MINISTERUL EDUCAȚIEI, CULTURII ȘI CERCETĂRII AL REPUBLICII MOLDOVA INSTITUTUL DE CHIMIE

Cu titlu de manuscris C.Z.U: 577./:547.597(043.2)

MORARESCU OLGA

TRANSFORMĂRI SINTETICE ALE ACIZILOR *ENT*-KAUR-16-EN-19-OIC ȘI *ENT*-TRACHILOBAN-19-OIC

143.04 - CHIMIE BIOORGANICĂ, CHIMIA COMPUȘILOR NATURALI ȘI FIZIOLOGIC ACTIVI

Teză de doctor în științe chimice

Conducător științific:

UNGUR Nicon,

doctor habilitat în științe chimice, conferențiar cercetător

Autor:

MORARESCU Olga

CHIŞINĂU, 2019

© Morarescu Olga, 2019

ADNOTARE	5
ANNOTATION	6
АННОТАЦИЯ	7
LISTA ABREVIERILOR	8
INTRODUCERE	9
1. DITERPENOIDELE <i>ENT</i> -KAURANICE ȘI <i>ENT</i> -TRACHILOBANICE.	
CARACTERISTICA GENERALĂ	14
1.1 Biosinteza diterpenoidelor ent-kauranice și ent-trachilobanice	14
1.2. Diterpenoidele <i>ent</i> -kauranice – caracteristica generală	16
1.2.1. Răspândirea în natură, diversitatea structurală și proprietățile biologice	16
1.2.2. Potențialul sintetic al diterpenoidelor <i>ent</i> -kauranice	24
1.3. Diterpenoidele <i>ent</i> -trachilobanice – caracteristica generală	32
1.3.1. Răspândirea în natură, diversitatea structurală și proprietățile biologice	32
1.3.2 Potențialul sintetic al diterpenoidelor <i>ent</i> -trachilobanice	
1.4 Concluzii la capitolul 1	40
2. TRANSFORMĂRI SINTETICE ALE ACIDULUI <i>ENT-</i> TRACHILOBAN-19	-OIC 42
2.1. Izolarea diterpenoidelor ent-trachilobanice și ent-kauranice din deșeurile	
de floarea-soarelui	42
2.1.1. Studiul procesul de extracție a deșeurilor uscate de floarea-soarelui	
cu diferiți solvenți	44
2.2. Izomerizarea superacidă a acidului ent-trachiloban-19-oic. Sinteza retro-bion	nimetică
a diterpenoidelor naturale ent-kauranice, ent-atisanice și ent-beieranice	45
2.3. Funcționalizarea acidului ent-trachiloban-19-oic cu diacetat de iodobenzen și	bromură
de litiu (PhI(OAc) ₂ /LiBr)	54
2.4. Transformări sintetice ale acidului ent-trachiloban-19-oic. Partea experimenta	ală59
2.5. Concluzii la capitolul 2	71

CUPRINS

3. TRANSFORMĂRILE SINTETICE ALE ACIDULUI ENT-KAUR-16-EN-19-OIC......72

3.1. Izomerizarea superacidă a acidului ent-kaur-16-en-19-oic. Sinteza retro-biomimetică
a diterpenoidelor naturale <i>ent</i> -kauranice, <i>ent</i> -atisanice și <i>ent</i> -beieranice73
3.2. Transformări oxidative ale acidului <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oic
3.2.1. Oxidarea alilică a acidului <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oic
3.2.2. Oxidarea treptată a acidului <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oic
3.2.3. Oxidarea acidului <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oic cu tetraoxid de osmiu
3.3. Funcționalizarea acidului ent-kaur-16-en-19-oic cu diacetat de iodobenzen – bromură
de litiu (PhI(OAc) ₂ – LiBr) și/sau periodat de sodiu – bromură de litiu (NaIO ₄ – LiBr)84
3.4. Transformările sintetice ale acidului ent-kaur-16-en-19-oic. Partea experimentală93
3.5. Concluzii la capitolul 3103
CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI104
BIBLIOGRAFIE
DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII121
CV-ul AUTORULUI

ADNOTARE

Morarescu Olga "Transformări sintetice ale acizilor *ent*-kaur-16-en-19-oic și *ent*-trachiloban-19-oic", teză de doctor în științe chimice, Chișinău, 2019. Teza este constituită din compartimentul introductiv și trei capitole, în care sunt prezentate studiul literaturii de specialitate și contribuțiile proprii, ce constau din rezultatele obținute experimental, concluzii generale și recomandări, bibliografie cu 231 titluri, 100 pagini text de bază, 5 tabele și 72 figuri. Rezultatele obținute sunt publicate în 13 lucrări științifice.

Cuvinte-cheie: diterpenoide, compuși biologic activi, acid *ent*-kaur-16-en-19-oic, acid *ent*-trachiloban-19-oic, izomerizare, *retro*-biomimetic, *ent*-atisani, oxidare.

Domeniul de studiu: 143.04 - Chimie bioorganică, chimia compușilor naturali și fiziologic activi

Scopul tezei constă în izolarea diterpenoidelor *ent*-kauranice și *ent*-trachilobanice biologic active din deșeurile provenite de la recoltarea florii-soarelui, și utilizarea acestora în calitate de materie primă pentru obținerea altor compuși diterpenici naturali bioactivi și a unor compuși sintetici cu potențial sporit de activitate biologică.

Obiective: identificarea solventului optim pentru extracția diterpenoidelor *ent*-kauranice și *ent*-trachilobanice din deșeurile de floarea-soarelui; studiul reacției de izomerizare superacidă a acizilor *ent*-kaur-16-en-19-oic și *ent*-trachiloban-19-oic; funcționalizare oxidativă a acidului *ent*-kaur-16-en-19-oic în pozițiile C-15, C-16, și C-17; polifuncționalizarea acizilor *ent*-kaur-16-en-19-oic și *ent*-trachiloban-19-oic și *ent*-trachiloban-19-oic; funcționalizarea acizilor *ent*-kaur-16-en-19-oic în pozițiile C-15, C-16, și C-17; polifuncționalizarea acizilor *ent*-kaur-16-en-19-oic și *ent*-trachiloban-19-oic cu sistemele Ph(OAc)₂-LiBr și/sau NaIO₄-LiBr.

