] LOYOLA, L., BORQUEZ, J., MORALES, G. Y SAN MARTIN, A. 1997. Mulinol, a diterpenoid from *Azorella compacta*. *Phytochemistry* 45:1465-1467.

[65] BACKHOUSE, N., BÓRQUEZ, J., DELPORTE, C., LOYOLA, L., SALINAS, P. Y SAN-MARTÍN, A. 2003. Pharmaco-toxicological study of diterpenoids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11:1187-1190.

[66] REPETTO, M. 1997. Biotransformaciones de los tóxicos. En: *Toxicología fundamental*. 3ª Ed. Madrid, Díaz de Santos. pp. 97-109.

[67] CARVALHO, C. Y FONSECA, M. 2006. Biotransformation of terpenos. *Biotechnology advances* 24:134-142.



[68] ARIAS, G., STASHENKO, E. Y TORRES, R. 2007. Biotransformación de terpenos R(+)-limoneno, a-pineno y terpineno por medio de cloroperoxidasa de *Caldariomyces fumago*. *Scientia Et Technica* 33:75-78.

[69] NETRUSOV, A., PARSHIKOV, I. Y SUTHERLAND, J. 2012. Microbial transformation of antimalarial terpenoids. *Biotechnology Advances* 30:1516-1523.

[70] ARECHE, C., LOYOLA, L., BORQUEZ, J., ROVIROSA, J. Y SAN MARTIN, A. 2008. Microbial transformation of the diterpene mulin-11,13-dien-20-oic acid by *Mucor plumbeus*. *Magn. Reson. Chem.* 46:765-768.

[71] BRENER, Z. Y GAZZINELLI, R. 1997. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *International Archives of Allergy and Immunology* 114:103-110.

[72] ALVES, M., CANUTO, G., COLLI, W., PEREIRA, M., SOARES, C. Y TAVARES, M. 2015. Down regulation of NO signaling in *Trypanosoma cruzi* upon parasite-extracellular matrix interaction: changes in protein modification by nitrosylation and nitration. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9(4):1-10.

[73] ARAYA, J., BORQUEZ, J., LOYOLA, L., MORALES, G., NEIRA, I., POBLETE, L., PORCILLE, P., SAGUA, H. Y SILVA, P. 1998. Actividad de diterpenoides de *Azorella compacta* (llareta) sobre amastigotes de *Trypanosoma cruzi*. *Boletín Chileno de Parasitología* 53: 9-13.

[74] INSTITUTO CHILENOS DE MEDICINA REPRODUCTIVA. 2016. Métodos anticonceptivos de barrera: Espermicidas. [en línea]<[http://icmer.org/wp\\_ae/espermicidas/](http://icmer.org/wp_ae/espermicidas/)> [consultado: 27 Mayo 2016].

[75] ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. 2016. Tuberculosis. [en línea]<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/>> [consultado: 27 Mayo 2016].

[76] BECERRIL-MONTES, P., BÓRQUEZ, J., ESCALANTE-EROSA, F., LOYOLA, L., MOLINA-SALINAS, G., PEÑA-RODRÍGUEZ, L., SAID-FERNÁNDEZ, S. Y YAM-PUC, A. 2010. Antituberculosis activity of alkylated mulinane diterpenoids. *Fitoterapia* 81:219-222.

[77] BENITES, J., DÍAZ, P., LÓPEZ, J., ORDÓÑEZ, J., PASTENE, E., ROJAS, M. Y ROJO, L. 2009. Antioxidant capacity and polyphenolic content of twelve traditionally used herbal medicinal infusions from the south american andes. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 8:498-508

[78] ÁMBITO CIENTÍFICO-TECNOLÓGICO. 2009. Por Francisco García “et al”. Madrid, Editex. 246p.

[79] LO ESENCIAL EN CÉLULA Y GENÉTICA. 2003. Por Emma Jones “et al”. 2ª Ed. Madrid, Elsevier. 4p.

[80] PUMAROLA, A. 1987. El mundo microbiano. En: Microbiología y parasitología médica. 2ª Ed. Barcelona, Masson. pp. 11-22.

[81] INTRODUCCIÓN A LA MICROBIOLOGÍA. 2007. Por Gerard Tortora “et al”. 9ª Ed. Buenos Aires, Panamericana. 86p.

[82] KONEMAN, E. 2006. Bacteriología médica: taxonomía, morfología, fisiología y virulencia. En: Diagnostico Microbiológico. 6ª Ed. Argentina, Panamericana. pp. 161-203.

- [83] GARCÍA, P. 1997. Generalidades sobre estructura y metabolismo de las bacterias. En: Microbiología clínica aplicada. 3ª Ed. Madrid, Díaz de Santos. pp. 1-7.
- [84] PRATS, G. 2005. Técnicas microbiológicas. En: Microbiología clínica. Madrid, Panamericana. pp. 17-227.
- [85] HISTORIA Y EVOLUCIÓN DE LA MEDICINA. 2009. Por Luis Cavazos “et al”. México, Manual Moderno. 104p.
- [86] GARCÍA, V. 2004. Las bacterias. En: Introducción a la microbiología. 2a Ed. Costa Rica, Universidad Estatal a Distancia. pp. 39-70.
- [87] LOYOLA, L., BORQUÉZ, J., MORALES, G. Y SAN MARTIN, A. 1996. Mulinolic acid, a diterpenoid from *Mulinium crassifolium*. *Phytochemistry* 43:165-168.
- [88] LOYOLA, L., BORQUEZ, J., MORALES, G. Y SAN MARTIN, A. 2000. Mulinane-type diterpenoids from *Laretia acaulis*. *Phytochemistry* 53:961-963.
- [89] ATLAS, R. 2010. Handbook of Microbiological Media. 4a Ed. Estados Unidos, ASM Press. 934p.
- [90] SOMASEGARAN, P. Y HOBEN, H. 1994. Handbook for Rhizobia: Methods in Legume-Rhizobium Technology. Nueva York, Springer Laboratory. 356p.
- [91] BACTERIOLOGÍA GENERAL: Principios Y Prácticas de Laboratorio. 2005. Por Evelyn Rodríguez “et al”. Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 471p.

[92] DONOSO, V. 2014. Aislamiento y actividad antibacteriana de diterpenos del género *Azorella*. Tesis de Químico Industrial. Santiago, Universidad Tecnológica Metropolitana del Estado de Chile, Facultad de Ciencias Naturales, Matemática y del Medio Ambiente.

## **ANEXOS**

## ANEXO 1

### Ensayos con ácido 16-nor-mulin-11-en-13-ona-20-oico

Los organismos testeados fueron seis bacterias bucales:

- *Fusobacterium nucleatum*: Bacilo Gram-negativo, asociado a la formación de placa dental y gingivitis.
- *Streptococcus oralis*: Bacteria coco Gram-positiva, relacionada con la formación de caries.
- *Veillonella parvula*: Bacteria tipo coco Gram-negativa, no patógena.
- *Agreggatibacter actinomycetemcomitans*: Bacteria cocobacilo Gram-negativa, que provoca periodontitis severa.
- *Actinomyces naeslundii*: Bacilo Gram-negativo relacionado con la formación de caries y periodontitis.
- *Porphyromonas gingivalis*: Bacteria cocobacilo Gram-negativo que genera periodontitis crónica y agresiva.

Se sembraron 100 µL de caldo de bacterias sobre placas de agar-sangre compuesta por 5% de sangre de caballo desfibrinada, hemina (5 mg/L) y menadiona (1 mg/L). Las placas inoculadas se incubaron durante 24 horas a 37°C en condiciones anaeróbicas.

Posteriormente se dispusieron sobre la superficie de las placas de agar-sangre, discos de celulosa estériles impregnados con 20 µL del ácido 16-nor-mulin-11-en-13-ona-20-oico disuelto en DMSO (25 mg/mL), junto a ellos se depositó un disco de papel con DMSO como control negativo, y otro impregnado con una solución de 0,12% de clorehexidina y 0,05% de cloruro de cetilpiridina (enjuague bucal), como control positivo.

Luego de 48 horas de incubación se midió la zona de inhibición de cada disco. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Se realizó ensayos biológicos para determinar la bioactividad del ácido 16-nor-mulin-11-en-13-ona-20-oico contra bacterias bucales, este se llevó a cabo *in vitro* mediante el método de difusión en discos de papel. Los organismos testeados fueron *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus oralis*, *Veillonella párvula*, *Agreggatibacter actinomycetemcomitans*, *Actinomyces naeslundii* y *Porphyromonas gingivalis*.

Tabla 12: Resultados ensayos antibacterianos del ácido 16-nor-mulin-11-en-13-ona-20-oico (mm).

<b>Bacteria</b>	<b>Norditerpeno</b>	<b>Control positivo</b>
<i>F. Nucleatum</i>	0,92	1,11
<i>S. oralis</i>	0,97	1,15
<i>V. párvula</i>	0,91	1,11
<i>A. actinomycetem.</i>	0,99	1,05
<i>A. naeslundii</i>	1,12	1,19
<i>P. gingivalis</i>	1,09	1,55

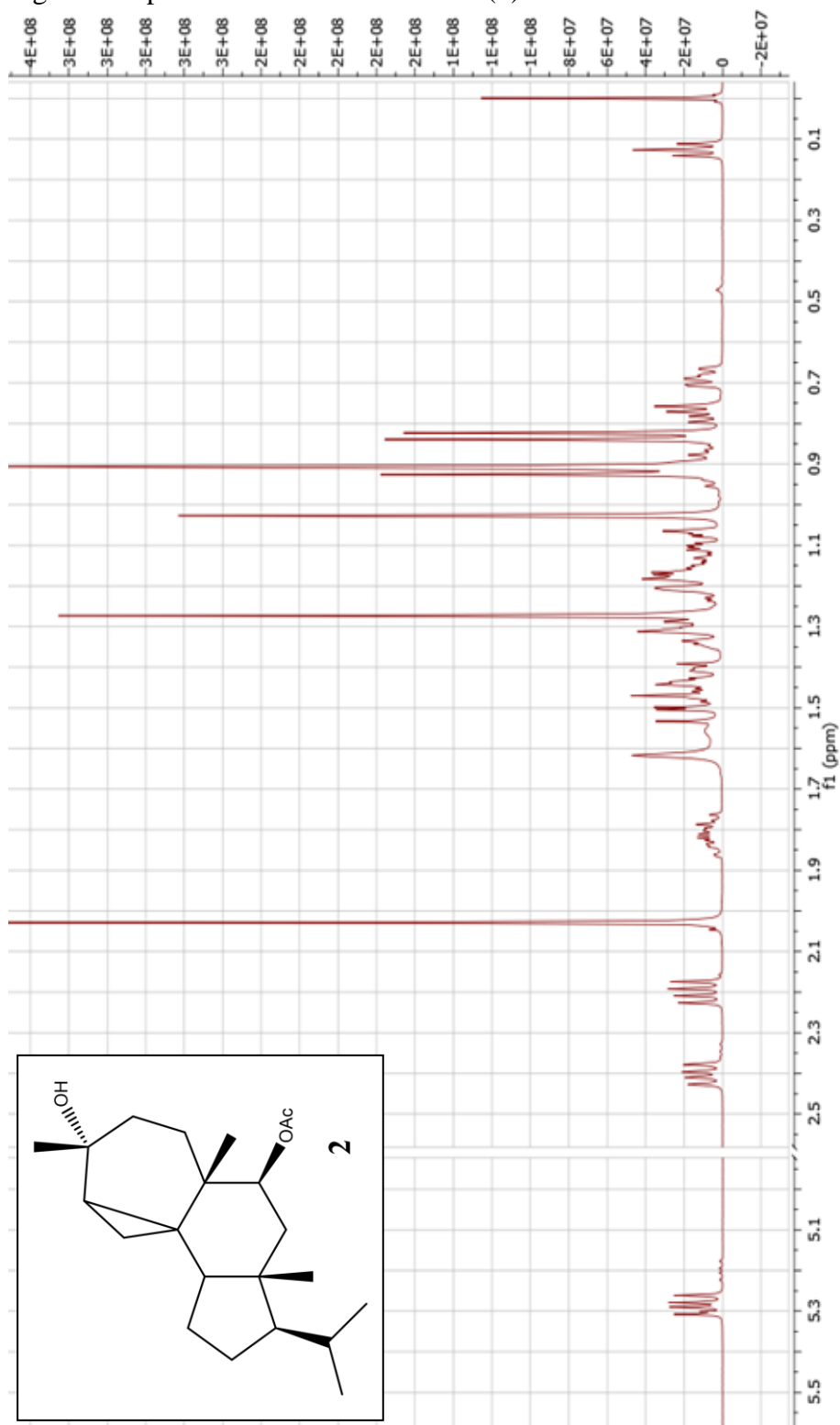
Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

Los resultados expuestos en la Tabla 12 muestran que el norditerpeno fue activo contra todas las bacterias utilizadas, ya que los valores obtenidos de los halo de inhibición con cada microorganismos son muy cercanos a los registrados con el control positivo utilizado.

## ANEXO 2

### - Compuesto natural.

Figura I: Espectro RMN  $^1\text{H}$  Azorellanol (2).





- **Compuesto natural.**

Figura II: Espectro RMN  $^1\text{H}$  Ácido mulin-12-en-11,14-diona-20-oico (3).

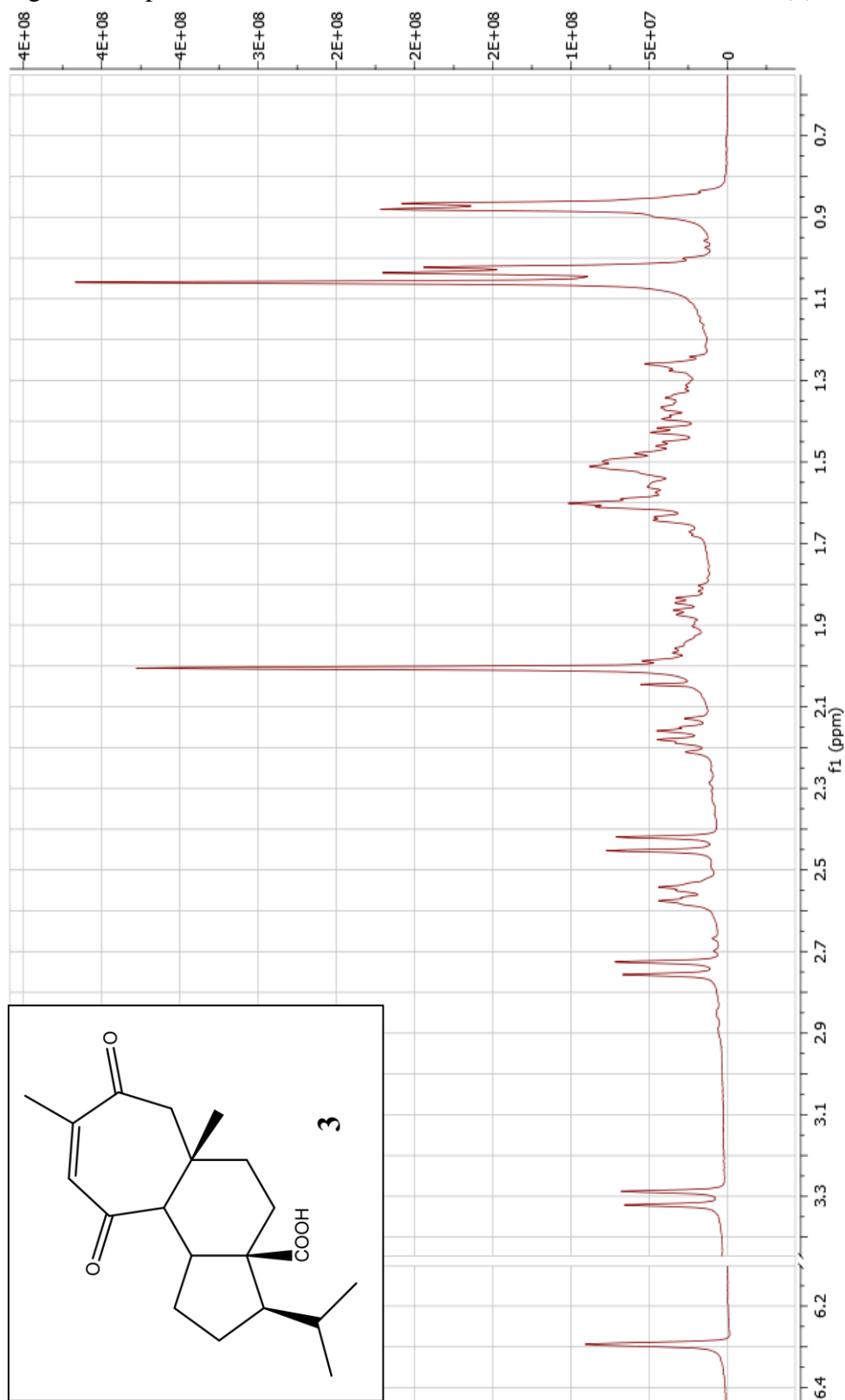
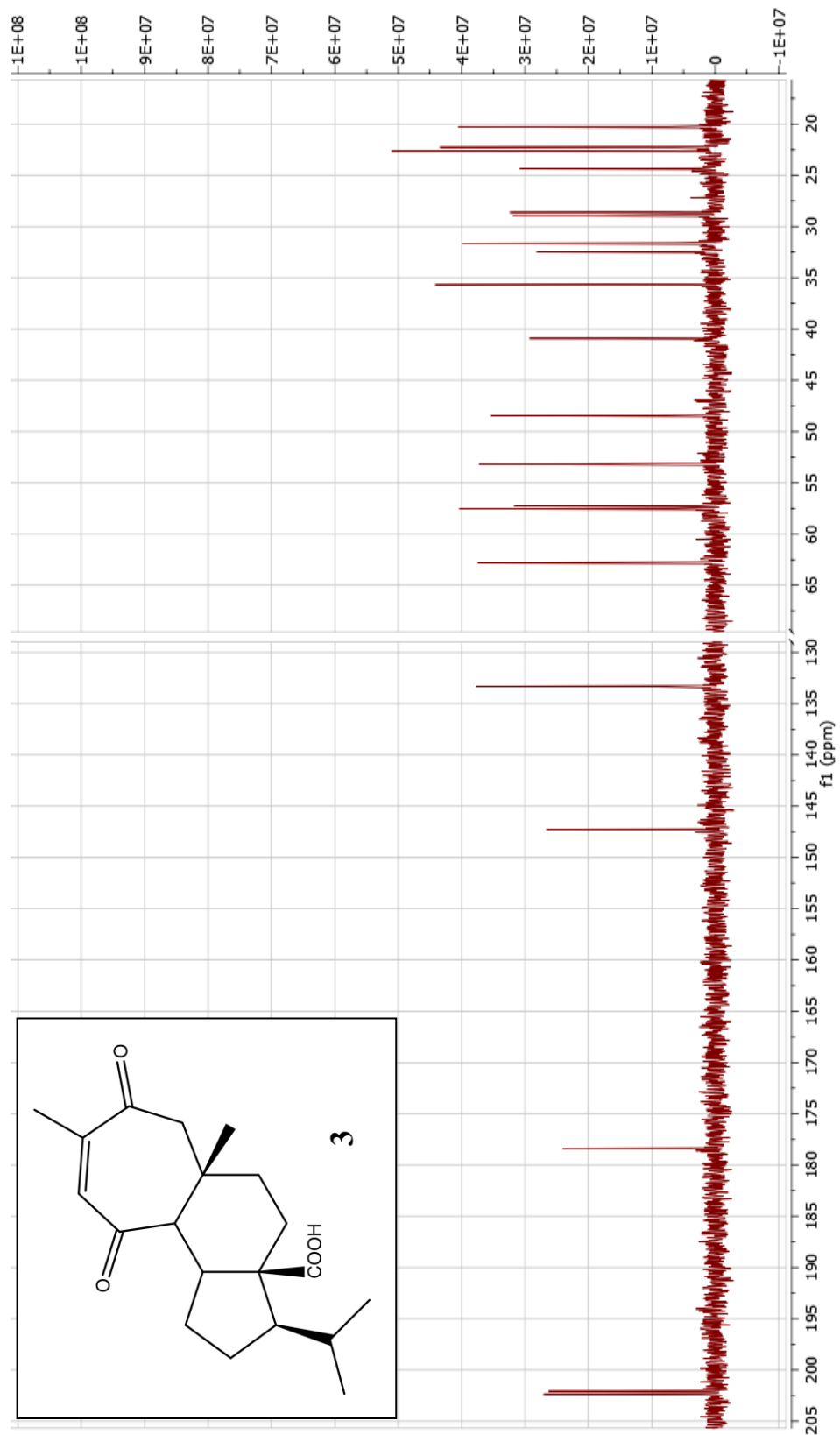
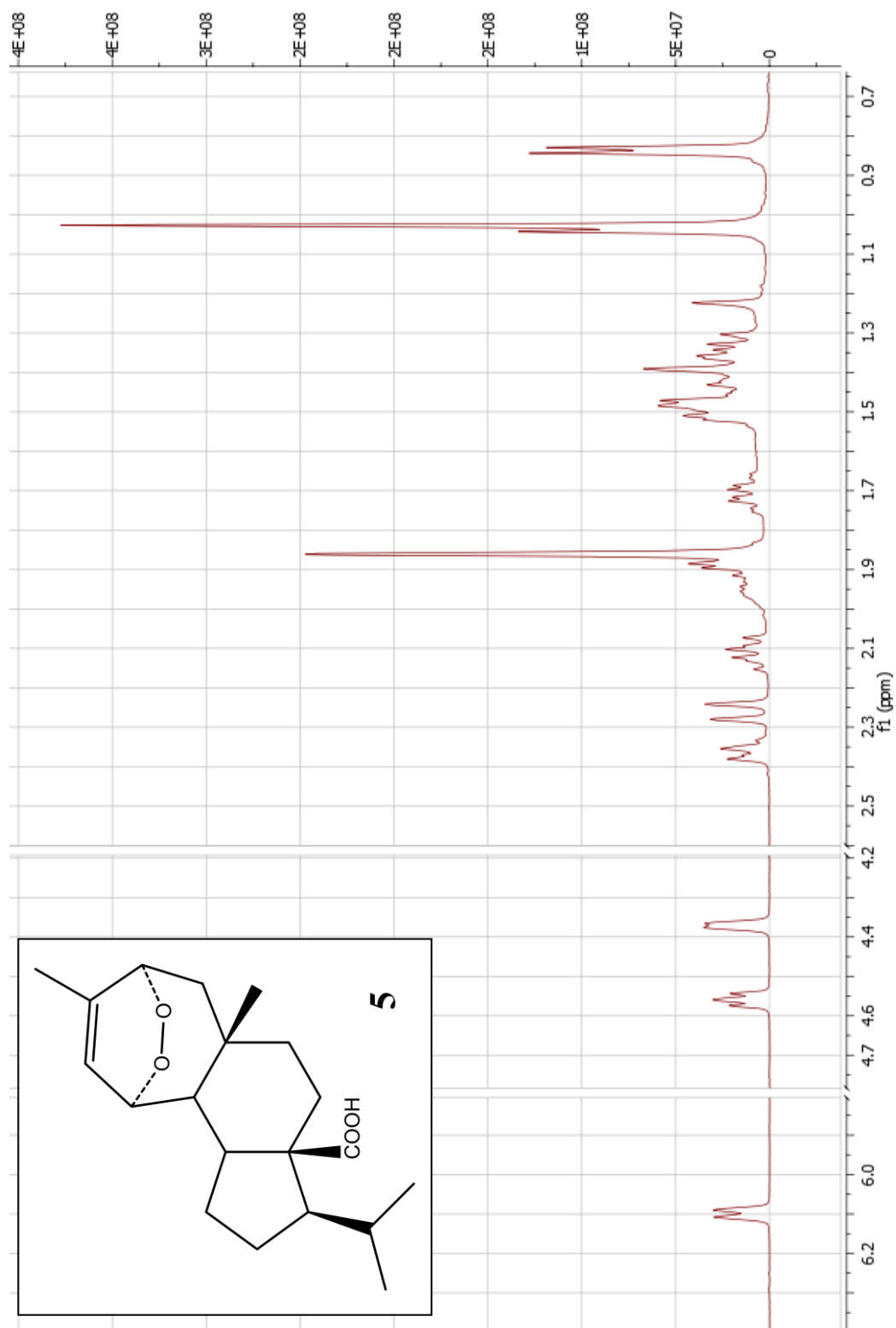