Noutatea și originalitatea științifică, semnificația teoretică. Pentru prima dată a fost propusă o concepție nouă de sinteză *retro*-biomimetică. În baza acestui concept a fost realizată diversificarea structurală a compușilor și a fost demonstrată convergența scheletelor *ent*-trachilobanic și *ent*-kauranic în compuși biogenetic înrudiți. Pentru prima dată a fot realizată izomerizarea acidului *ent*-trachiloban-19-oic în prezența sistemului de $PhI(OAc)_2 - LiBr$, cu obținerea unor derivați noi înalt funcționalizați cu schelete *ent*-kauranic și *ent*-atisanic. De asemenea, a fost efectuată funcționalizarea oxidativă a acidului *ent*-kaur-16-en-19-oic natural în pozițiile C-15, C-16 și C-17, fiind sintetizați o serie de derivați *ent*-kauranoici naturali și compuși sintetici noi.

Problema științifică soluționată constă în identificarea unor căi noi și interesante de sinteză a unor compuși naturali diterpenici biologic activi cu pondere joasă în sursele naturale, cât și obținerea derivaților sintetici noi cu potențial sporit de activitate biologică.

Valoarea aplicativă a lucrării. Un aspect important al lucrării îl constituie folosirea deșeurilor de la procesarea florii-soarelui, în scopul obținerii substanțelor cu valoare practică pentru economia țării. De asemenea, funcționalizarea derivaților *ent*-kaurenoici și *ent*-trachilobanoic izolați din floarea-soarelui prezintă un interes practic deosebit, deoarece ne oferă o cale eficientă de acumulare a compușilor naturali bioactivi, în particular, a compușilor *ent*-atisanici.

Implementarea rezultatelor științifice. Metoda optimizată de extracție a deșeurilor provenite de la prelucrarea florii-soarelui este pe larg utilizat în cadrul laboratorului Chimia Compușilor Naturali și Biologic Activi, Institutul de Chimie. Acizilor diterpenici obținuți prin această metodă servesc ca materie primă în diverse studii de sinteză. De asemenea, materialul prezentat în teza curentă este parte componentă a unui ciclul de prelegeri, treapta de masterat la Facultatea de Chimie și Tehnologie Chimică a Universității de Stat din Moldova.

ANNOTATION

Morarescu Olga "Synthetic transformations of *ent*-kaur-16-en-19-oic and *ent*-trachyloban-19-oic acids" doctoral dissertation in Chemistry, Chişinău 2019. Dissertation consists of an introduction compartment, three chapters containing theoretical concepts and personal contributions including experimental results, general conclusions and recommendations, references with 231 titles, 100 pages of basic text, 5 tables and 72 figures. The obtained results were published in 13 scientific papers.

Keywords: diterpenoids, biologically active compounds, *ent*-kaur-16-en-19-oic acid, *ent*-trachiloban-19-oic acid, isomerization, *retro*-biomimetic, *ent*-atisanes, oxidation.

The field of study: 143.04 - Bioorganic chemistry, chemistry of natural and physiologically active compounds.

Aim of the study. The isolation of biologically active *ent*-kauranic and *ent*-trachylobanic diterpenoids from sunflower waste, and their subsequent utilization as precursors in the production of other natural bioactive diterpenoids and potentially bioactive synthetic compounds.

Objectives of the study: identifying the optimal solvent for the extraction of *ent*-trachylobanic and *ent*-kauranic diterpenoids from sunflower waste; study of the superacid isomerization reaction of *ent*-kaur-16-en-19-oic and *ent*-trachiloban-19-oic acids; oxidative functionalization of *ent*-kaur-16-en-19-oic acid at C-15, C-16, and C-17 positions; polyfunctionalization of *ent*-kaur-16-en-19-oic and *ent*-trachyloban-19-oic acids with $Ph(OAc)_2 - LiBr$ and/or NaIO₄-LiBr systems.

Originality and scientific novelty, theoretical value: For the first time, a new concept of *retro*-biomimetic synthesis was proposed. Based on this concept, the structural diversification of compounds was performed and the convergence of *ent*-trachilobanic and *ent*-kauranic skeletons into biogenetically related compounds was demonstrated. The isomerisation of *ent*-trachyloban-19-oic acid with Ph(OAc)₂-LiBr system was achieved as well, and the new highly functionalized *ent*-kaurane and *ent*-atisane derivatives were obtained. The oxidative functionalization of natural *ent*-kaur-16-en-19-oic acid at C-15, C-16 and C-17 positions was performed producing natural and new synthetic *ent*-kauranoic derivatives.

The solved scientific problem consists of the identification of the new interesting synthesis pathways towards some biologically active natural diterpenoid compounds with low content in natural sources, as well as obtaining the new synthetic derivatives with potential biological activity.

Applicative value of the work. Into the spirit of green chemistry, an important aspect of this work is the use of sunflower waste in order to obtain practically useful substances for the economy of country. Also, the functionalization of *ent*-kaurenoic and *ent*-rachilobanoic derivatives isolated from sunflower has a particular practical interest, as it represents an effective way of the accumulation of bioactive natural compounds, in particular, *ent*-antisane derivatives.

Implementation of scientific results. The optimized extraction process of sunflower waste is widely used in the laboratory of Chemistry of Natural and Biological Active Compounds, Institute of Chemistry. The diterpenic acids obtained by this method serve as a raw material in various synthetic routes. Also, the material presented in the current thesis is part of a teaching cycle, the master's degree level at the Faculty of Chemistry and Chemical Technology of Moldova State University.

АННОТАЦИЯ

Морареску Ольга, "Химические превращения энт-каур-16-ен-19-овой и энт-трахилобан-19-овой кислот", диссертация на соискание ученой степени доктора химических наук, Кишинев, 2019. Диссертация состоит из введения, трех глав, в которых представлены обзор исследований, имеющихся в литературе, и собственный вклад, основывающийся на экспериментально полученных результатах, общих выводов и рекомендаций, библиографии из 231 наименований, 100 страницы основного текста, 5 таблиц и 72 рисунков. Полученные результаты опубликованы в 13 научных работах.

Ключевые слова: дитерпеноиды, биологически активные соединения, *энт*-кауреновая кислота, *энт*-трахилобановая кислота, изомеризация, *ретро*-биомиметически, *энт*-атизаны, окисление.

Область исследования: 143.04 – Биоорганическая химия, химия природных и физиологически активных веществ.

Цель работы заключается в выделении биоактивных энт-кауреновых и энт-трахилобановых дитерпеноидов из отходов подсолнечника, и их использовании в качестве сырья для получения других природных биологически активных дитерпеноидов и ряда синтетических соединений потенциально обладающих биологической активности.

Задачи: определение лучшего растворителя для экстракции энт-трахилобановых и энт-кауреновых дитерпеноидов из отходов подсолнечника; исследование реакции суперкислотной изомеризации энт-каур-16-ен-19-овой и энт-трахилобан-19-овой кислот; окислительная функционализация энт-каур-16-ен-19-овой кислоты в положениях С-15, С-16 и С-17; полифункционализация энт-каур-16-ен-19-овой и энт-трахилобан-19-овой кислот в среде PhI(OAc)₂ - LiBr и или NaIO₄ - LiBr.

Научная новизна и оригинальность, теоретическая значимость. Впервые была предложена новая концепция ретро-биомиметического синтеза. На основе этой концепции была проведена структурная диверсификация соединений и продемонстрирована конвергенция энт-трахилобановых и энт-каурановых скелетов в биогенетически родственных соединениях. А также, впервые проведена изомеризация энтрахилобан-19-ой кислоты в присутствии Ph(OAc)₂-LiBr и были получены новые высокофункционализированные энт-каурановые и энт-атизановые производные. Кроме того, была реализована окислительная функционализация природной энт-каур-16-ен-19-овой кислоты в положениях C-15, C-16 и C-17, при этом были получены природные энт-каурановые производные и новые синтетические соединения.

Решенная научная задача заключается в выявлении новых интересных путей синтеза некоторых природных биологически активных дитерпеновых соединений с низким содержанием в природных источниках, а также получении новых потенциально биологически активных синтетических производных.

Практическая значимость работы. Важным аспектом работы является использование отходов подсолнечника с целью получения практически важных веществ для экономики страны. Кроме того, функционализация энт-трахилобановых и энт-кауреновых дитерпеноидов выделенных из подсолнечника представляет особый практический интерес, поскольку является эффективный способ накопления биоактивных природных соединений, в частности энт-атизановых производных.

Использование результатов исследований. Оптимизированный процесс экстракции отходов подсолнечника широко используется в лаборатории Химии Природных и Биологически Активных Соединений, Институт Химии. Также материал, представленный в данной работе, является частью цикла лекций, уровня магистратуры на Факультете Химии и Химических Технологий Молдавского Государственного Университета.

7

LISTA ABREVIERILOR

Ac	acetil	Me	metil
Ac ₂ O	anhidrida acetică	MeOH	alcool metilic
AcOH	acid acetic	NOESY	Nuclear Overhauser Effect
Ang	Angeloil		Spectroscopy
anh.	anhidru	OPP	grupă pirofosfosforică
<i>i-</i> Bu	<i>izo</i> -butil	OAc	grupă acetoxi
t-BuOH	<i>terț</i> -butanol	Palm	grupă palmoil
t-BuOK	<i>terț</i> -butilat de potasiu	PCC	cromilcromat de piridiniu
-CPP	copalil pirofosfat	PDC	dicromat de piridiniu
ent-CPP	ent-copalil pirofosfat	Ph	grupă fenil
colab.	colaboratori	PhI(OAc) ₂	diacetat de iodobenzen
COSY	Homonuclear Correlation	PPh ₃	trifenilfosfină
	Spectroscopy	ppm	părți per milion
<i>m</i> -CPBA	acid meta-clorperbenzoic	p.t.	punct de topire
CSS	cromatografie în strat subțire	Py	piridină
d	dublet	RMN	rezonanță magnetică nucleară
DIBAL	hidrură de diizobutilaluminiu	S	singlet
DMFA	dimetilformamidă	s l.	singlet larg
DMSO	dimetisulfoxid	t	triplet
eq.	echivalent	t.c.	temparatura camerei
EP	eter de petrol	THF	tetrahidrofuran
Et	etil	TMSCI	clorură de trimetilsilil
Et ₃ N	trietilamină	TMS ₂ NH	bis(trimetilsilil)amină
Et ₂ O	eter etilic	<i>p</i> -TsOH	acid para-toluensulfonic
EtOAc	acetat de etil	<i>i-</i> Val	<i>izo</i> -valerianil
EtOH	alcool etilic	Δ	reflux
ex.	exemplu	δ	deplasare (RMN)
GC-MS	Cromatografie cu gaze cuplată		
	cu detector de masă		
GGPP	geranilgeranil pirofosfat		
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond		
	Correlation		
HSQC	Heteronuclear Single Quantum		
-	Coherence		
IR	Spectoscopie în infraroșu		
IUPAC	International Union of Pure and		

Applied Chemistry

INTRODUCERE

Actualitatea și importanța problemei abordate

Terpenoidele reprezintă cea mai numeroasă și mai diversă clasă de substanțe chimice din multitudinea compușilor produși de plante. Derivații terpenici au funcții de bază, participând activ la creșterea, dezvoltarea și protecția plantei, dar totodată, majoritatea terpenoidelor participă și în interacțiuni chimice mai specifice. În mod tradițional, terpenoidele au fost folosite în industria alimentară, farmaceutică și cosmetică, în industria chimică.