Figura III: Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  Ácido mulin-12-en-11,14-diona-20-oico (3).



- **Compuesto natural.**

Figura IV: Espectro RMN  $^1\text{H}$  Ácido mulfínico (5).



- **Compuesto natural.**

Figura V: Espectro RMN  $^1\text{H}$  Lactona del ácido mulin-9-hidroxi-11-en-20-oico (**6**).

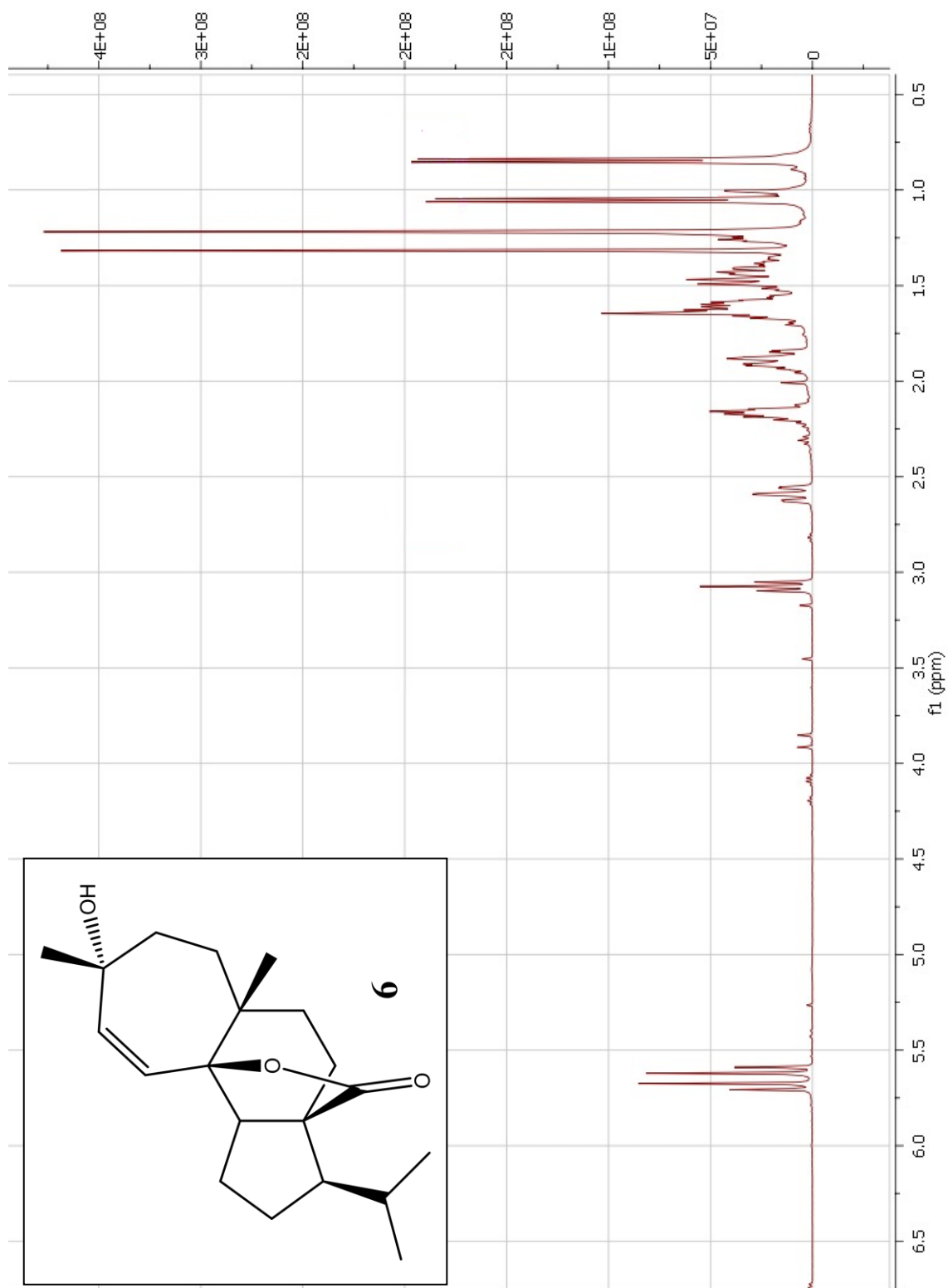
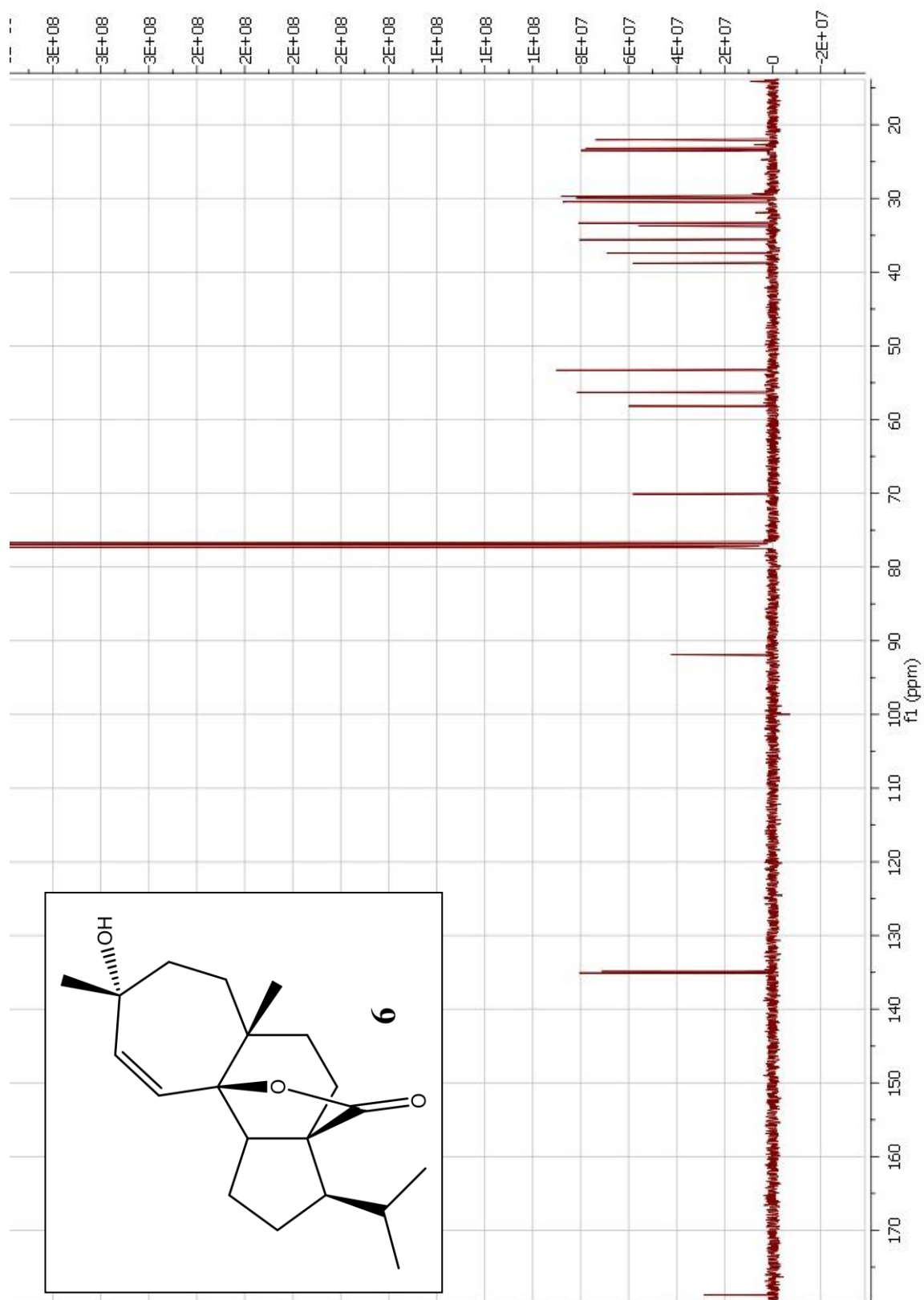


Figura VI: Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  Lactona del ácido mulin-9-hidroxi-11-en-20-oico (6).



- **Compuesto natural.**

Figura VII: Espectro RMN  $^1\text{H}$  Ácido 16-normulin-11-en-13-ona-20-oico (**29**).

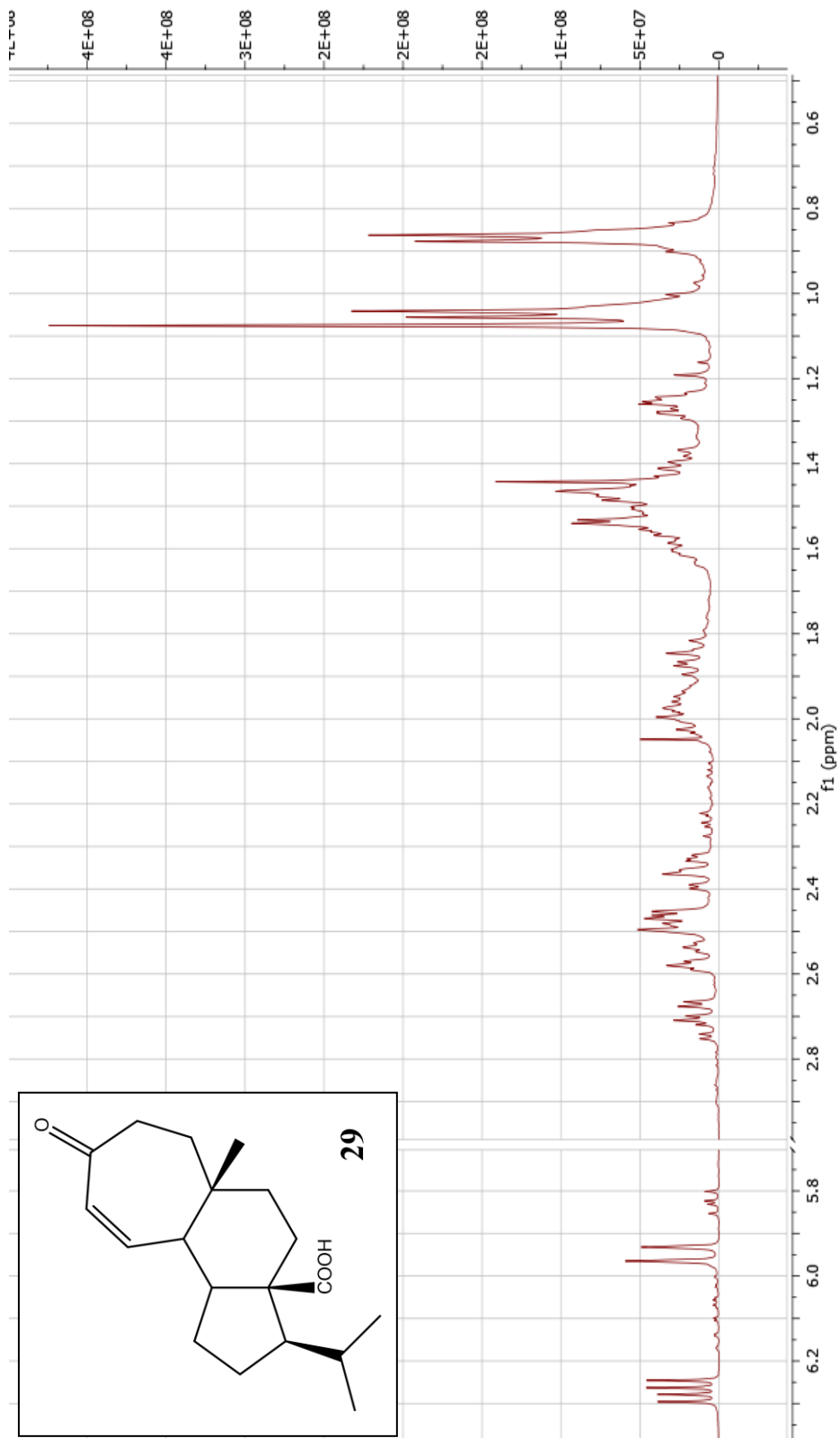
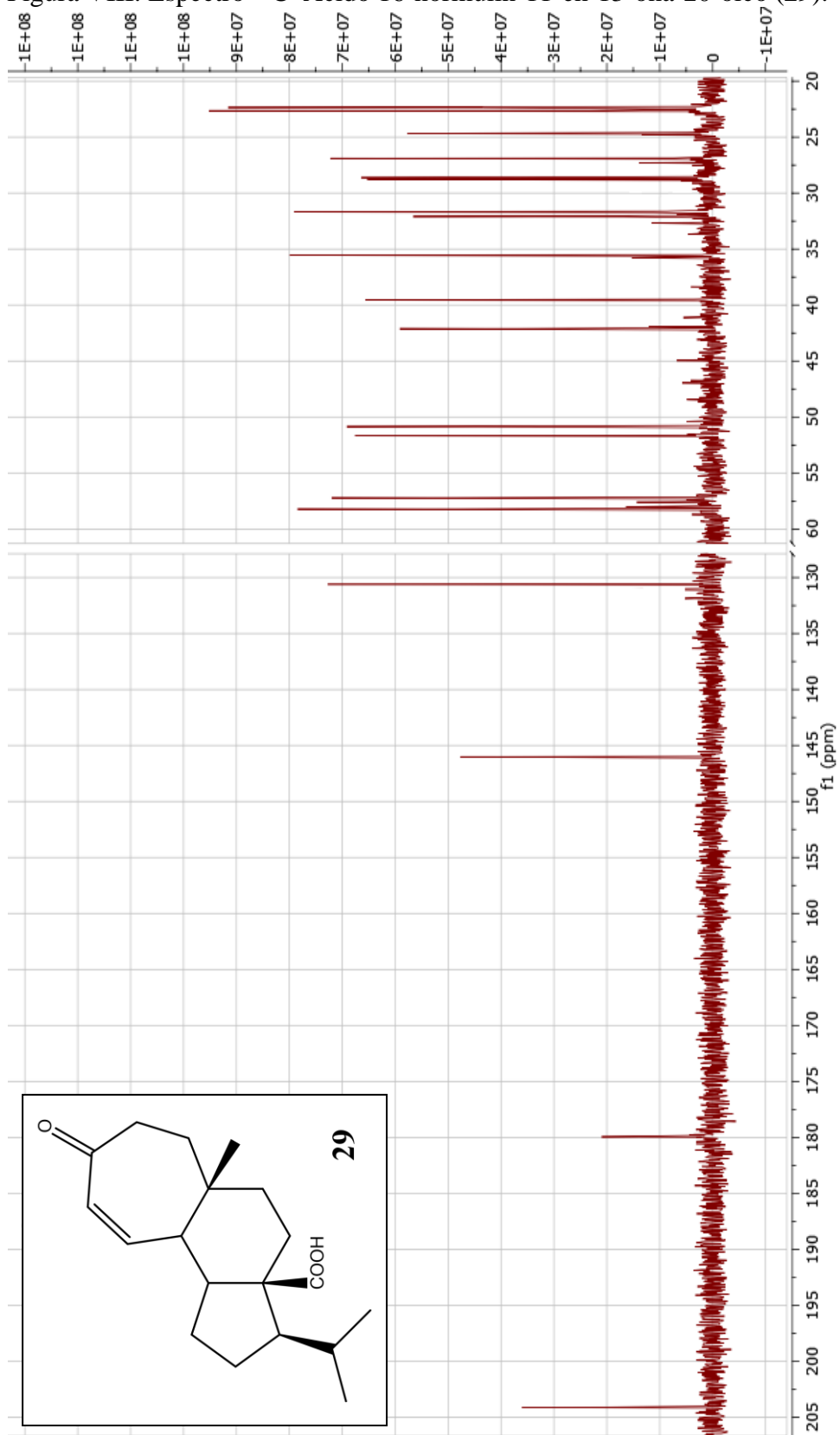
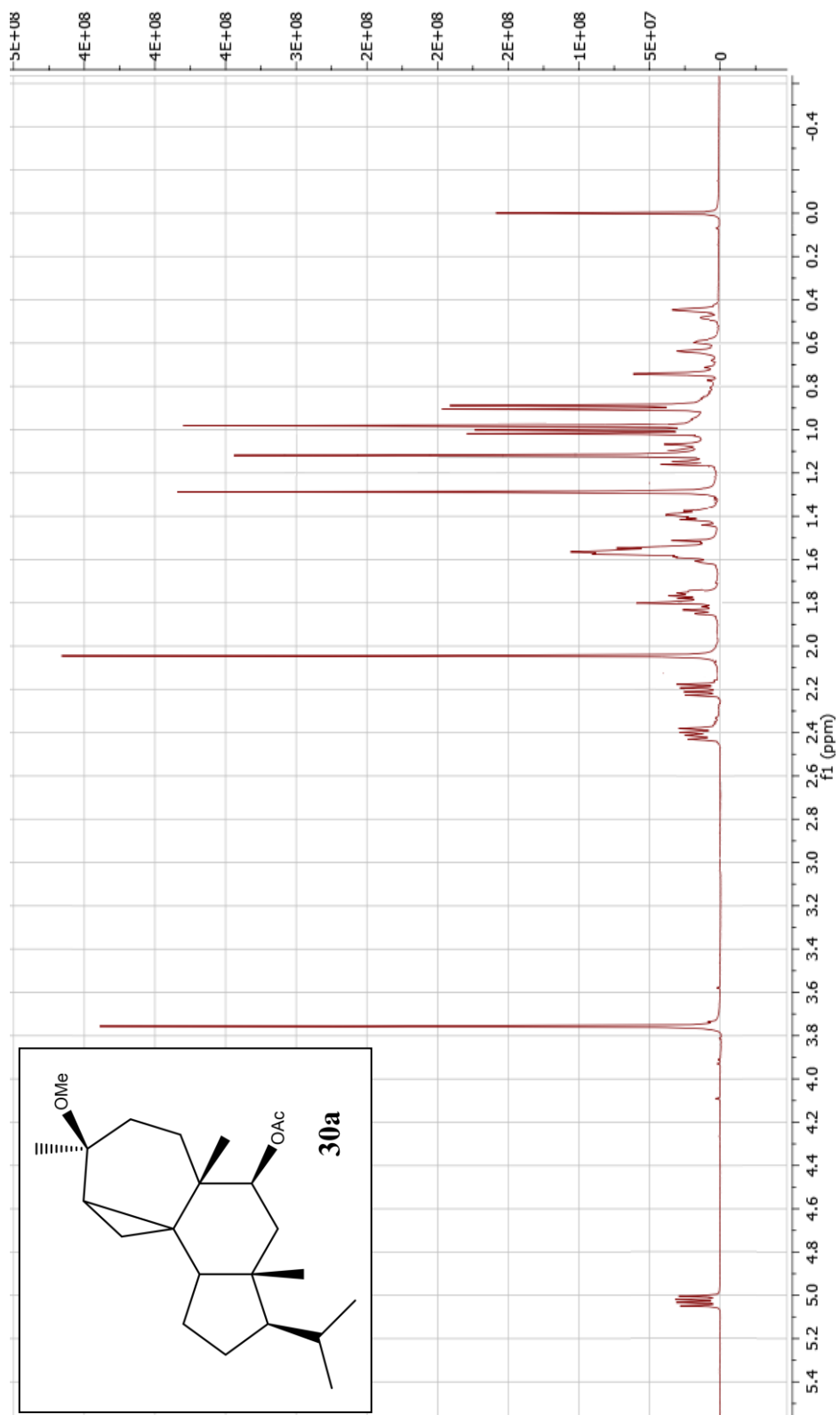


Figura VIII: Espectro  $^{13}\text{C}$  Ácido 16-normulin-11-en-13-ona-20-oico (**29**).



- **Reacción de azorellanol sobre sílica gel.**

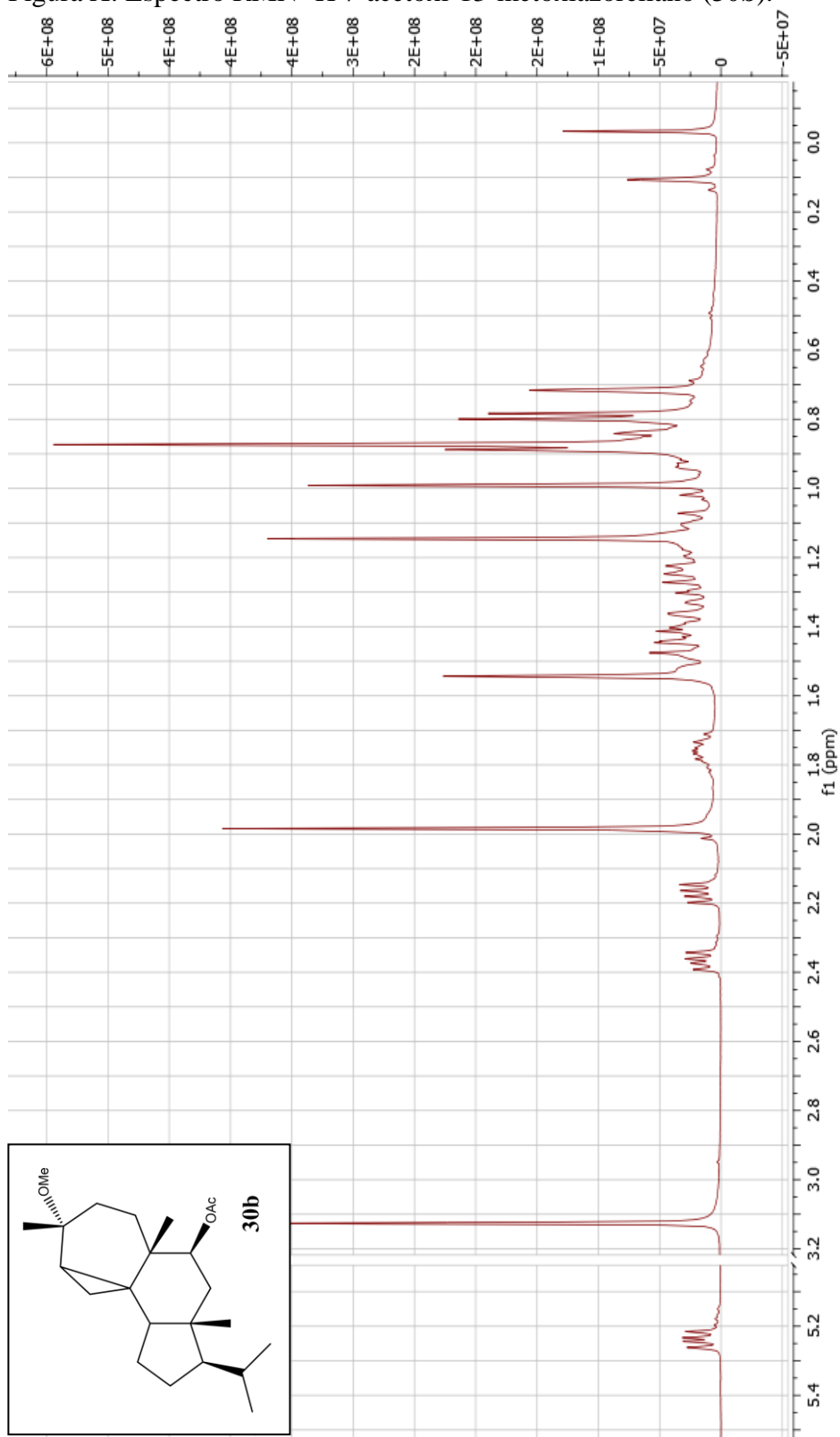
Figura IX: Espectro RMN  $^1\text{H}$  7-acetoxi-13-metoxiepiazorellano (**30a**).





- **Reacción de epiazorellanol sobre sílica gel.**

Figura X: Espectro RMN  $^1\text{H}$  7-acetoxi-13-metoxiazorellano (**30b**).



- Apertura ciclopropano de azorellanol en medio ácido.

Figura XI: Espectro RMN  $^1\text{H}$  7-acetoximulin-9,12-dieno (**31**).

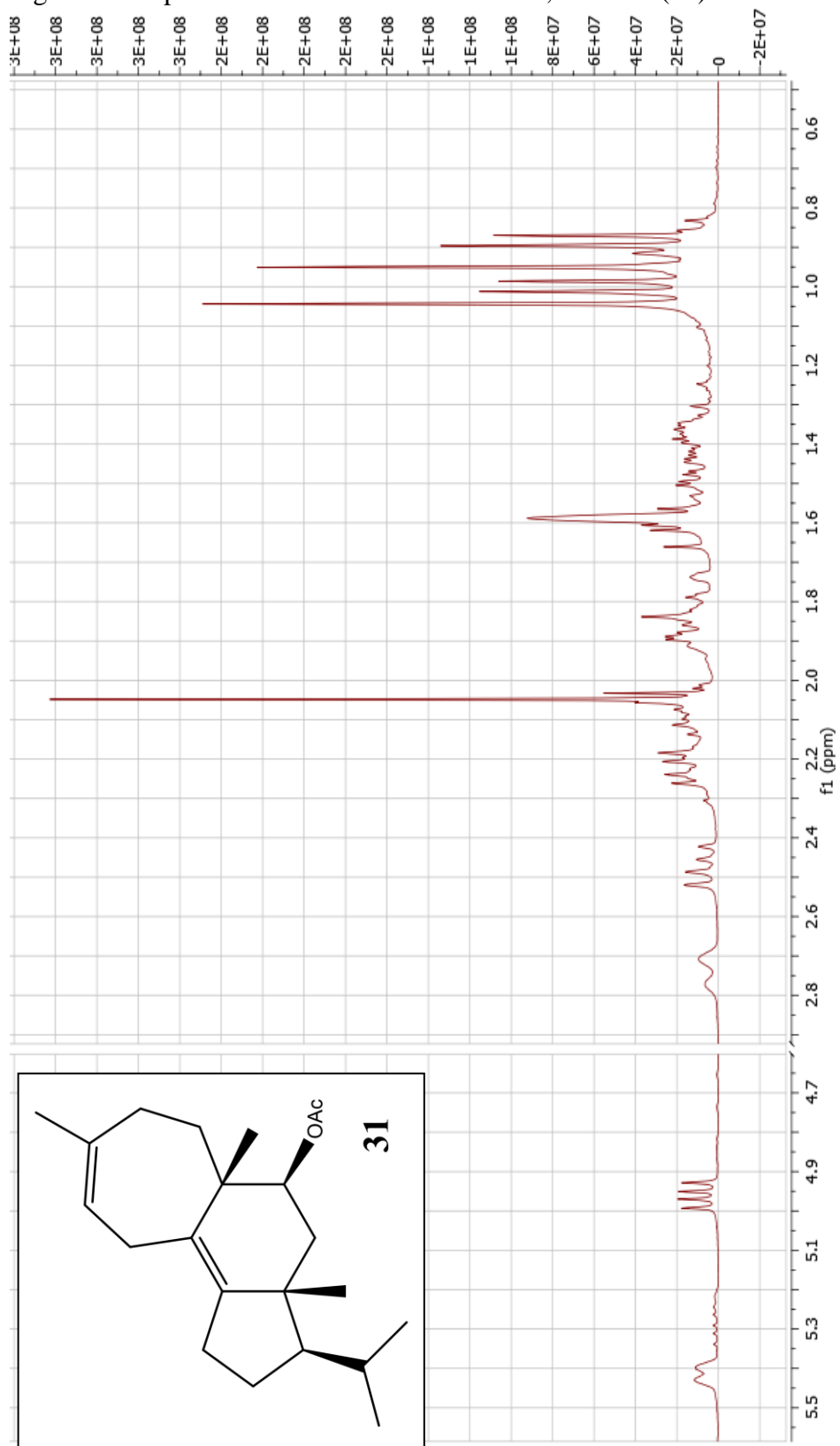
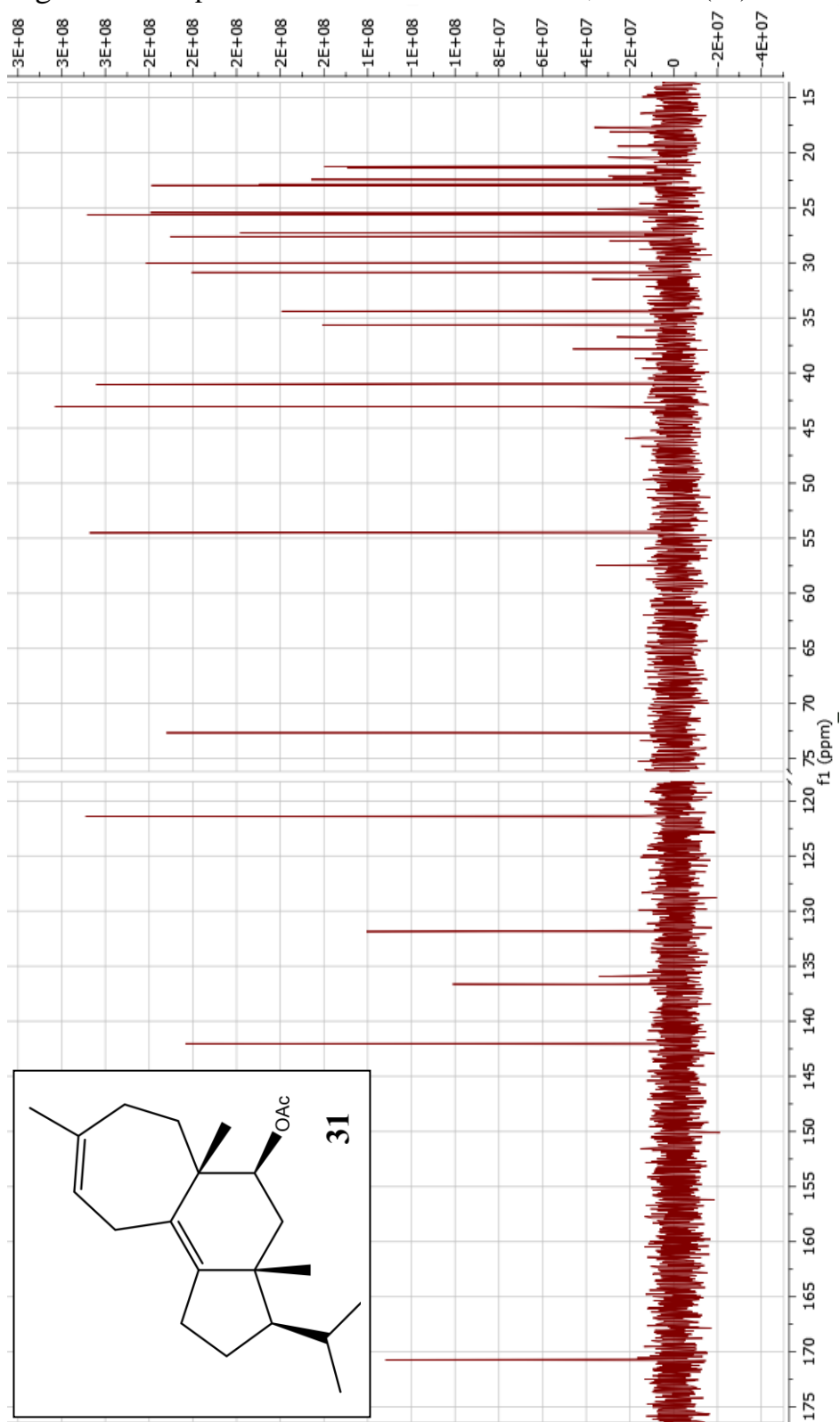


Figura XII: Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  7-acetoximulin-9,12-dieno (**31**).



- **Compuesto secundario de reacción de apertura de ciclopropano.**

Figura XIII: Espectro RMN  $^1\text{H}$  7-acetoxi-13- $\alpha$ -metoximulin-9-eno (**31a**).

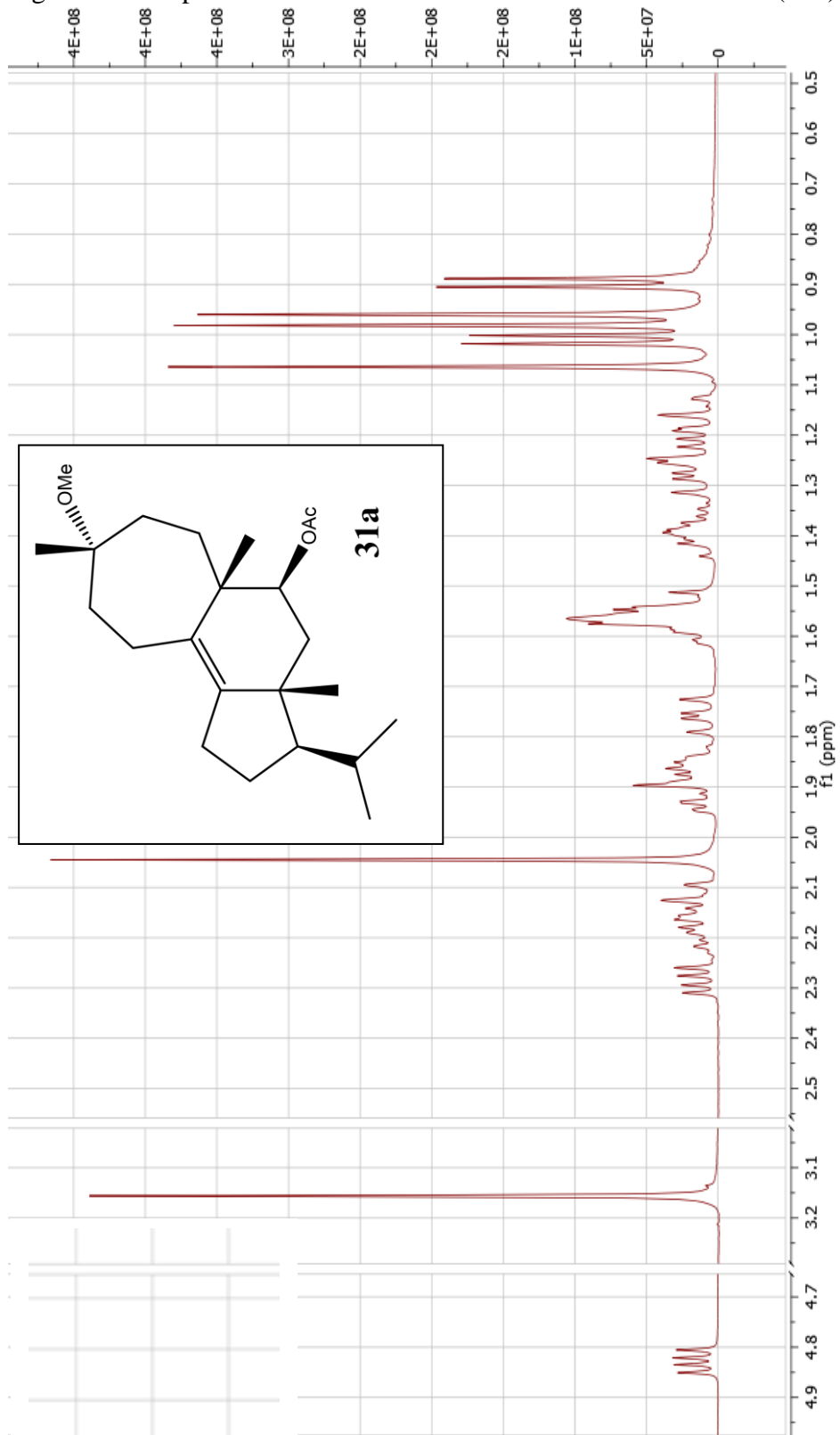
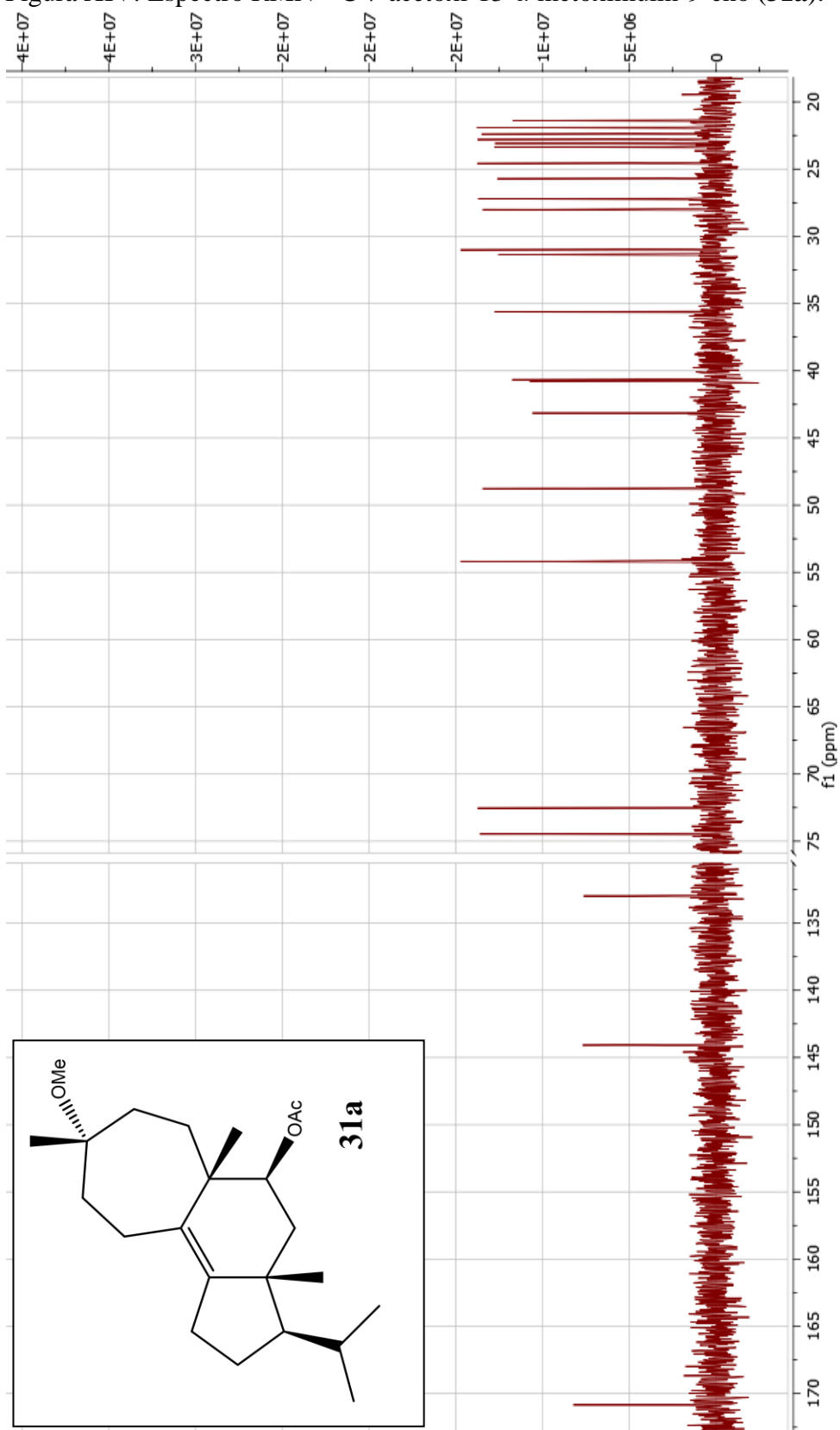