Este bine cunoscută relația strânsă structură - activitate biologică specifică compușilor naturali. Astfel, modificarea terpenoidelor introducând diferite grupe farmacofore sau prin intervenții la nivel de schelet, influențează foarte puternic activitatea biologică a acestor compuși. Din acest motiv, transformarea chimică a substanțelor naturale relativ abundente este o direcție importantă și promițătoare a chimiei și constituie, în prezent, subiectul a numeroase investigații *teoretice* și *aplicative*, iar sinteza, izolarea și studiul acestora reprezintă o problemă de importanță *fundamentală* și *aplicativă* majoră.

Din gama vastă a compușilor terpenici, un interes deosebit îl prezintă diterpenoidele tetraciclice *ent*-kauranice și pentaciclice *ent*-trachilobanice, compuși ce posedă un spectru larg de activități biologice și pot servi ca precursori în sinteza terpenoidelor polifuncționale.

Varietatea structurală a diterpenoidelor *ent*-kauranice, cât și conținutul relativ înalt al unora în surse naturale accesibile, reprezintă o bază foarte atractivă pentru transformările chimice ulterioare. Compușii *ent*-kauranici joacă un rol important în biosinteza giberelinelor – importanți regulatori de creștere ai plantelor [1]. În ultimii ani, s-a observat un interes sporit față de diterpenoidele respective, datorită potențialului înalt de aplicare, în special în domeniul farmacologic. Studiul diferitor plante, utilizate în medicina populară, a demonstrat că activitatea antimicrobiană, antiinflamatoare, cardio-vasculară, diuretică, citotoxică și contra SIDA în mare parte se datorează prezenței diterpenoidelor *ent*-kauranice [2].

Compușii *ent*-trachilobanici sunt metaboliți secundari mai rar întâlniți în natură și bioactivitatea acestora este mai slab studiată, totuși, se disting reprezentanți cu proprietăți antibacteriene, antifungice, repelente [3] și chiar citotoxice [4, 5]. Totodată, terpenoidele *ent*-trachilobanice reprezintă precursori biomimetici valoroși în sinteza altor diterpenoide tetraciclice.

Diterpenoidele respective au fost izolate din diferite surse vegetale, în special, din plante originare din Asia și America de Sud. Totuși, un loc aparte îi revine florii-soarelui (*Helianthus annuus* L.), în care conținutul de *ent*-kaurani și *ent*-trachilobani este net superior altor surse

vegetale, un factor important fiind și accesibilitatea plantei [6]. Floarea-soarelui este cultivată la scară industrială, deșeurile ei reprezentând o sursă ieftină de materie primă, iar obținerea acestor compuși diterpenici nu afectează sub nici o formă producția de ulei. Astfel, reprezentații de bază ai acestei clase de compuși, acizii *ent*-trachiloban-19-oic, *ent*-kaur-16-en-19-oic și 15 α -angeloil*ent*-kaur-16-en-19-oic, compuși biologic activi, pot fi izolați în cantități sporite din deșeurile provenite de la recoltarea florii-soarelui [7].

Scopul tezei constă în izolarea diterpenoidelor *ent*-kauranice și *ent*-trachilobanice biologic active din deșeurile provenite de la recoltarea florii-soarelui, și utilizarea acestora în calitate de materie primă pentru obținerea altor compuși diterpenici naturali bioactivi și a unor compuși sintetici cu potențial sporit de activitate biologică.

Obiectivele generale urmărite în cadrul cercetărilor descrise în teză sunt următoarele:

- Identificarea solventului optim pentru extracția diterpenoidelor *ent*-kauranice și *ent*trachilobanice din deșeurile uscate provenite de la prelucrarea florii-soarelui;
- Studiul reacției de izomerizare superacidă a acizilor *ent*-kaur-16-en-19-oic și *ent*-trachiloban-19-oic, izolarea și caracterizarea compușilor obținuți prin metode fizico-chimice de analiză;
- Funcționalizare oxidativă a acidului *ent*-kaur-16-en-19-oic în centrele C-15, C-16, și C-17, izolarea și studiul derivaților *ent*-kauranici obținuți;
- Polifuncționalizarea acizilor *ent*-trachiloban-19-oic şi *ent*-kaur-16-en-19-oic în prezența sistemelor diacetat de iodobenzen bromură de litiu (PhI(OAc)₂ LiBr) şi / sau periodat de sodiu bromură de litiu (NaIO₄ LiBr).

Noutatea și originalitatea științifică, semnificația teoretică

Pentru prima dată a fost propusă o concepție nouă de sinteză a compușilor naturali - metoda *retro*-biomimetică. În baza acestui concept a fost realizată diversificarea structurală a compușilor și a fost demonstrată convergența scheletelor *ent*-trahilobanic și *ent*-kauranic în compuși biogenetic înrudiți – diterpenoidele *ent*-atisanice și *ent*-beieranice.

Funcționalizarea oxidativă reprezintă o cale de a modula proprietățile compușilor studiați prin diversificarea grupelor funcționale. Sistemele oxidative utilizate, inclusiv în baza iodului hipervalent, prezintă un potențial relevant în acest context, care poate fi explorat in continuare. Astfel, pentru prima dată s-a realizat funcționalizarea acidului *ent*-trachiloban-19-oic cu sistemul PhI(OAc)₂ – LiBr, obținându-se cu un randament considerabil un compus cu schelet regrupat *ent*-kauranic. A fost efectuată funcționalizare oxidativă a acidului *ent*-kaur-16-en-19-oic în pozițiile C-15, C-16, și C-17, cu obținerea analogilor *ent*-kauranici naturali biologic activi și a unor compuși sintetici. S-a realizat pentru prima dată funcționalizarea acidului *ent*-kaur-16-en-19-oic cu sistemele PhI(OAc)₂ - LiBr și / sau NaIO₄ - LiBr.

Problema științifică soluționată constă în identificarea unor căi noi și interesante de sinteză a unor compuși diterpenici naturali biologic activi cu pondere joasă în sursele naturale, cât și obținerea derivaților sintetici noi cu potențial sporit de activitate biologică.

Valoarea aplicativă a lucrării. Un aspect important al lucrării îl constituie folosirea deșeurilor de la procesarea florii-soarelui, în scopul obținerii substanțelor cu valoare practică. În acest context, valoarea aplicativă a lucrării este de o relevanță economică și socială deosebită, mai ales la nivel local. Astfel a fost elaborată o metodă eficientă și sigură de extracție cu etanol a deșeurilor provenite de la recoltarea florii-soarelui. Solventul propus a demonstrat calități extractive înalte, fiind avantajos din punct de vedere financiar și al aplicabilității. De asemenea, funcționalizarea derivaților *ent*-kaurenoici și *ent*-trachilobanoic prezintă un interes practic deosebit, deoarece ne oferă o cale eficace de acumulare a compușilor naturali bioactivi, în particular, a compușilor *ent*-atisanici.

Baza metodologică a cercetărilor științifice. Pentru realizarea obiectivelor de mai sus au fost utilizate metodele bine cunoscute ale chimiei organice fine și metode fizico-chimice moderne de analiză. Determinarea: punctului de topire – aparatul Boetius; unghiului de rotație specifică – polarimetrul JASCO-DIP-370; analiza elementală – Vario EL III. Înregistrarea: spectrelor în infraroșu (IR) – spectrofotometru Spectrum-100 FT-IR Perkin Elmer; spectrelor de rezonanță magnetică nucleară (RMN) – Bruker Avance DRX-400 (400.13 și 100.61 MHz; CHCl₃; standard intern δ (H) – 7.26 și δ (C) – 77.0; *J* -Hz.); Cromatografie pe coloană (CC) – silicagel Merck 60 (70 - 230 mesh, ASTM); cromatografie în strat subțire (CSS) – plăci Merck 60; gaz-cromatografie cuplată cu detector de masă (GC-MS) – cromatograf Agilent-5975C, MS detector, coloană capilară (30 m / 0,25 mm), spectrometrie de masă (EI-MS) – AEI MS-902, tensiune de ionizare 70 eV.

Rezultate științifice principale înaintate spre susținere:

 Elaborarea unei metode eficiente de izolare a acizilor *ent*-kaur-16-en-19-oic, *ent*-trachiloban-19-oic şi 15α-angeloil-*ent*-kaur-16-en-19-oic, din deşeurile provenite de la recoltarea florii-soarelui (*Helianthus annuus* L.) şi identificarea solventului de extracție optim.

- Sinteza *retro*-biomimetică a diterpenoidelor naturale cu schelet *ent*-kauranic, *ent*-atisanic și *ent*-beieranic, componente bioactive ale plantelor, pornind de la acizii *ent*-kaur-16-en-19-oic și *ent*-trachiloban-19-oic accesibili.
- Polifuncționalizarea acidului *ent*-trachiloban-19-oic în prezența PhI(OAc)₂ şi LiBr, cu obținerea compuşilor noi, cu schelete regrupate *ent*-kauranic şi *ent*-atisanic, funcționalizați în centre greu accesibile.
- Funcționalizarea oxidativă a acidului *ent*-kaur-16-en-19-oic în pozițiile C-15, C-16, și C-17, cu obținerea derivaților *ent*-kauranici naturali și sintetici cu potențial sporit de bioactivitate.
- Polifuncționalizarea acidului *ent*-kaur-16-en-19-oic în prezență de PhI(OAc)₂ LiBr şi NaIO₄ – LiBr, cu obținerea compuşilor *ent*-kauranici noi cu potențial sporit de activitate biologică.

Implementarea rezultatelor științifice. Procesul optimizat de extracție a deșeurilor provenite de la prelucrarea florii-soarelui este pe larg utilizat în cadrul laboratorului *Chimia Compușilor Naturali și Biologic Activi*, Institutul de Chimie. Acizii diterpenici obținuți prin această metodă servesc ca materie primă în diverse studii de sinteză. De asemenea, materialul prezentat în teza curentă este inclus în ciclul de prelegeri "Sinteza dirijată a unor terpenoide cu activitate biologică", treapta de masterat la Facultatea de Chimie și Tehnologie Chimică a Universității de Stat din Moldova.

Aprobarea rezultatelor. Materialul inclus în lucrare a fost prezentat și discutat la diverse evenimente științifice naționale și internaționale: Simpozionul *"Advanced Science in Organic Chemistry*", Ucraina, Mishor: 21 – 25.06.2010; A XXXI-a Conferință Națională de Chimie, România, Căciulata – Călimănești: 6 – 8.10.2010; Conferința Internațională a Tinerilor Cercetători, ediția VIII-a, R. Moldova, Chișinău: 11.11.2010; Simpozion Național PRIOCHEM - ediția a VII-a. România, București: 27 – 28.10.2011; Conferința Internațională a Tinerilor Cercetători, ediția X-a, R. Moldova, Chișinău: 23.11.2012; The Internațională a Tinerilor Cercetători, ediția X-a, R. Moldova, Chișinău: 23.11.2012; The International Conference dedicated to the 55th anniversary of the Academy of Sciences of Moldova, Chișinău: 28 – 30.05.2014; The XVIII-th International Conference "*Physical Methods in Coordination and Supramolecular Chemistry*", R. Moldova, Chișinău: 8 – 9.10.2015.