Figura XIV: Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  7-acetoxi-13- $\alpha$ -metoximulin-9-eno (**31a**).



- **Hidrólisis de azorellanol en medio básico.**

Figura XV: Espectro RMN  $^1\text{H}$  7-desacetilazorellanol (**16**).

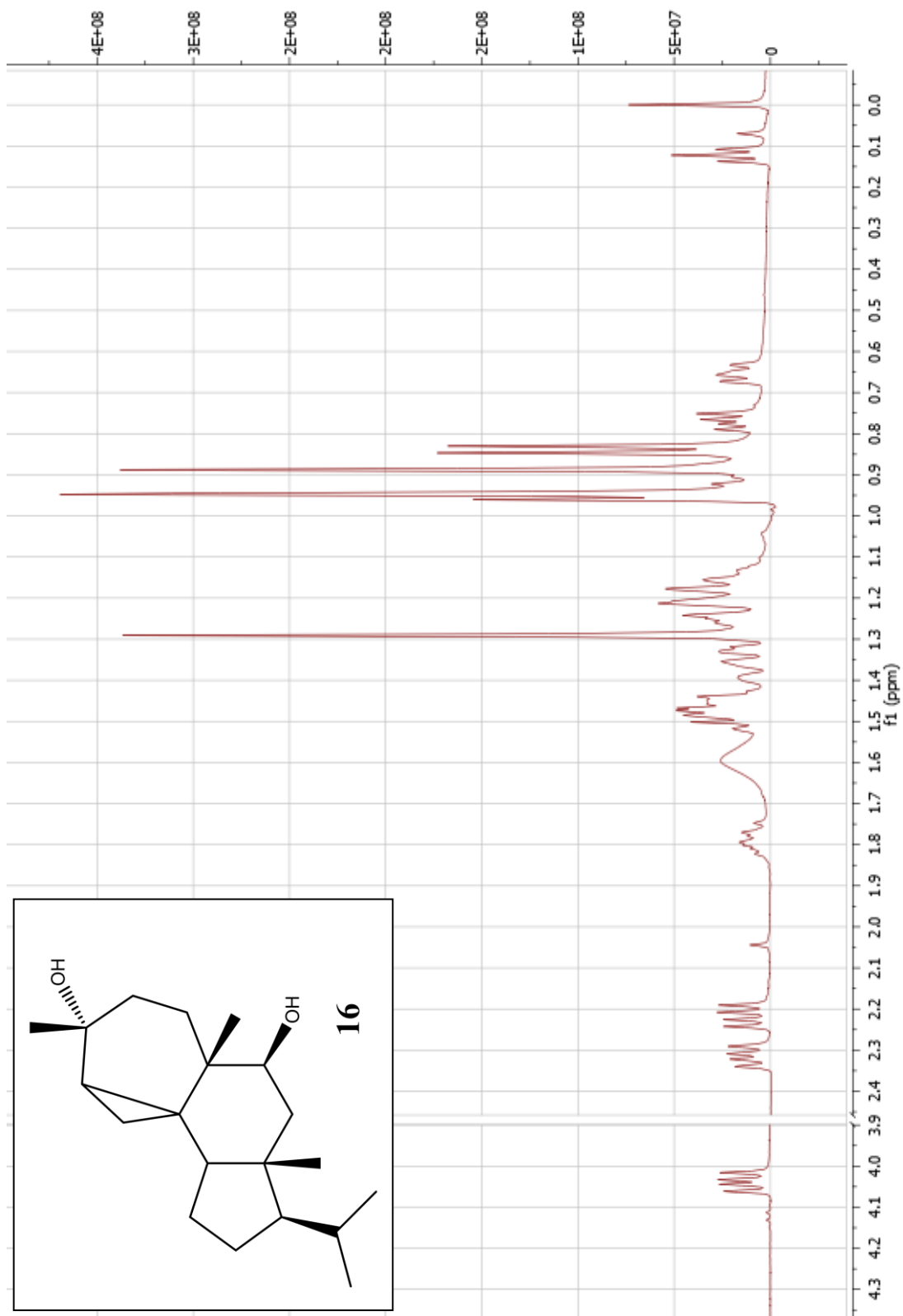
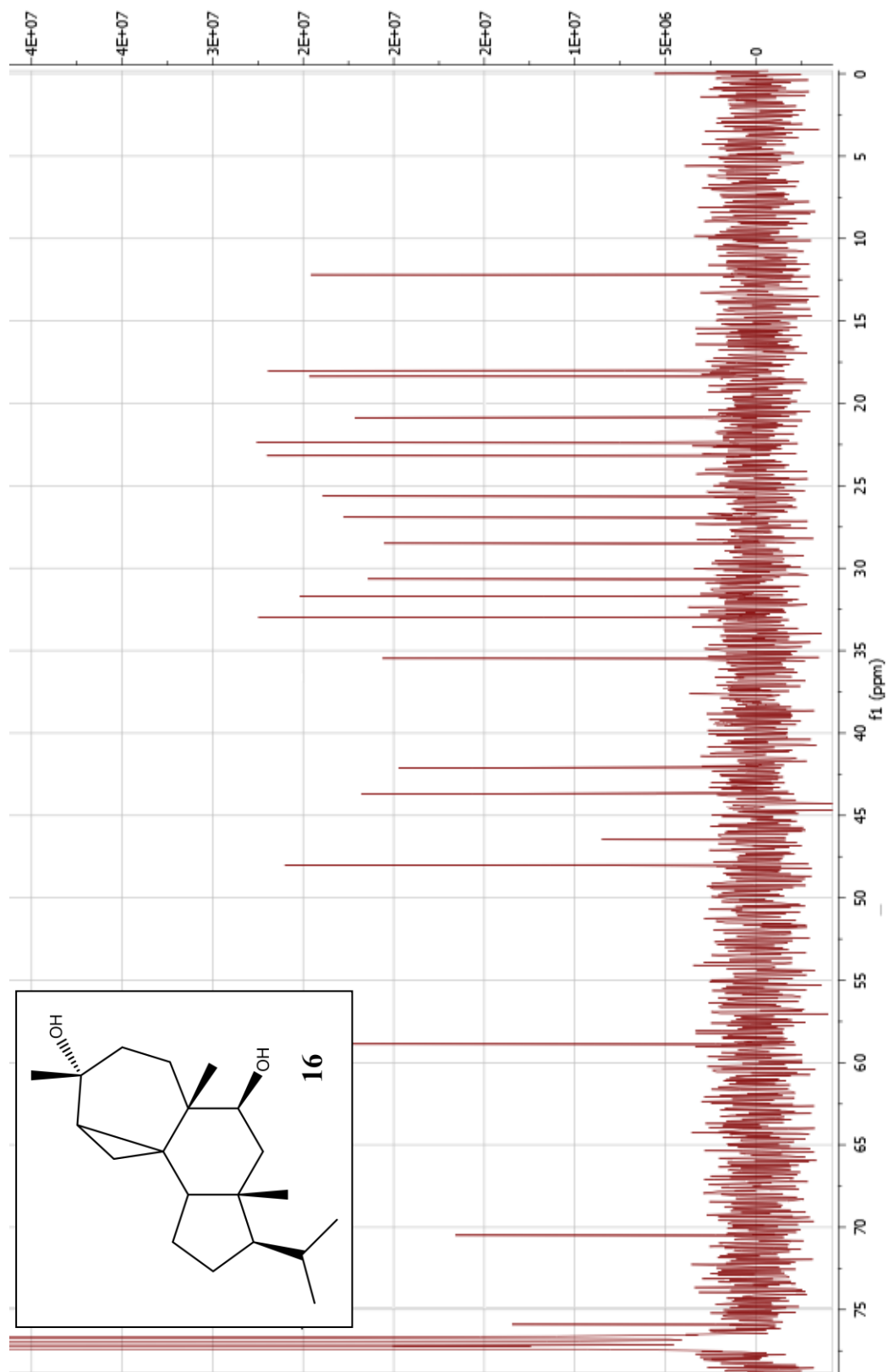


Figura XVI: Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  7-desacetilazorellanol (**16**).



- Oxidación de 7-desacetilazorellanol (16) con  $\text{KMnO}_4$ .

Figura XVII: Espectro RMN  $^1\text{H}$  Azorellanona (7).

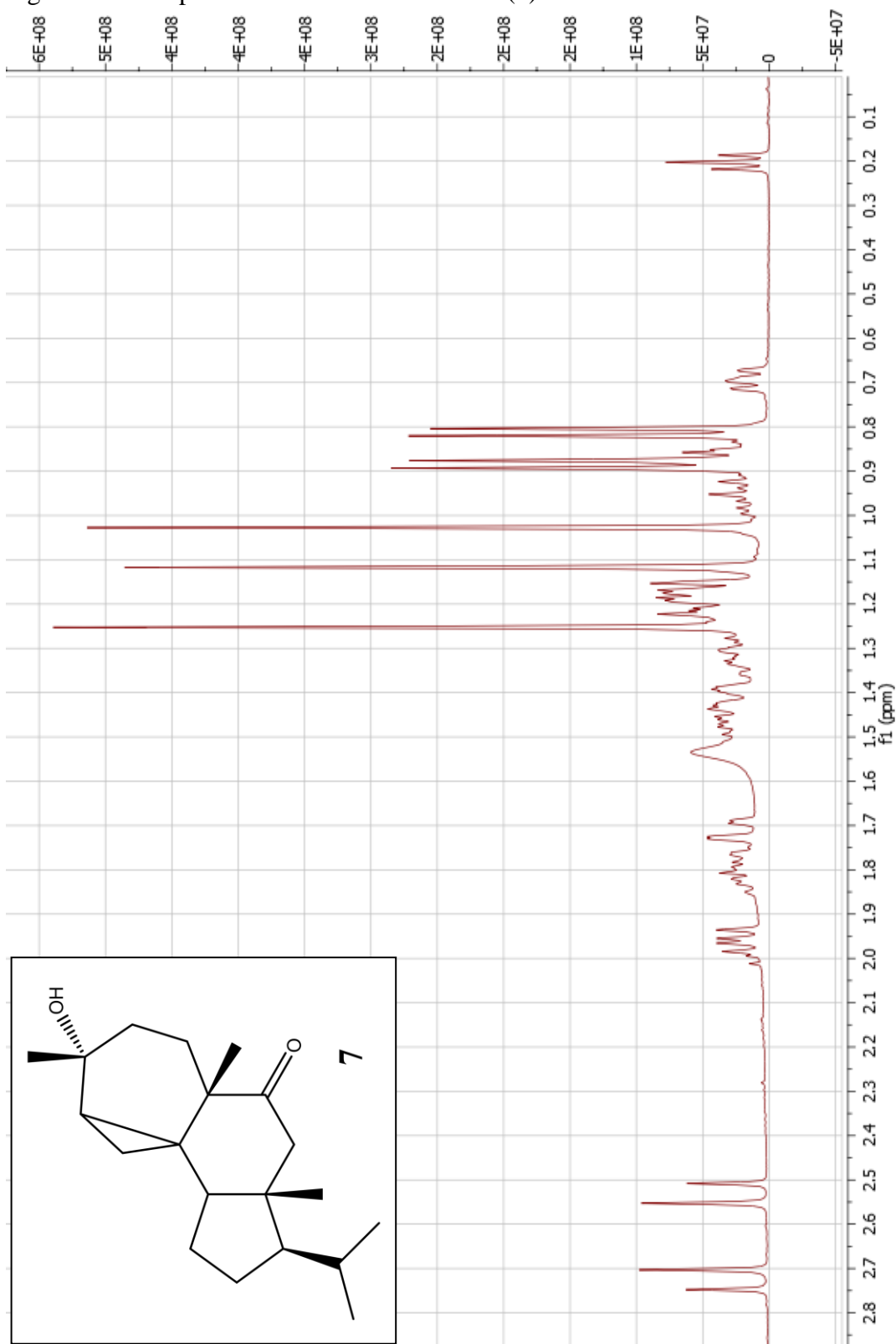
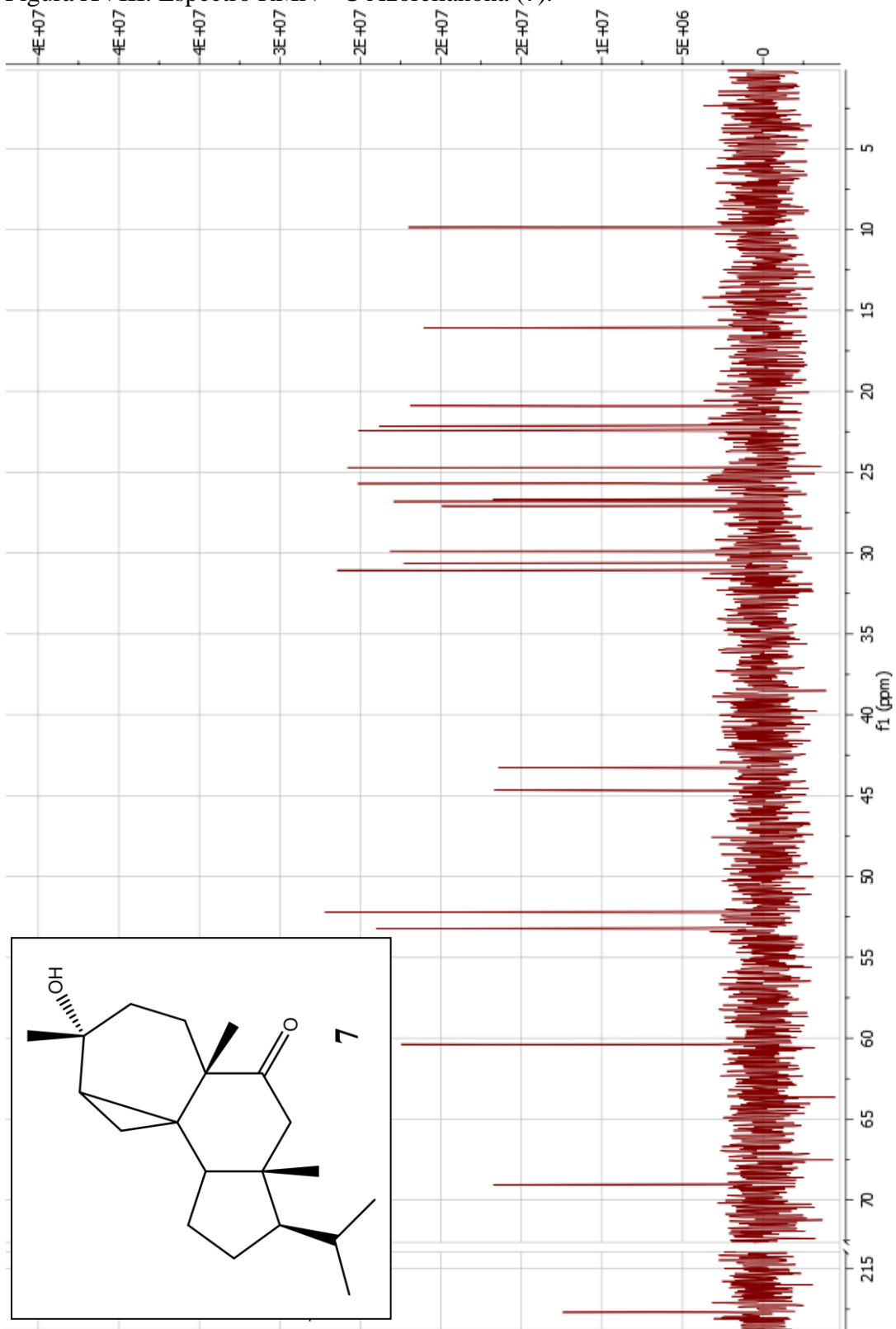




Figura XVIII: Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  Azorellanona (**7**).



- **Compuesto secundario oxidación de 7-desacetilazorellanol (16) con  $\text{KMnO}_4$ .**

Figura XIX: Espectro RMN  $^1\text{H}$  9- $\beta$ -hidroximulin-12-en-7-ona (**7a**).