Publicații la tema tezei. Rezultatele obținute constituie subiectul a 13 lucrări științifice: 5 articole, unul fiind publicat într-o revistă internațională cotată ISI, 8 comunicări la conferințe și simpozioane naționale și internaționale. Trei lucrări sunt semnate de un singur autor.

Sumarul compartimentelor tezei. Lucrarea este structurată în trei capitole principale, în care sunt prezentate datele din literatură și contribuțiile proprii, ce constau din rezultate obținute experimental, concluzii generale și recomandări.

În capitolul 1 "DITERPENOIDELE *ENT*-KAURANICE ȘI *ENT*-TRACHILOBANICE – CARACTERISTICA GENERALĂ" sunt discutate și evidențiate principalele direcții de cercetare ale chimiei diterpenoidelor *ent*-kauranice și *ent*-trachilobanice: izolarea, diversitatea compușilor naturali biologic activi și potențialul sintetic al diterpenoidelor *ent*-kauranice și *ent*-trachilobanice, punându-se accent pe acizii *ent*-kaur-16-en-19-oic și *ent*-trachiloban-19-oic.

În capitolul 2 "TRANSFORMĂRI SINTETICE ALE ACIDULUI *ENT*-TRACHILOBAN-19-OIC" sunt prezentate metoda de izolare a acizilor *ent*-trachiloban-19-oic, *ent*-kaur-16-en-19-oic și 15α -angeloil-*ent*-kaur-16-en-19-oic, din deșeurile de floarea-soarelui (*Helianthus annuus* L.), optimizarea condițiilor de extracție cu diferiți solvenți și izomerizarea acidului *ent*-trachiloban-19-oic în condiții superacide, cât și în prezența diacetatului de iodobenzen și a bromurei de litiu (PhI(OAc)₂–LiBr).

Capitolul 3 "TRANSFORMĂRILE SINTETICE ALE ACIDULUI *ENT*-KAUR-16-EN-19-OIC" cuprinde studiul reacției de izomerizare a acidului *ent*-kaur-16-en-19-oic, funcționalizarea oxidativă a acestuia în pozițiile C-15, C-16, C-17 și polifuncționalizarea acidului în prezenta sistemelor de reagenți PhI(OAc)₂ – LiBr și NaIO₄ – LiBr, cu obținerea unor derivați naturali și a derivaților sintetici noi.

Cuvinte-cheie: diterpenoide, compuși biologic activi, acid *ent*-kaur-16-en-19-oic, acid *ent*-trachiloban-19-oic, izomerizare, *retro*-biomimetic, *ent*-atisani, oxidare.

1. DITERPENOIDELE *ENT*-KAURANICE ȘI *ENT*-TRACHILOBANICE. CARACTERISTICA GENERALĂ

1.1 Biosinteza diterpenoidelor ent-kauranice și ent-trachilobanice

Transpoziția sau izomerizarea carbocationică mediată enzimatic reprezintă procesul cheie prin care *Natura* produce terpeni [8,9]. Astfel, în ciuda diversității structurale impunătoare, diterpenoidele au la baza același precursor biosintetic – izoprenoida geranilgeranil pirofosfat (GGPP) [10]. În prezent, sunt cunoscute trei căi care conduc la formarea fragmentelor izoprenil primare, însă predominant în natură, acest fenomen are loc prin intermediul acidului mevalonic. Etapele biosintezei GGPP-ului sunt prezentate în Figura 1.1.



Fig. 1.1. Biosinteza geranilgeranil pirofosfatului (GGPP).

Diterpenele ciclice rezultă în urma a două procese biosintetice distincte de ciclizare ale GGPP [11]. Primul tip de ciclizare are la bază comportamentul nucleofug al grupei pirofosforice (-OPP), generând un carbocation alilic, care e în stare să alchileze dubla legătură din cealaltă

extremă a lanțului GGPP. În majoritatea cazurilor, se obține un cation izopropilidenic terminal foarte reactiv, care la stabilizare, prin eliminarea protonului, duce la formarea de cembrene, iar ulterior, prin substituții nucleofile intramoleculare, conduce la diterpenioide policiclici.



Fig. 1.2. Biosinteza diterpenoidelor tetraciclice și pentaciclice.

A doua și cea mai importantă cale de ciclizare are loc în condiții de cataliză acidă (Figura 1.2) [11]. Dacă ne referim la biotransformările GGPP-ului ce conduc la formarea diterpenoidelor tetraciclice, procesul de ciclizarea este inițiat prin protonarea legăturii duble terminale (C-14 = C-15), formându-se doi intermediari biciclici de tipul dihidronaftalenei (Figura 1.2, CPP și *ent*-CPP). Astfel, rezultă două serii de enantiomeri, care se deosebesc între ei prin configurația atomilor de carbon din centrele C-5, C-9 și C-10. Din seria *"normală"* fac parte structuri în care joncțiunea inelelor A și B este identică cu cea a steroidelor, în timp ce, seria *"enatio" ("ent-")*, cuprinde structuri ce reprezintă imaginea în oglindă (Figura 1.2).

Biosinteza diterpenoidelor policiclice izomere *ent*-kauranice, *ent*-trachilobanice, alături de cele *ent*-beieranice și *ent*-atisanice este, de obicei, reprezentată conform schemei din Figura 1.2 (sau ceva similar), cu exemple concrete ce țin de seria *"ent-"*. Formarea carbocationului pimarenil (**A**) are loc în urma ruperii restului pirofosfat din cadrul *ent*-CPP-lui și ciclizarea ulterioară a acestuia, precedată de o serie de transpoziții. Cel mai des, carbocationului pimarenil (**A**) este folosit în calitate de intermediar la formarea unui carbocation secundar, cationul beieranil (**B**). Acesta este considerat a fi precursorul *ent*-beierenului și fereastra spre obținerea *ent*-kauranilor, *ent*-trachilobanilor și *ent*-atisanilor. Migrarea unei grupe alchil în **B** (C-12 care migrează din C-16 spre C-13), conduce la cationul kauranil (**C**), precursorul *ent*-kaurenului. Pe când, migrarea 1,3-H în același carbocation **B**, generează cationul secundar **D**, care printr-o migrare ulterioară a grupei alchil (C-13 migrează din C-16 spre C-12) formează cationul **E**, precursorul *ent*-atisenului. Paralel, o deprotonare a carbocationului **D**, urmată de închiderea ciclului, duce la *ent*-trachiloban [12].

1.2. Diterpenoidele ent-kauranice – caracteristica generală

Natura ne pune la dispoziție o serie vastă de diterpenoide kauranice, totuși, cei mai răspândiți sunt cei din seria *"enatio*", diterpenoidele *ent*-kauranice. Spre exemplu, majoritatea plantelor superioare conțin unul sau mai mulți acizi giberelinici, importanți regulatori de creștere, a căror precursori sunt diterpenoidele *ent*-kauranice, ceea ce vine să confirme că acești compuși domină clasa diterpenoidelor tetraciclice.

1.2.1. Răspândirea în natură, diversitatea structurală și proprietățile biologice.

Diterpenoidele *ent*-kauranice au la bază scheletul *ent*-kauranic **1**, care cuprinde un fragment perhidrofenantrenic (inelele A, B, şi C) conjugat cu un inel ciclopentanic (inelul D). Un predecesor al acestui grup de diterpenoide este (-)-*ent*-kauranul **2** (Figura 1.3). Nomenclatura, numerotarea, precum și geometria diterpenoidelor *ent*-kauranice au fost stabilite conform standardelor IUPAC [13]. Majoritatea *ent*-kauranilor sunt caracterizați prin unghiuri de rotație optice negative, cu excepția structurilor cu o legătură dublă C-9 = C-11 [2].

Diterpenele *ent*-kauranice se întâlnesc în multe specii de plante care aparțin mai multor familii [14], cum ar fi Asteraceae (*Wedelia* spp., *Mikania* spp., *Oyedaea* spp., *Baccharis* spp., *Solidago* spp., *Vernonia* spp., *Xanthium* spp., *Eupatorium* spp., *Espeletia* spp.), Annonaceae (*Annona* spp., *Xylopia* spp., *Mitrephora* spp.), Euphorbiaceae (*Beyeria* spp., *Croton* spp., *Ricinocarpus* spp., *Suregada* spp.), Celastraceae (*Tripterygium* spp.), Apiaceae (*Alepidea* spp.), Velloziaceae (*Vellozia* spp.), Lamiaceae (Labiatae) (*Rabdosia* spp., *Isodon* spp., *Sideritis* spp.), Fabaceae (*Copaifera* spp.), Rutaceae (*Phebalium* spp.), Chrysobalanaceae (*Parinari* spp.), Jungermanniales (*Jungermannia* spp.), Erythroxylaceae (*Erythroxylum* spp.) și Rhizophoraceae (*Bruguiera* spp.), și altele.

În general, diterpenoidele *ent*-kauranice se caracterizează printr-o gamă vastă și diversă de activități biologice (Tabelul 1.1).

Regulatori de creștere în plante [2]	Antiagregarea trombocitelor [17]
Repelenți pentru insecte [2]	Antispasmolitică [18, 19]
Antiparazitară [2]	Antidiabetică / antiobezitate [20]
Antimicrobiană [2]	Analgezică [21]
Citotoxică [2]	Antialergică [22]
Antitumorală [2]	Embriotoxică [23]
Anti-HIV [2]	Genotoxică [24]
Steroidogenă [2]	Hipoglicemică [25, 26]
Antifertilitate [2]	Imunosupresivă [27, 28, 29]
Hipotensivă [2]	Inducerea apoptozei [30]
Antiinflamatorie [2]	Inhibarea contracțiilor vasculare a mușchilor netezi
	[31 - 34]
Diuretică [2]	Stimularea depunerii ouălor la insecte [35]
Anti-Alzheimer [16]	Antioxidantă [15]

Tabelul 1.1. Proprietăți biologice atribuite diterpenoidelor *ent*-kauranice.

După cum s-a menționat mai sus, *ent*-kaurenul (**3**) (Figura 1.3) este, în esență, un metabolit primar ce determină caracteristicile structurale ale întregului grup de diterpenoide *ent*-kauranice. Următoarea poziție cheie în biosinteza giberelinelor și a câtorva alte diterpenoide *ent*-kauranice este ocupat de acidul *ent*-kaur-16-en-19-oic (**4**) (Figura 1.3), care, de asemenea, este omniprezent în sursele naturale. Totuși, în ceea ce privește acumularea în surse naturale de origine vegetală, printre *ent*-kaurenoide, lider este steviolul (**5**). Astfel, în prezent, diterpenoidele **4** și **5**, reprezintă cele mai accesibile *ent*-kaurenoide [15].

Dea lungul anilor a fost raportat un număr impunător de diterpenoide *ent*-kauranice izolate din plante. Varietatea bogată și caracterul rafinat al structurilor diterpenoidelor *ent*-

kauranice izolate din surse naturale, cât și proprietățile biologice ale unora, sunt extrem de impresionante.



Fig. 1.3. Structuri ce caracterizează grupul diterpenoidelor ent-kauranice.

Începând cu anii 60 ai secolului trecut, clasa dietrpenoidelor *ent*-kauranice a fost îmbogățită continuu. Jefferies și colab. au făcut pionierat în izolarea *ent*-kauranilor. Astfel, mai multe diterpenoide noi au fost izolate din speciile *Beyeria brevifolia*, *Ricinocarpus stylosus*, *Phebalium rude*, compuși ce corespund structurilor 6 - 12, inclusiv acidul *ent*-kaur-16-en-19-oic (4) (Figura 1.4) [36 - 38]. Glicozidele *ent*-kauranice 13 - 17 au fost izolate din câteva specii de *Stevia* spp. (Figura 1.4) [39].