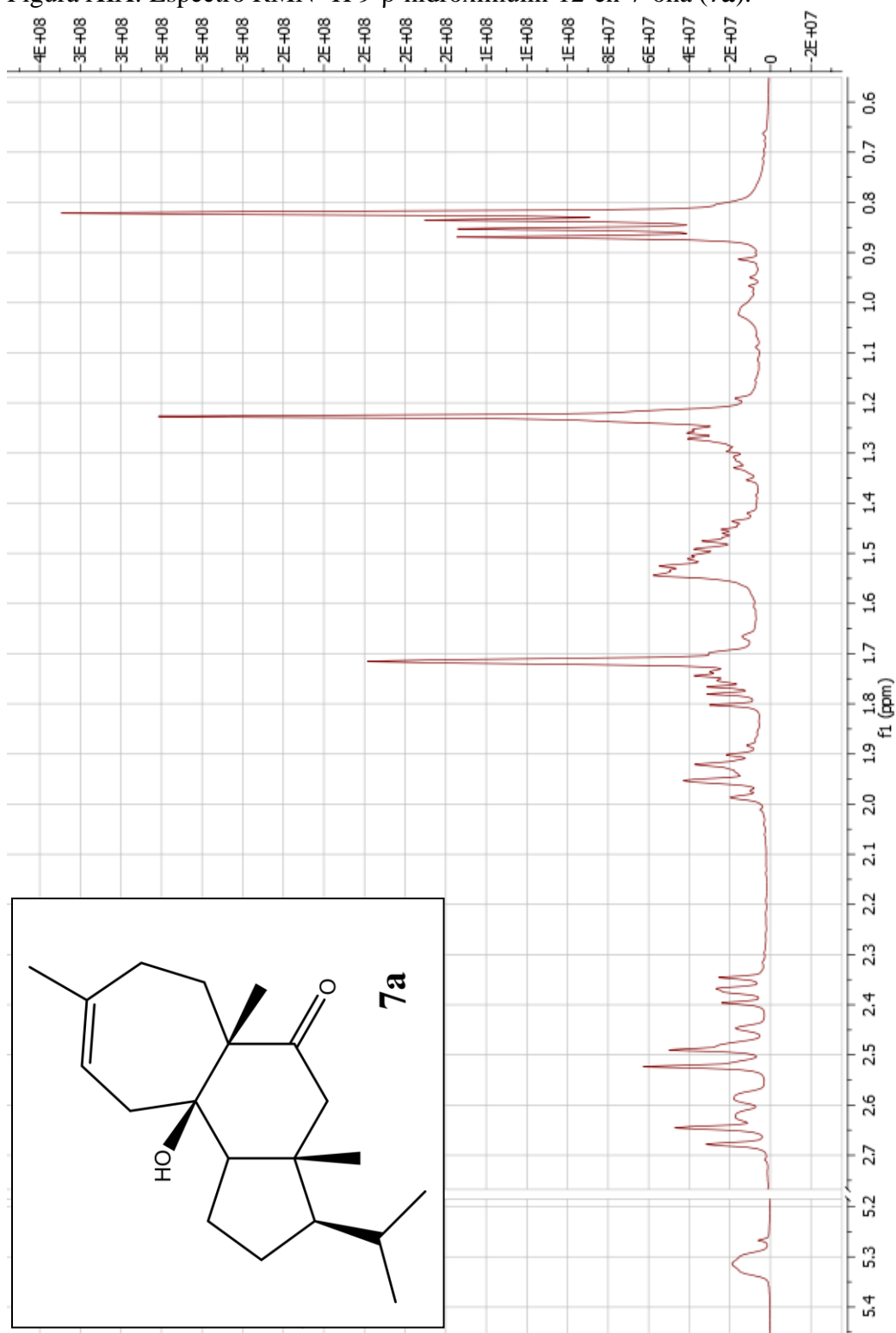
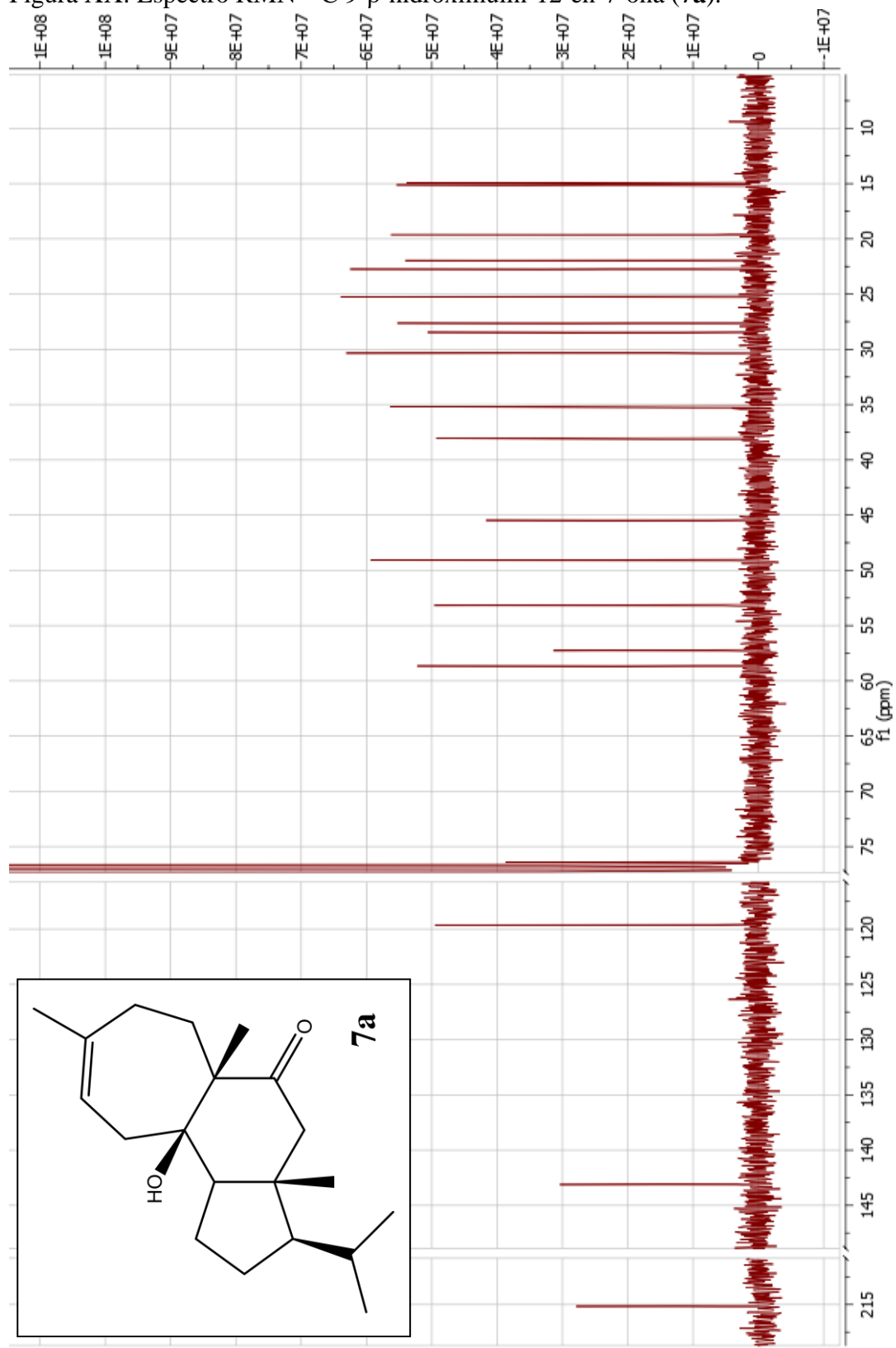


Figura XX: Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  9- $\beta$ -hidroximulin-12-en-7-ona (**7a**).



- **Hidrólisis de 7-acetoximulin-9,12-dieno (31) en medio básico.**

Figura XXI: Espectro RMN <sup>1</sup>H Mulin-9,12-dien-7-ol (32).

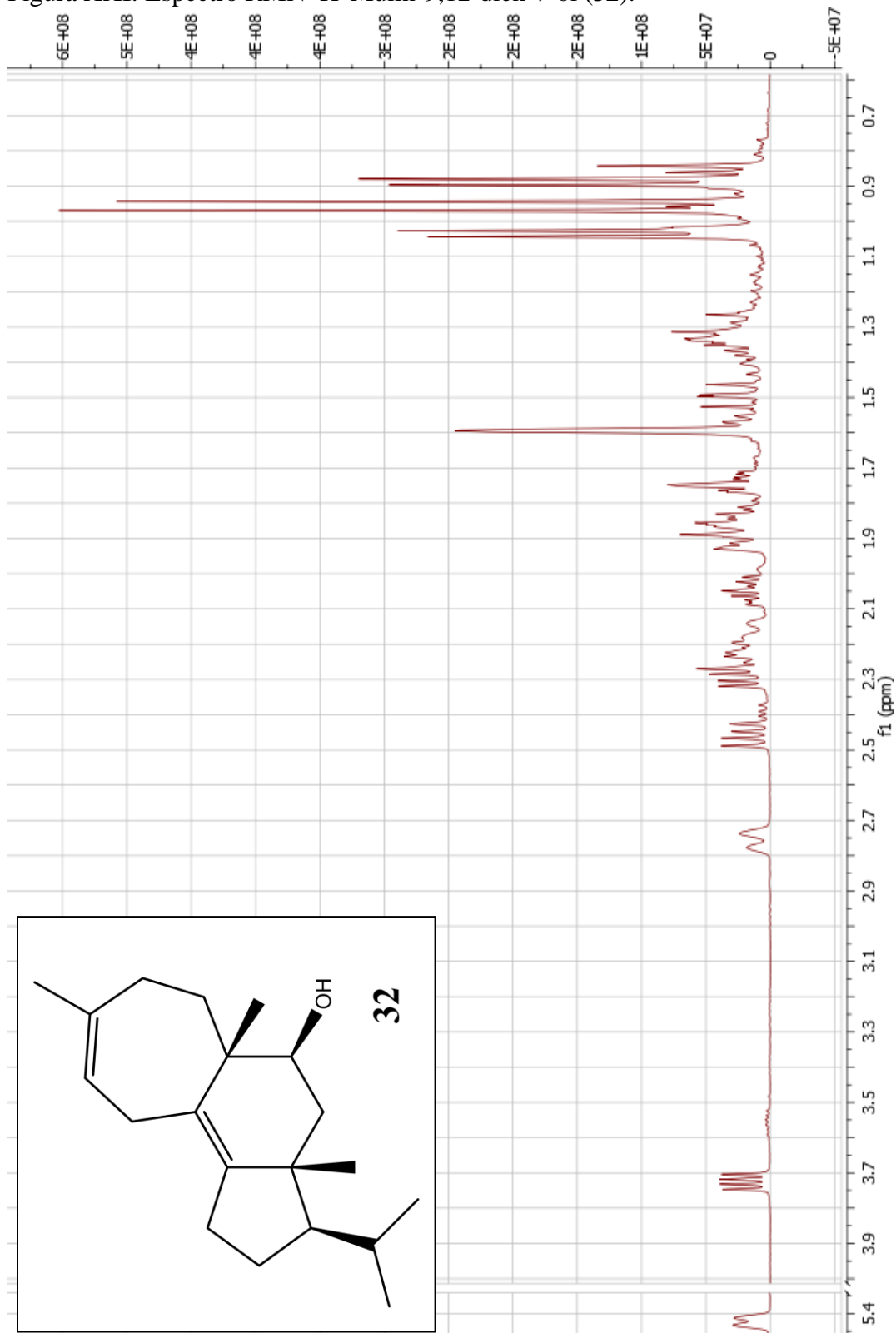
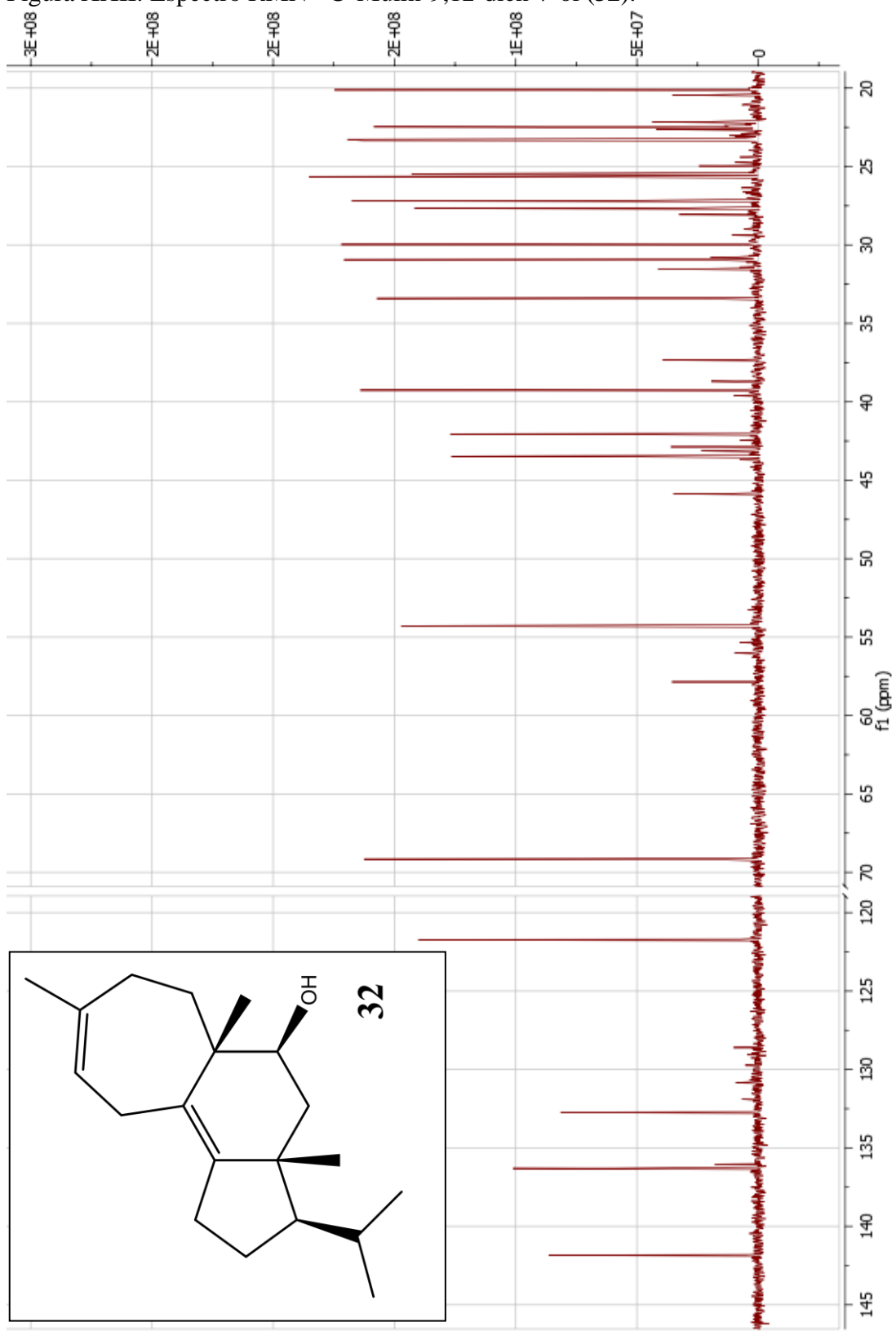


Figura XXII: Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  Mulin-9,12-dien-7-ol (**32**).



- Oxidación de ácido mulinólico (1) con  $\text{KMnO}_4$ .

Figura XXIII: Espectro RMN  $^1\text{H}$  Ácido 12-oxo-11,13- $\alpha,\alpha$ -dihidroximulin-20-oico (34).

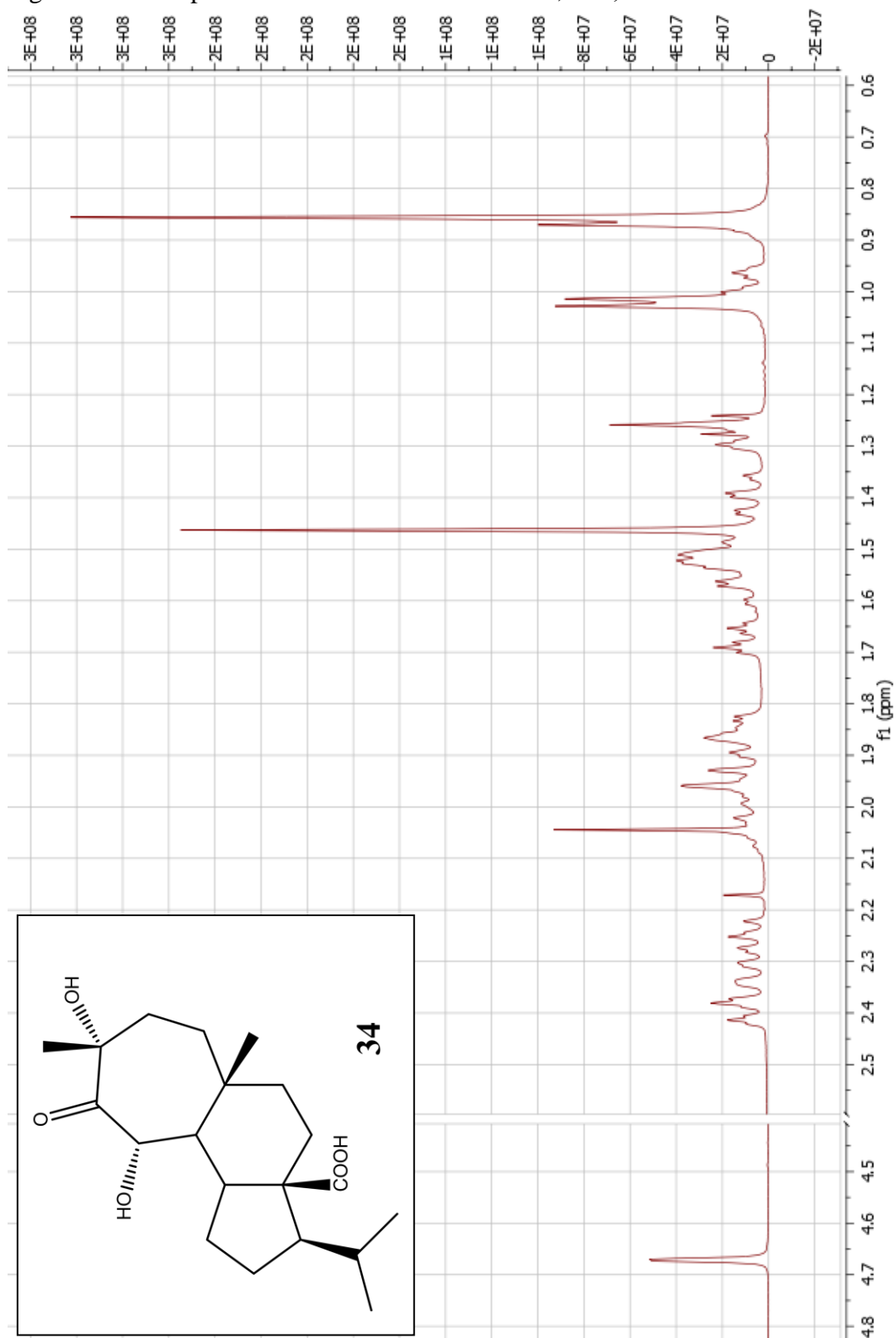
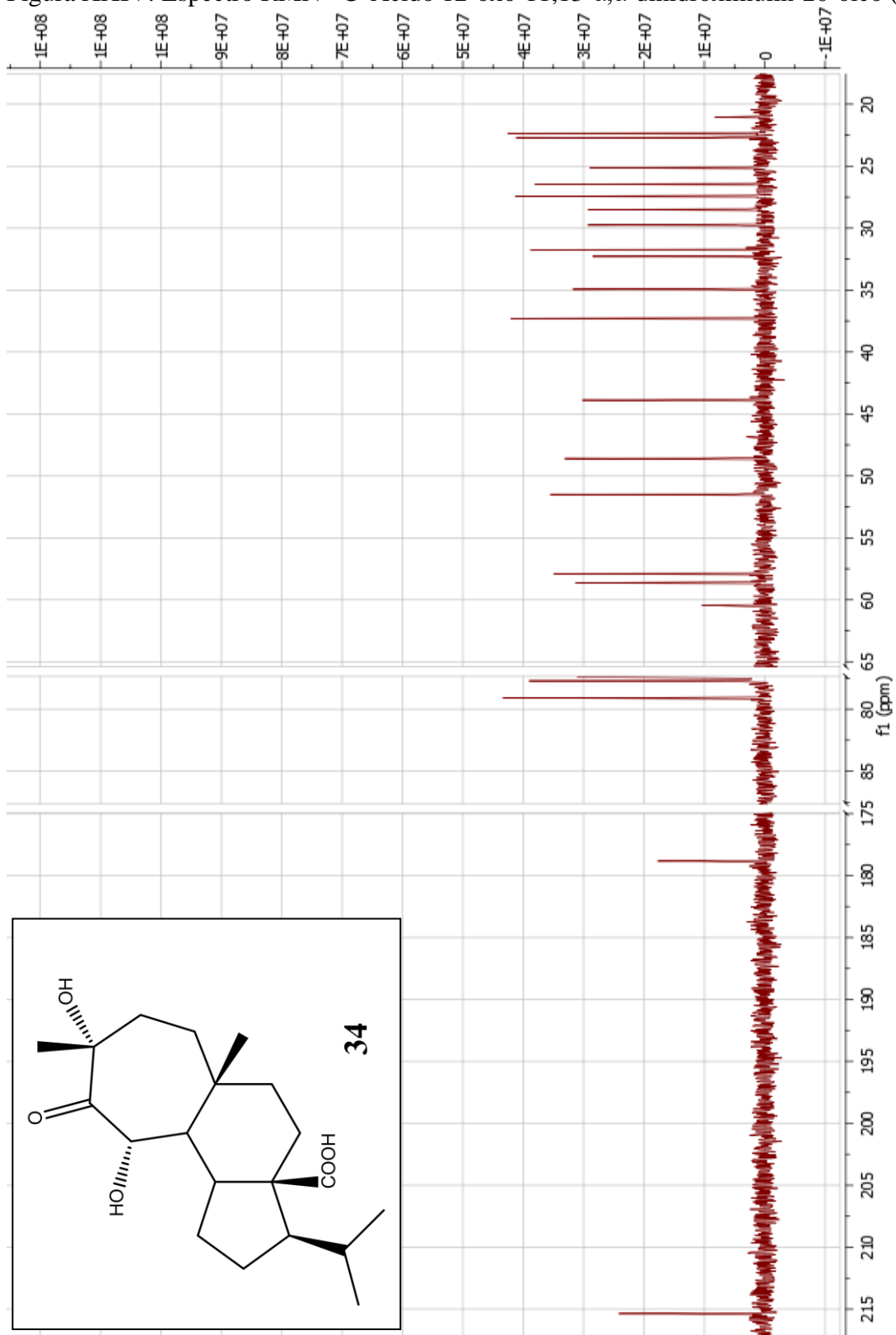


Figura XXIV: Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  Ácido 12-oxo-11,13- $\alpha,\alpha$ -dihidroximulin-20-oico (**34**).



- Oxidación de ácido mulinólico (1) con  $\text{KMnO}_4$ .

Figura XXV: Espectro RMN  $^1\text{H}$  Ácido 11-oxo-12,13- $\alpha,\alpha$ -dihidroximulin-20-oico (35).

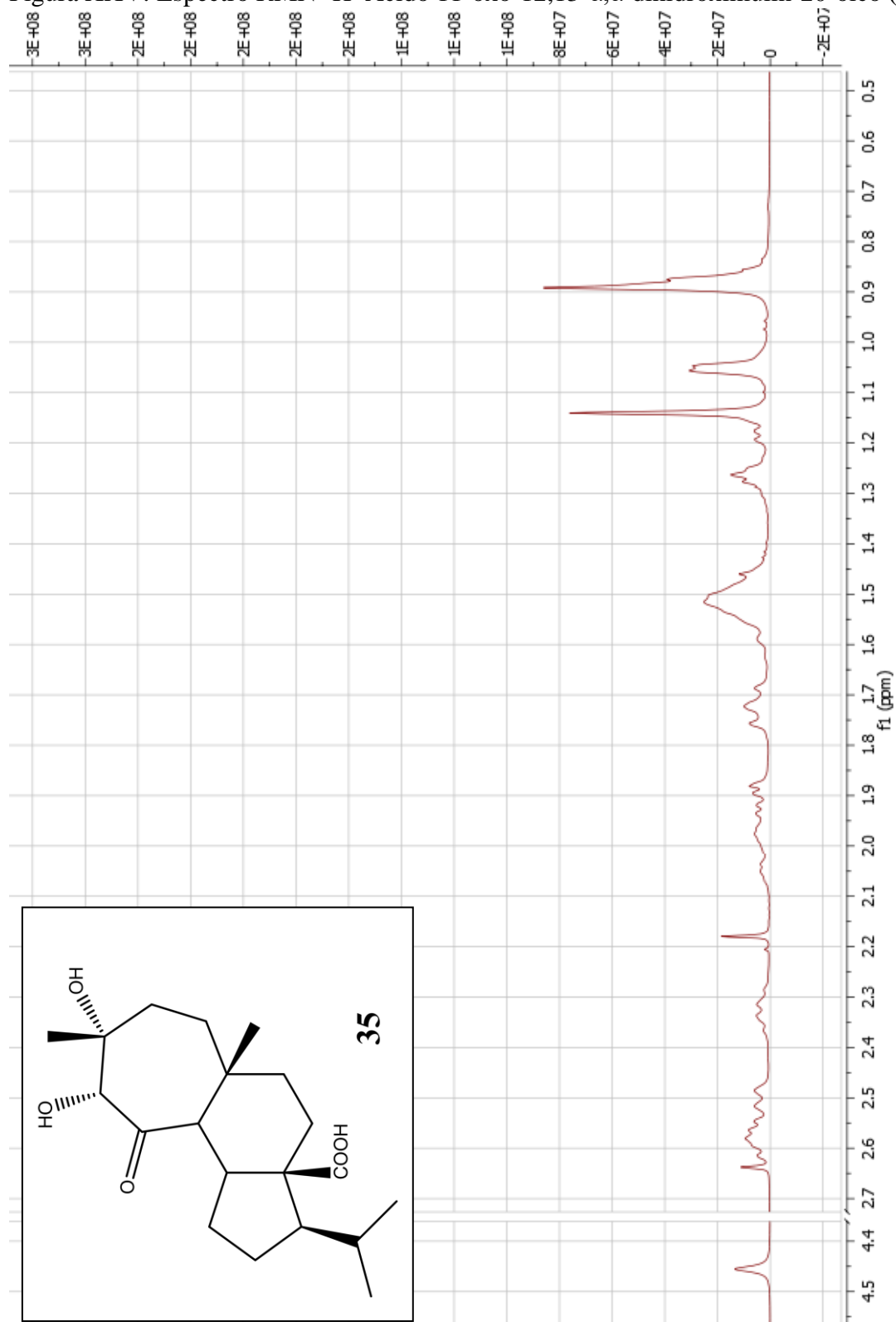
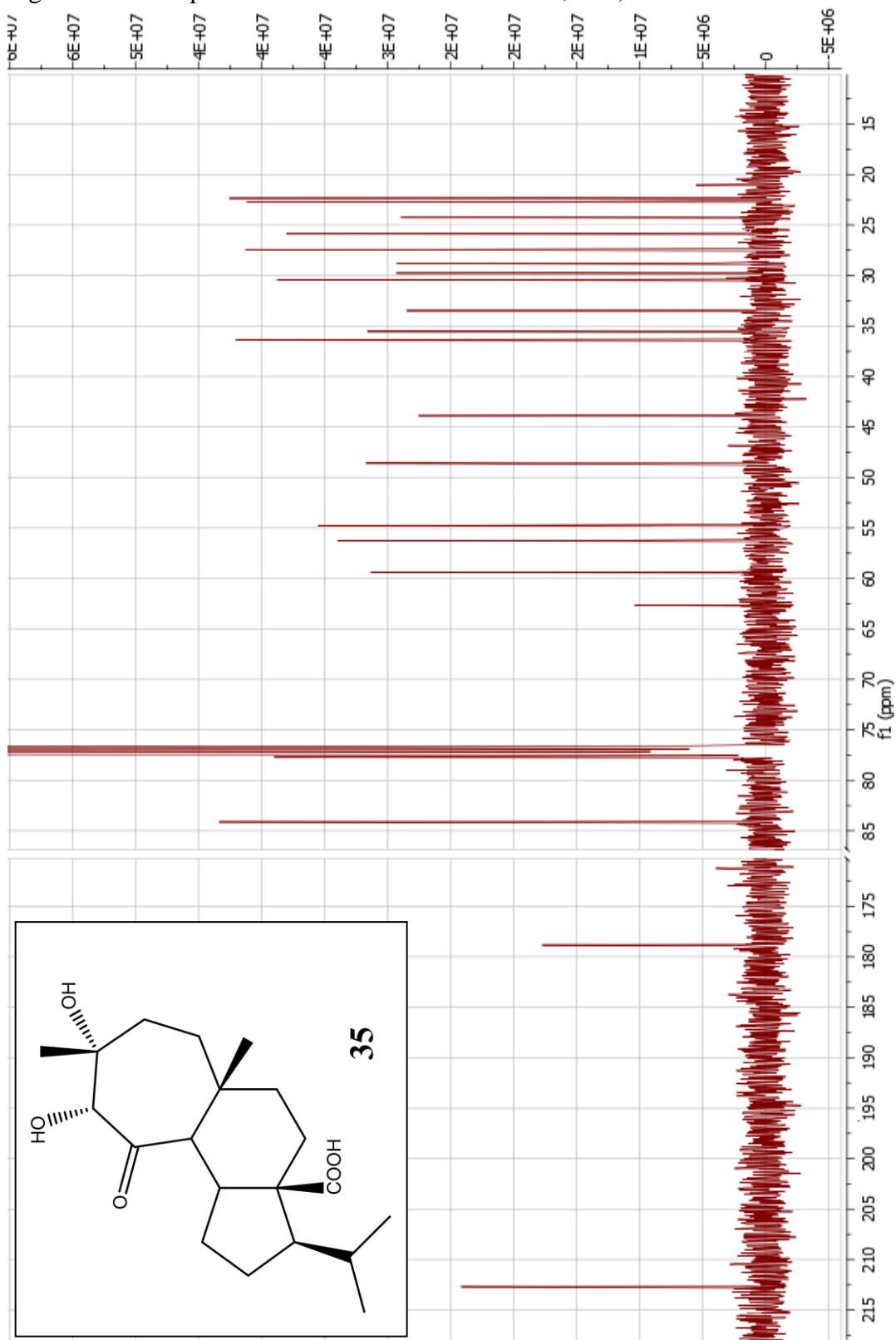




Figura XXVI: Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  Ácido 11-oxo-12,13- $\alpha,\alpha$ -dihidroximulin-20-oico (35).



- Oxidación de ácido mulinólico (1) con  $\text{KMnO}_4$ .

Figura XXVII: Espectro RMN  $^1\text{H}$  Ácido 11,12-dioxo-13- $\alpha$ -hidroximulin-20-oico (36).

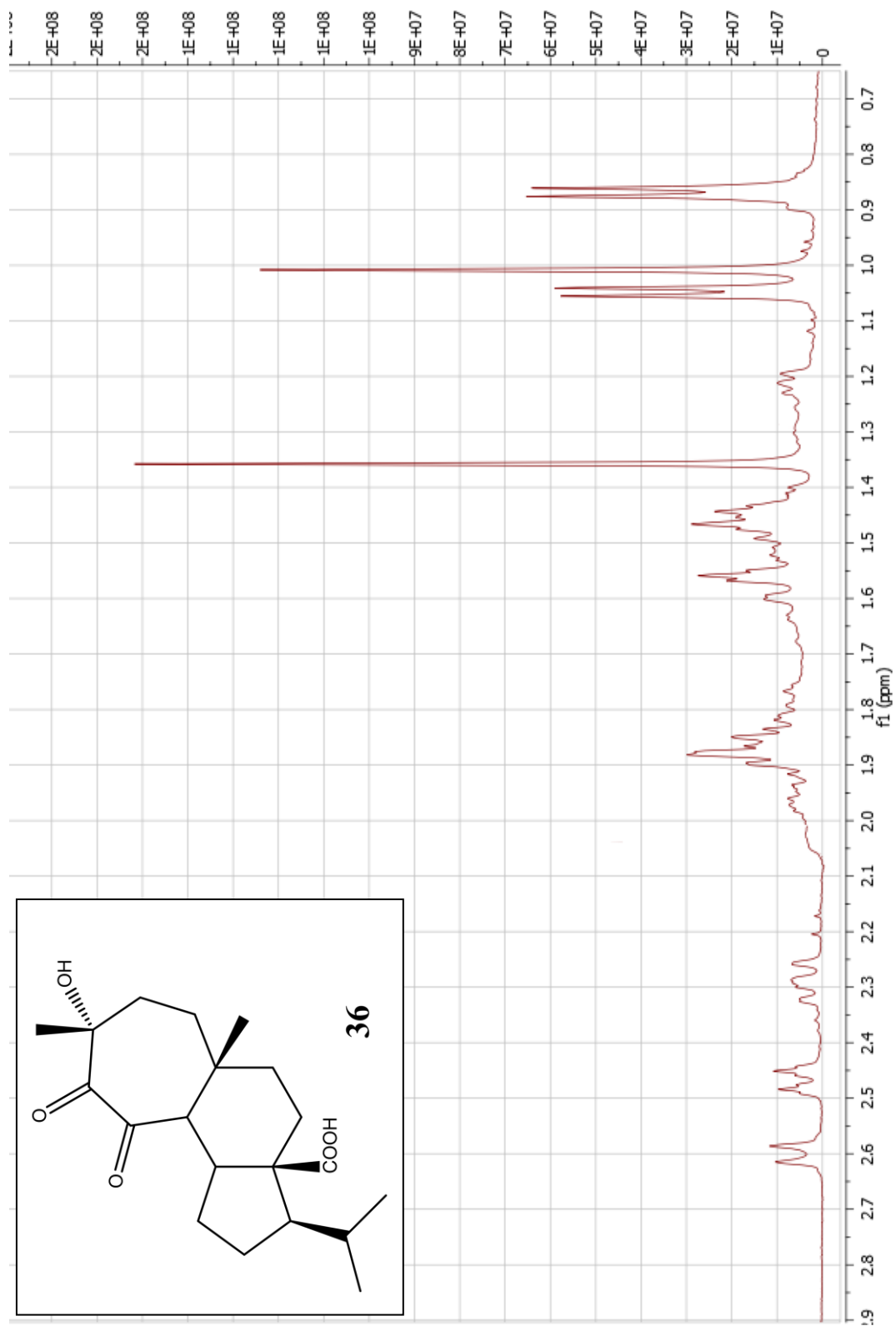
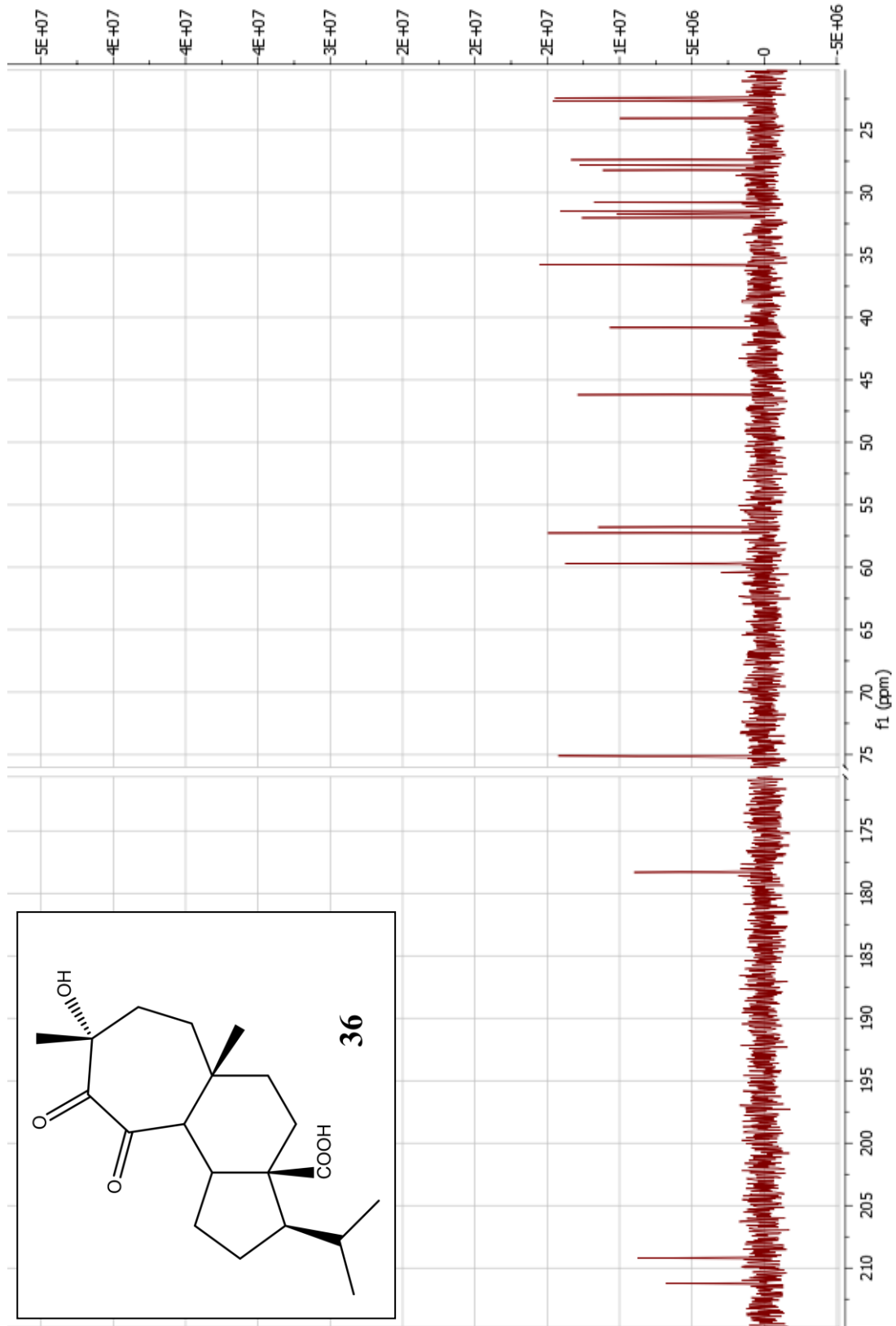
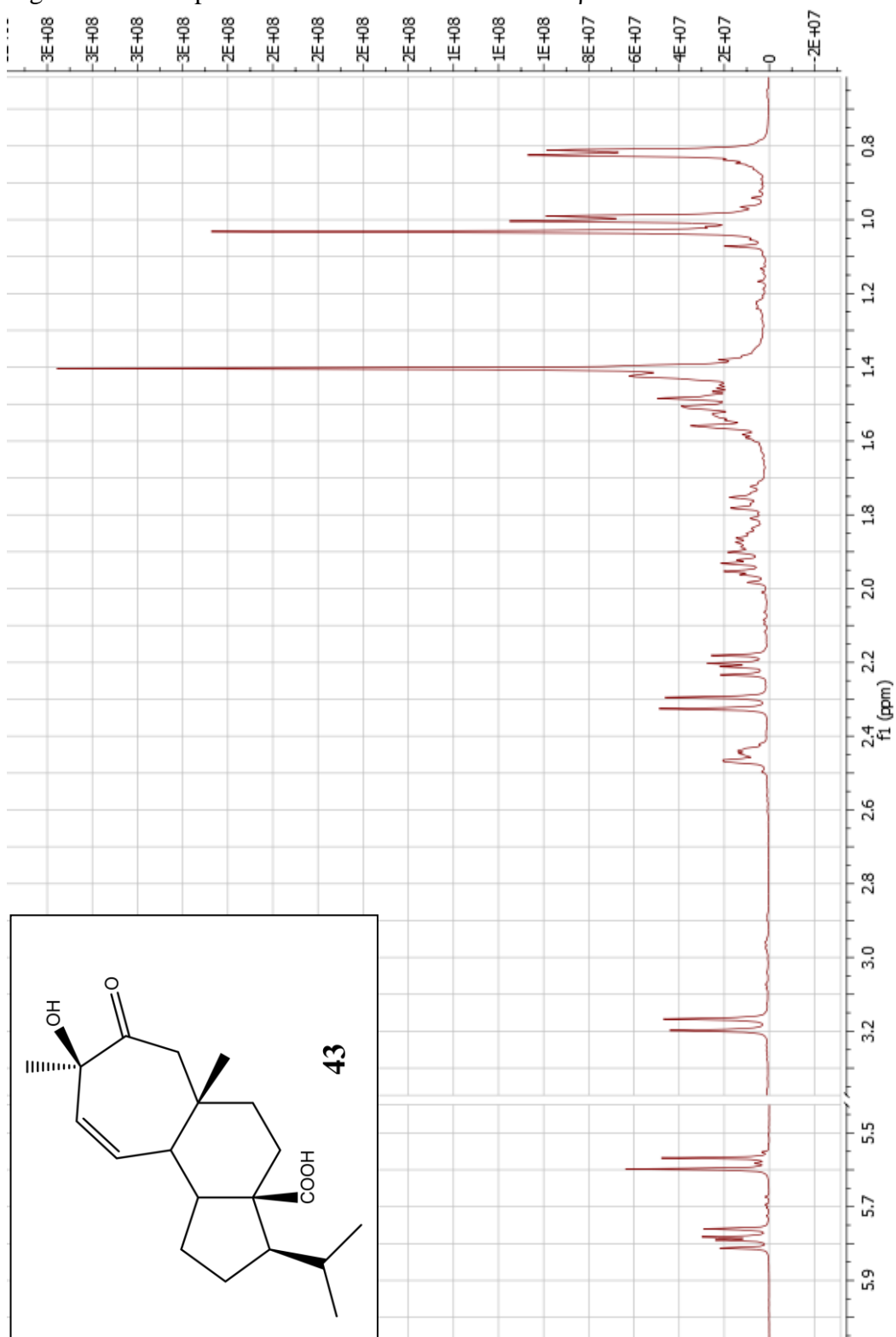


Figura XXVIII: Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  Ácido 11,12-dioxo-13- $\alpha$ -hidroximulin-20-oico (**36**).



- Oxidación de ácido mulin-11,13-dien-20-oico (4) con  $\text{KMnO}_4$ .

Figura XXIX: Espectro RMN  $^1\text{H}$  Ácido 14-oxo-13- $\beta$ -hidroximulin-11-en-20-oico (43).



- **Compuesto secundario oxidación de ácido mulin-11,13-dien-20-oico (4) con  $\text{KMnO}_4$ .**

Figura XXX: Espectro RMN  $^1\text{H}$  Ácido 11-epoxi-12,13-dihidroximulin-20-oico (44) (acetilado).

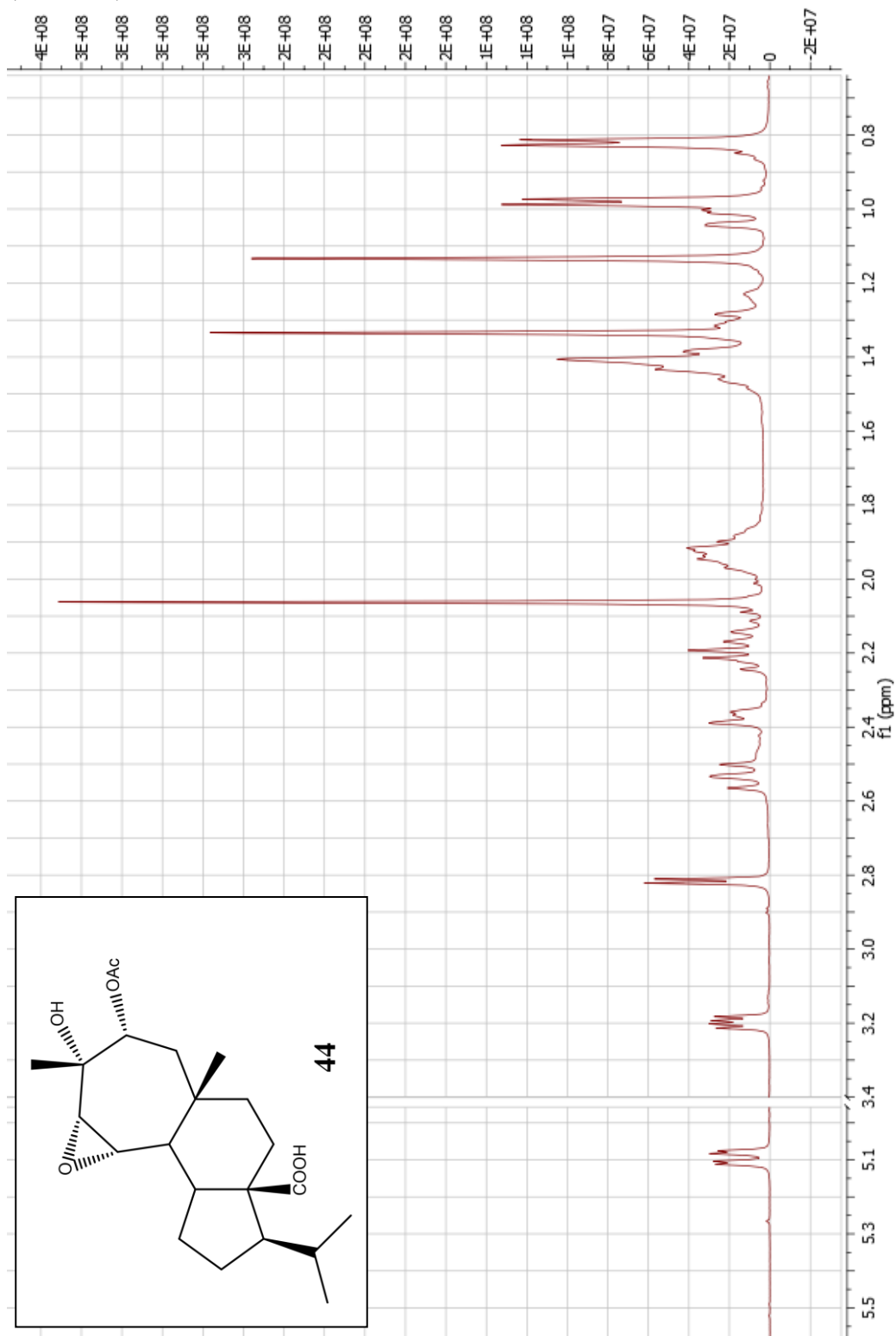
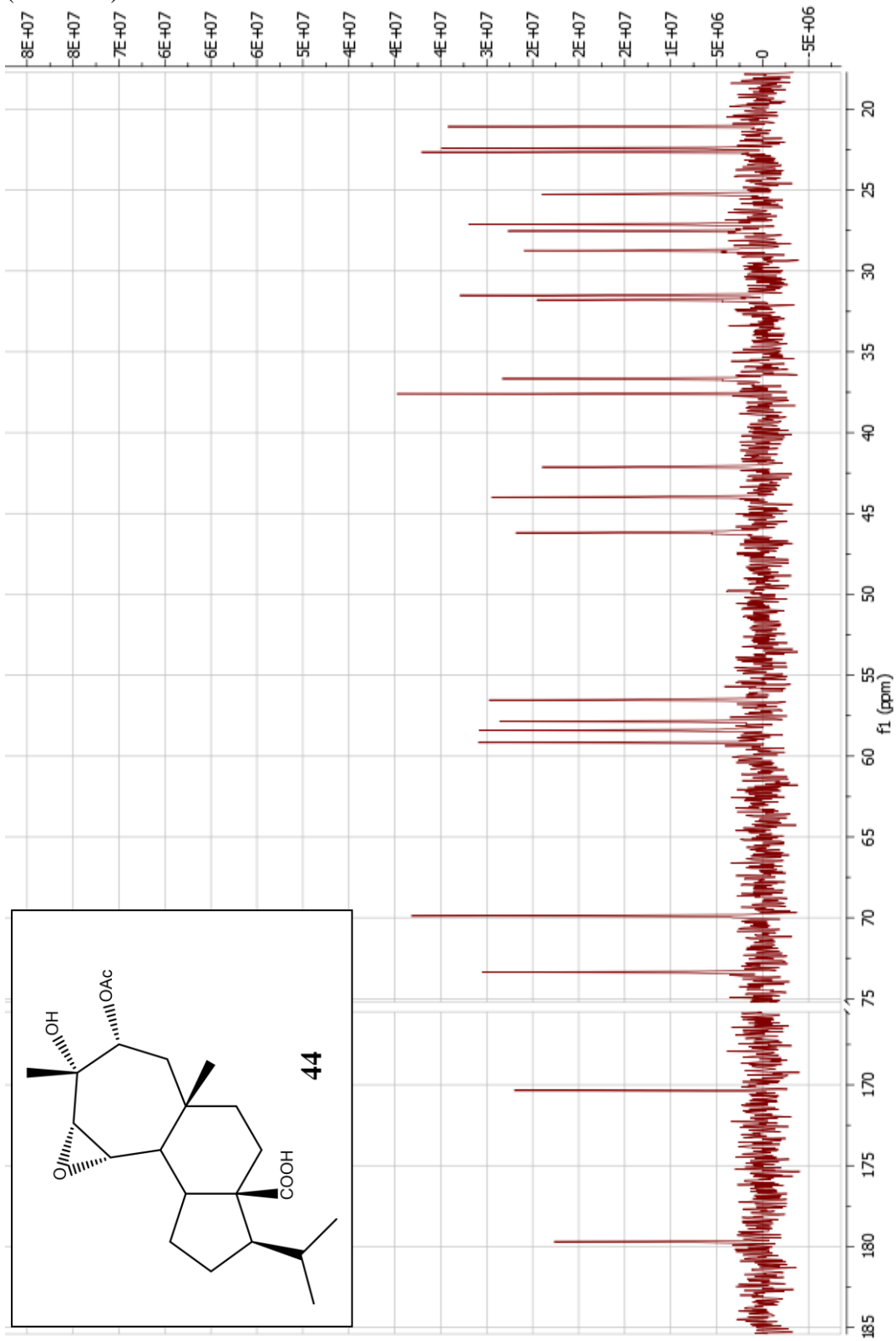


Figura XXXI: Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  Ácido 11-epoxi-12,13-dihidroximulin-20-oico (**44**) (acetilado).



- Oxidación de 7-acetoxi-mulin-9,12-dieno (31) con  $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ .

Figura XXXII: Espectro RMN  $^1\text{H}$  7-acetoxi-13-hidroximulin-9-eno (45).

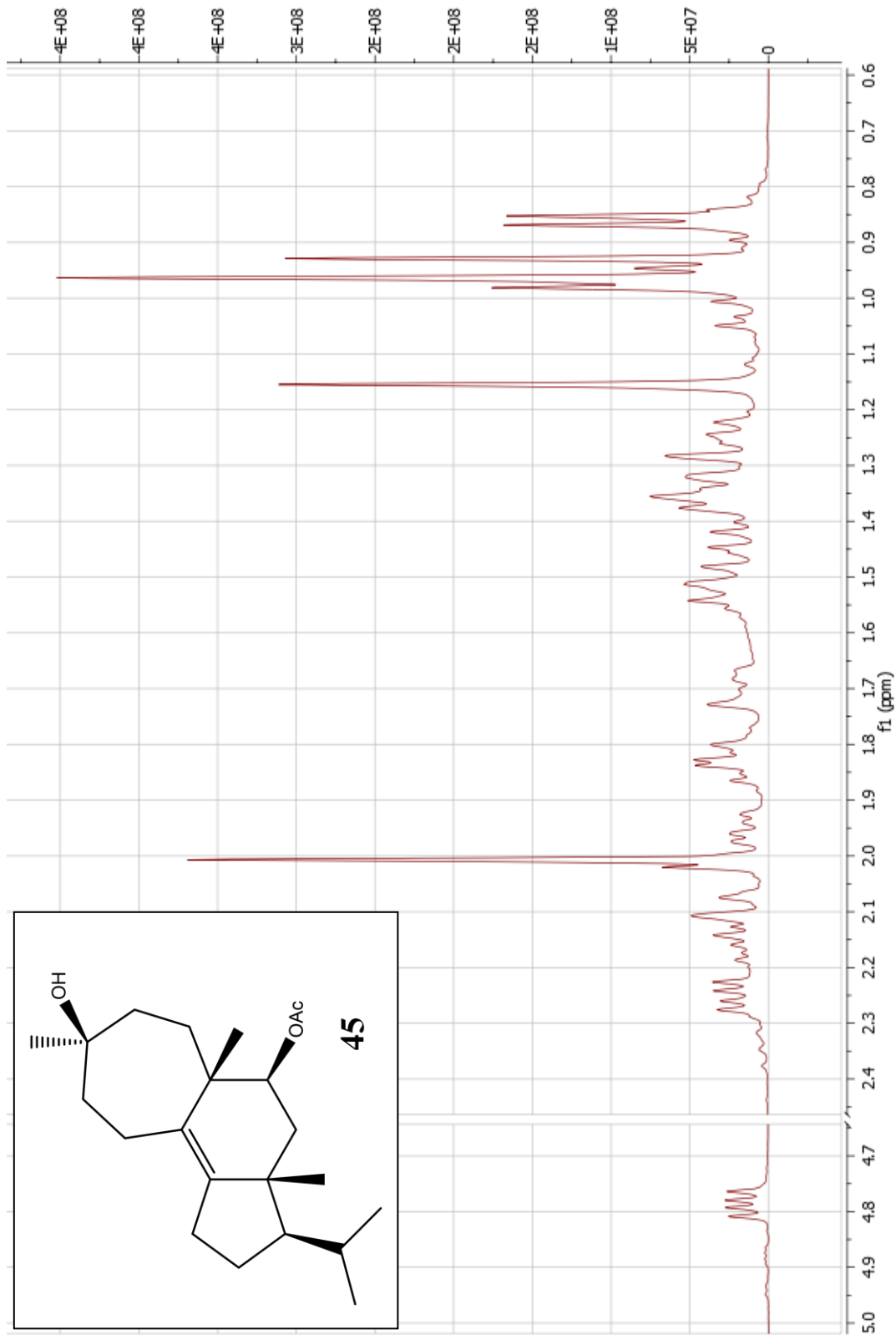
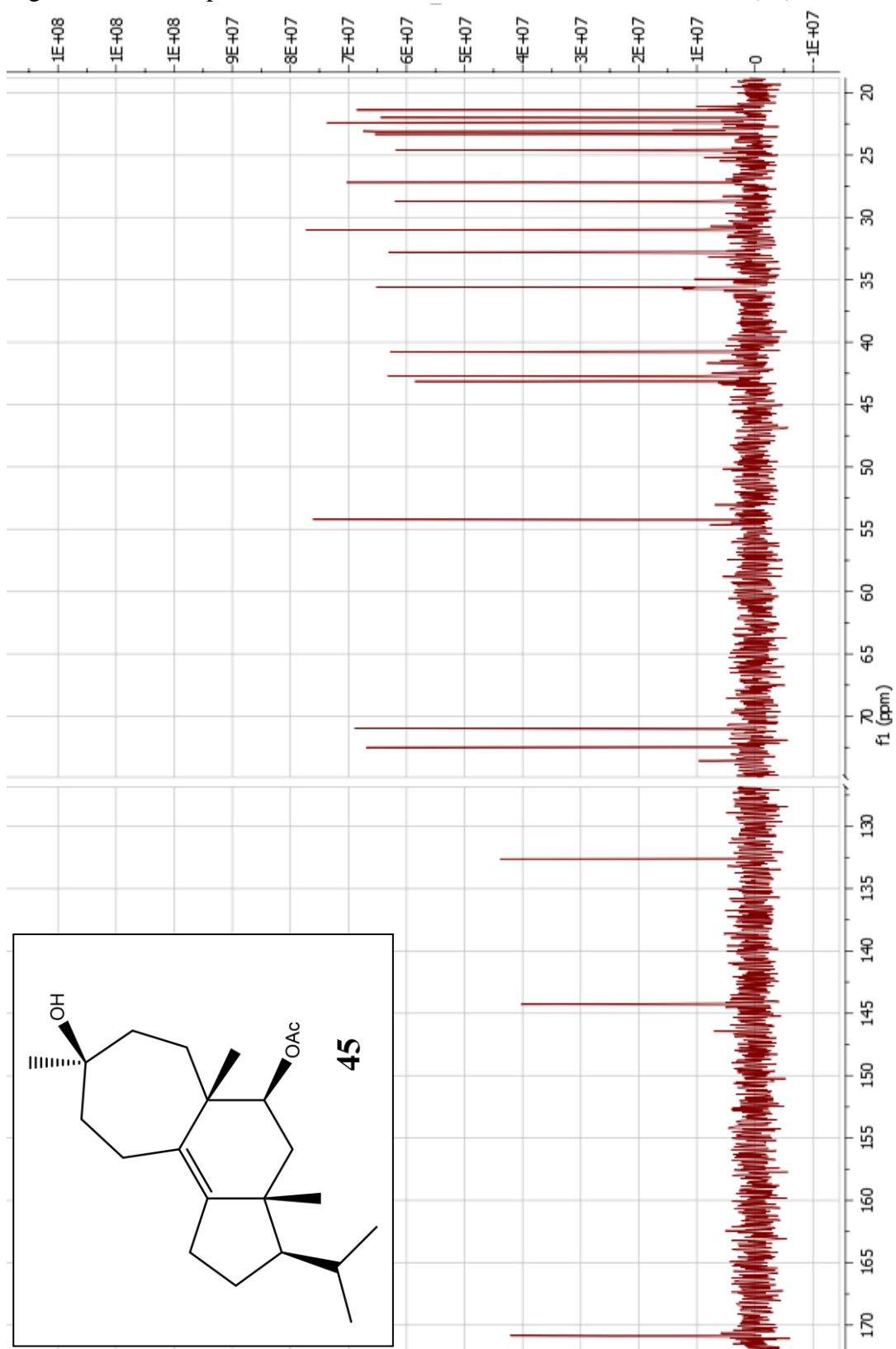


Figura XXXIII: Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  7-acetoxi-13-hidroximulin-9-eno (**45**).





- Reducción de ácido mulin-12-en-11,14-diona-20-oico (3) con  $\text{NaBH}_4$ .

Figura XXXIV: Espectro RMN  $^1\text{H}$  Ácido 11-oxo-14- $\alpha$ -hidroximulin-9-en-20-oico (46).

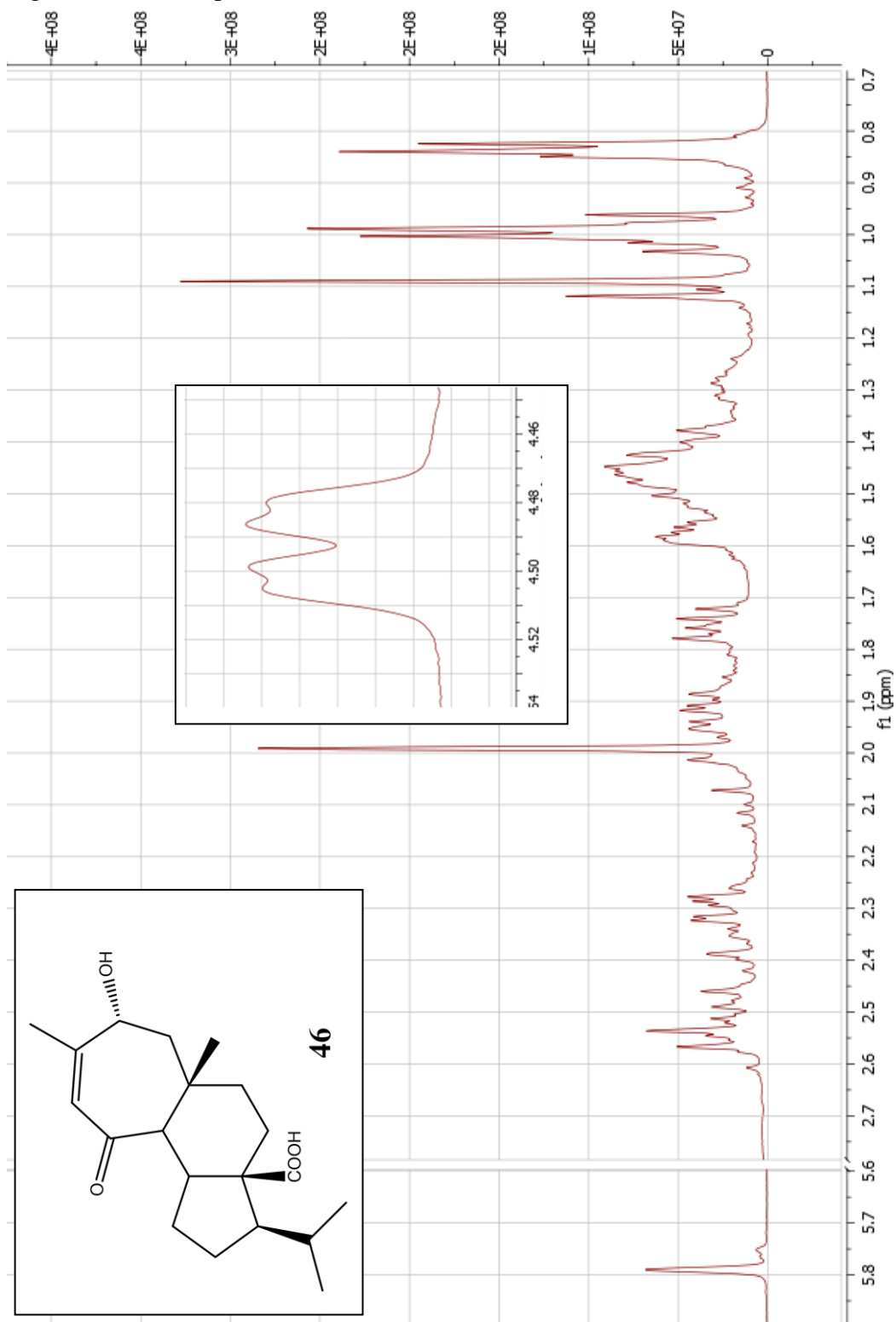
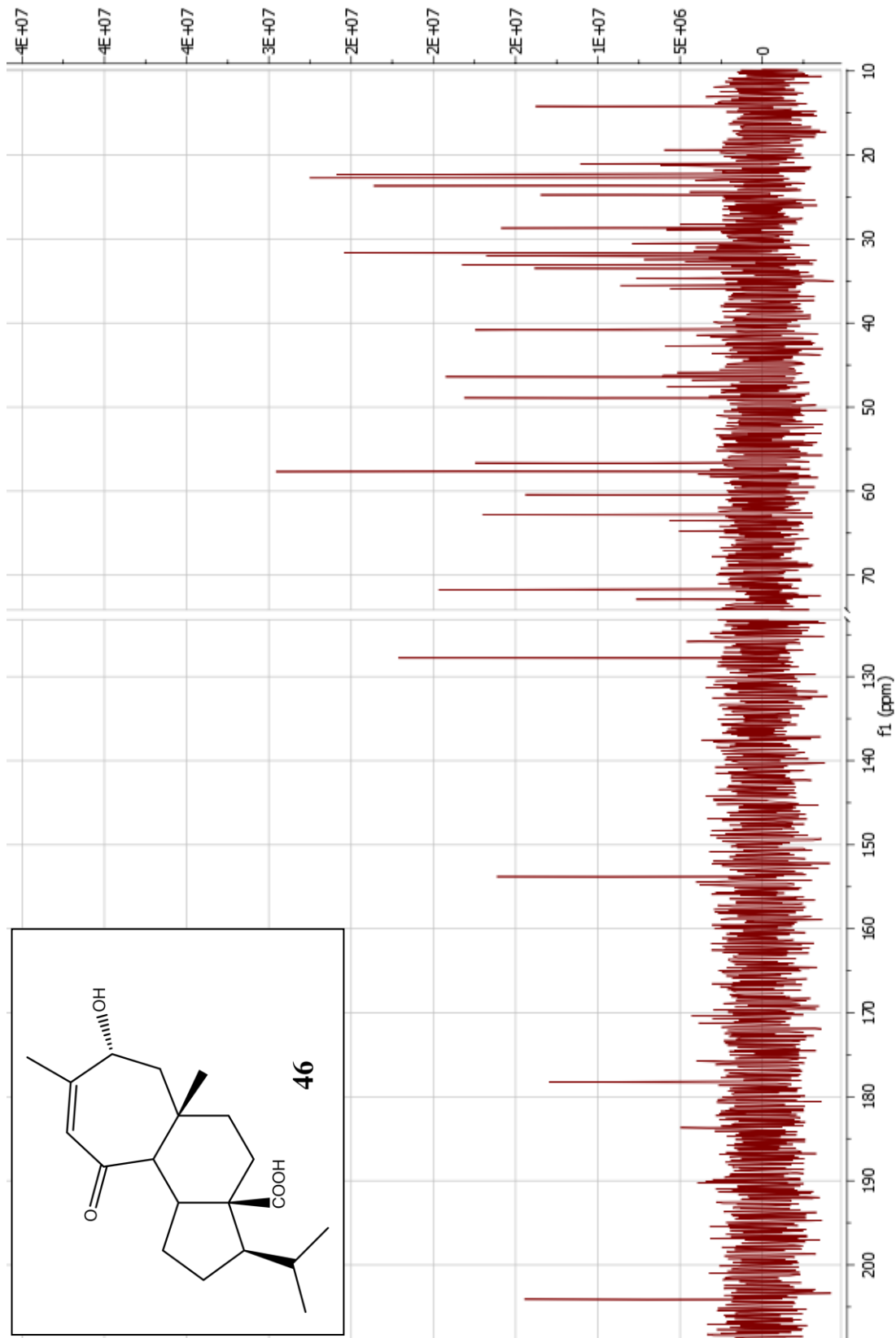


Figura XXXV: Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  Ácido 11-oxo-14- $\alpha$ -hidroximulin-9-en-20-oico (**46**).



- Reducción de ácido mulin-11,13-dien-20-oico (4) con  $\text{LiAlH}_4$ .

Figura XXXVI: Espectro RMN  $^1\text{H}$  Mulin-11,13-dien-20-ol (47).

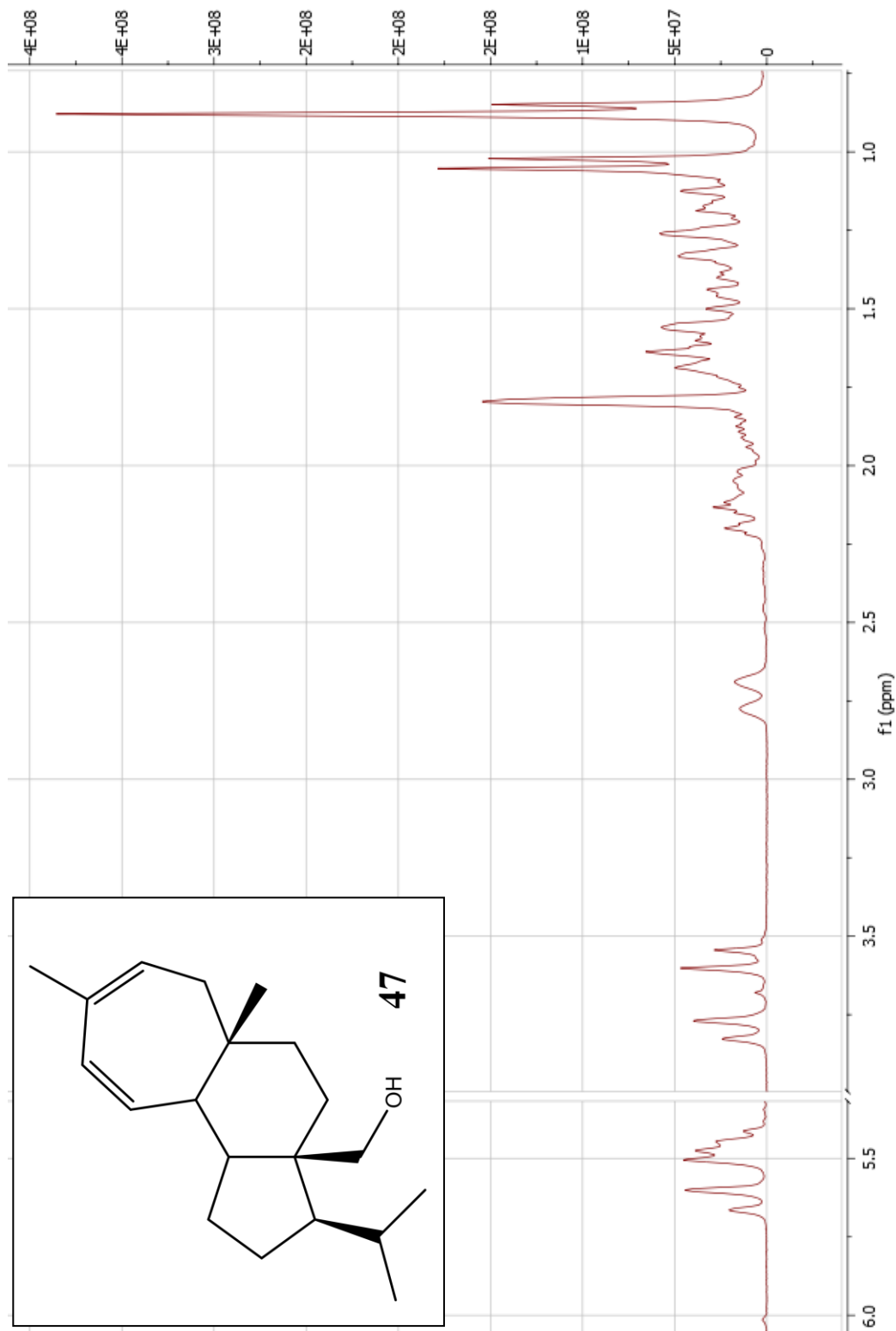


Figura XXXVII: Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  Mulin-11,13-dien-20-ol (**47**).

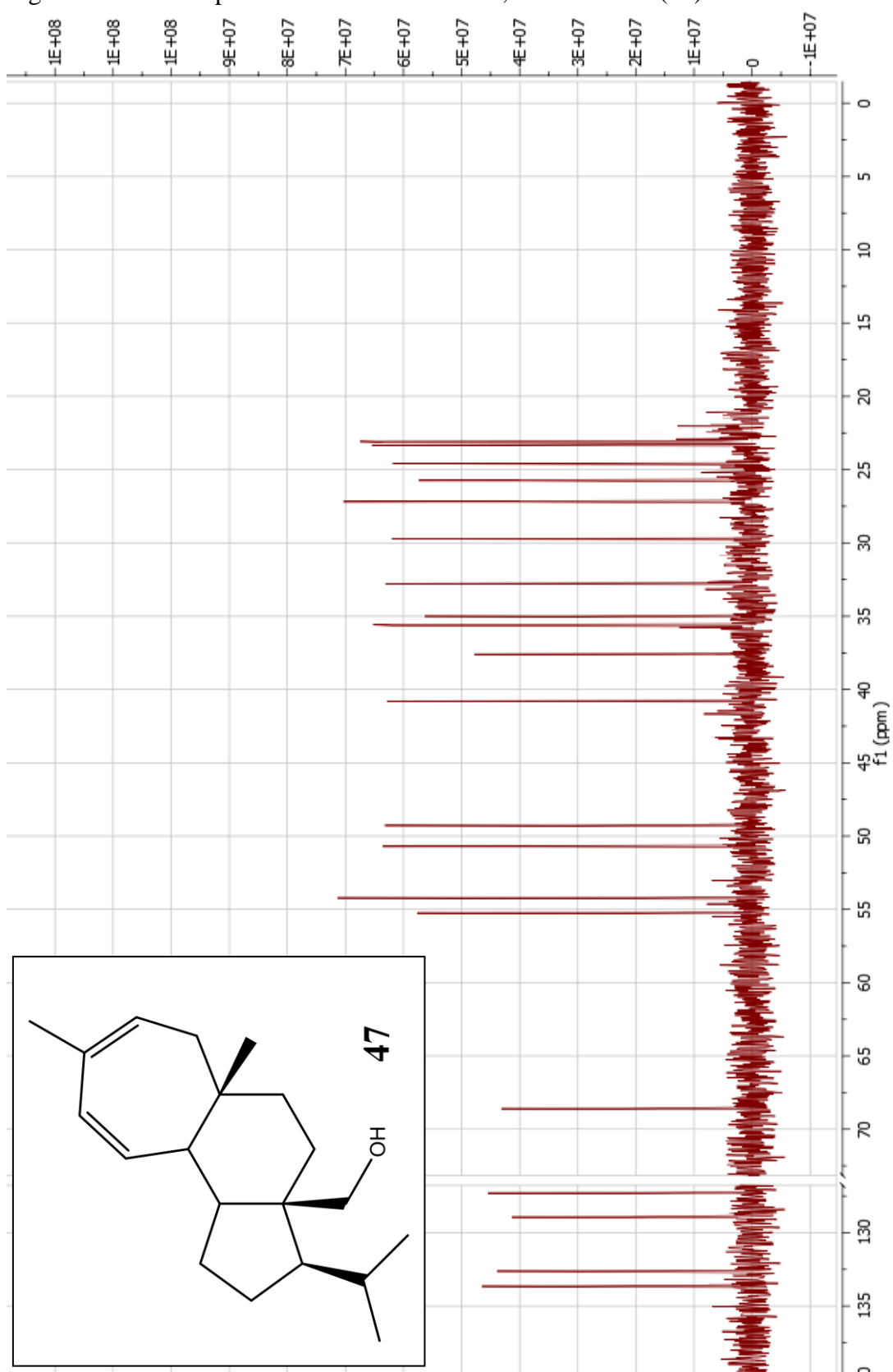
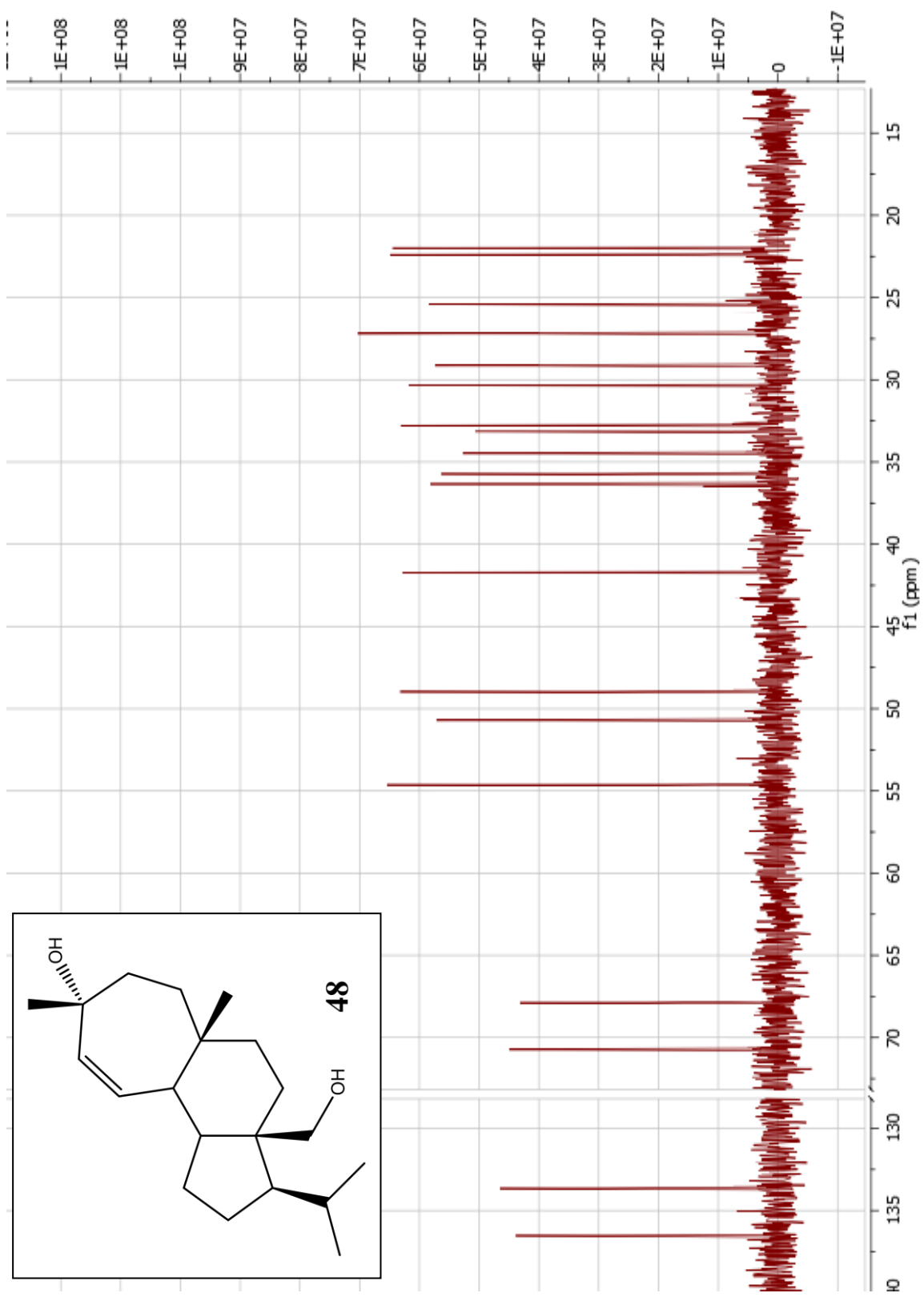




Figura XXXIX: Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  Mulin-11-en-13,20-diol (**48**).



- Reducción catalítica de ácido mulin-11,13-dien-20-oico (4) con  $H_2$ .

Figura XL: Espectro RMN  $^1H$  Ácido mulin-20-oico (49).

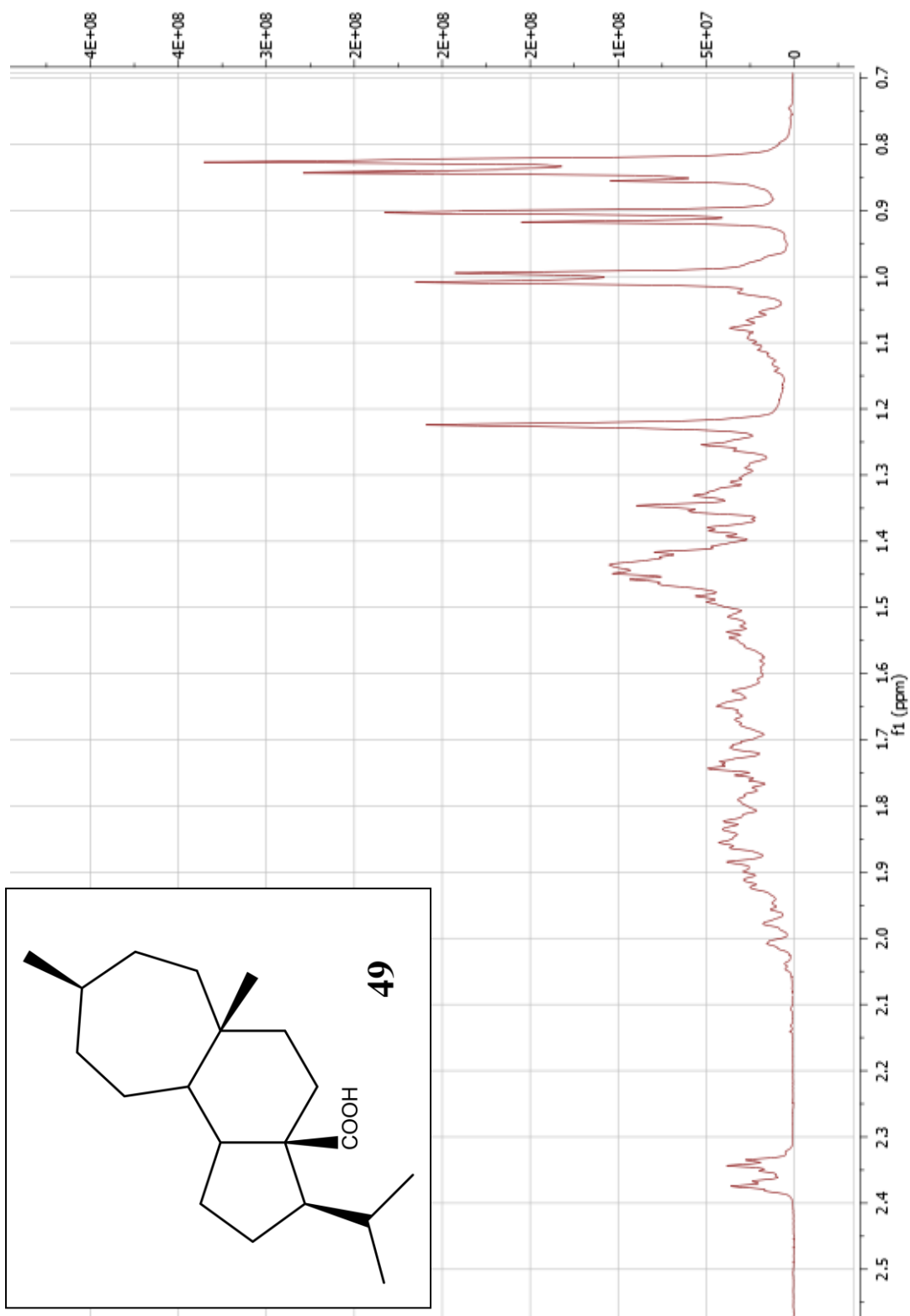


Figura XLI: Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  Ácido mulin-20-oico (**49**).