Fig. 1.4. Exemple de diterpenoide *ent*-kauranice și paniculozide izolate din surse naturale.

Dezvoltarea intensivă a metodelor spectrale de analiză a compuşilor organici, în a doua jumătate a secolului 20, a stimulat intens cercetările ce vizează izolarea diferitor metaboliți și determinarea structurii lor. De exemplu, în ultimele trei decenii, aproximativ 600 de diterpenoide noi au fost izolate doar din plante de genul *Isodon* (sau *Rabdosia*), care include mai mult de 150

de specii. Plantele din genul *Isodon* sunt utilizate pe larg în medicina populară chineză din cele mai vechi timpuri și reprezintă una dintre cele mai bogate surse naturale de diterpenoide, printre acestea predominând *ent*-kauranii, peste 400 compuși [40].



Fig. 1.5. Structurile ent-kauranoidelor izolate din diferite specii de Isodon.

Multe diterpenoide *ent*-kauranice reprezintă compuși înalt polifuncționalizați. Derivatul trihidroxilic **18** a fost izolat din specia *Isodon henryi* [41]. În același timp, metaboliții **19** și **20** au fost izolați din *Isodon japonicus*, având niște structuri neordinare, ce cuprind două *ent*-kaurenoide legate printr-un inel ciclobutanic. Similar altor kaurani izolați din specii de *Isodon*, acești compuși manifestă activitate antitumorală [42]. Diterpenoidele **21** și **22** au fost izolate din specia *Isodon pharicus* și prezintă activitate citotoxică slabă [43]. Acetalul **23** reprezintă un artefact, inițial obținut la izolarea cromatografică, iar mai apoi, a fost generat prin condensarea compusului **22** cu acetaldehida (Figura 1.5).

Diterpenoidele *ent*-kauranice **24** și **25**, ce conțin fragmente esterice în C-17, au fost izolate din specia *Isodon sculponeata* [44]. Un studiu fitochimic ulterior al aceleiași specii a generat, pe lângă 14 compuși kauranici bine cunoscuți, o serie de diterpenoide *ent*-kauranice neraportate anterior (ex. **26** și **27**) (Figura 1.6) [45]. Cinci *ent*-kaurani noi au fost izolați din specia *Isodon sinuolata* (ex. **28** – **31**) [46], iar studiul activității lor citotoxice a demonstrat că compușii **28** și **31** manifestă activitate antitumorală. În același timp, identificarea derivaților **32** și **33** a lărgit grupului diterpenoidelor *ent*-kauranice izolate din specia *Isodon japonicus* [47, 48].

De asemenea, din plantele genului *Isodon* au fost izolați *ent*-kaurani cu structuri neordinare, unii conținând azot. Lactona **34** a fost izolată din *Isodon lophanthoides* [49], iar compusul **35** a fost extras din *Isodon nervosus* [50, 51]. *aza*-Kauranoidele **36** și **37**, precum și

derivatul mixt **38**, având un fragment succinimidic în poziția _C-17, au fost izolate din specia *Isodon rubescens* (Figura 1.6) [52].



Fig. 1.6. Structurile ent-kauranoidelor izolate din speciile genului Isodon.

Diterpenoidele *ent*-kauranice au fost izolate și din multe alte plante. Astfel, *ent*-kaurani **39** – **46** au fost identificați pentru prima dată în *Jungermannia atrobrunnea*. Un interes aparte îl prezintă metabolitul **39**, având o structură remarcabilă, ce implică o punte peroxidică (Figura 1.7) [53].

Fructele speciei *Annona glabra* reprezintă o sursă bogată de diterpenoide, conținând o gamă largă de compuși *ent*-kauranici (ex. **46** – **64**) [54], iar de curând, ca parte a unui studiu al activității antiinflamatorii, au fost izolați pentru prima dată *ent*-kaurani **65** - **67** (Figura 1.7) [55].

O altă sursă bogată de *ent*-kaurani este specia *Salvia cavaleriei*. În ultimii ani, cincisprezece diterpenoide *ent*-kauranice noi, compuşii 68 - 82, şi doi analogi cunoscuți, 4-*epi*-henrina A (83) și leukamenina E (84), au fost izolați din întreaga plantă (Figura 1.8) [56]. Compuşi 68 - 77 şi 79 - 81 manifestă proprietăți citotoxice pe diferite linii de celule canceroase. În același context, 18,19-dihidroxi-*ent*-kaur-16-en-3-ona (85), izolată din *Euryops arabicus* [57]

și 17-hidroxi-*ent*-kaur-15-en-19-al (**86**), izolat din *Annona squamosa* [58], prezintă activitate citotoxică (Figura 1.8).



Fig. 1.7. Structurile ent-kauranilor izolați din Jungermannia atrobrunnea și Annona glabra.

Planta vietnameză *Croton tonkinensis* este bogată în diterpenoide, unele având activitate antiinflamatorie. Studiul fitochimic al acestei plante a generat o gamă vastă de compuşi, printre care, opt *ent*-kaurani noi ($\mathbf{87} - \mathbf{95}$) și 20 diterpenoide *ent*-kauranice cunoscute (Figura 1.8). Dintre compuşii izolați, 18-acetoxi-*ent*-kaur-16-en-15-ona ($\mathbf{95}$) a manifestat o activitate inhibitorie considerabilă a generării anionului de superoxid și eliberarea elastazei [59].

O serie de *ent*-kaurani interesanți, cum ar fi compusul **96**, au fost obținuți din planta *Pteris semipinnata* [60], în timp ce, niște glicozide *ent*-kauranice, (ex. **97**) au fost izolate din semințe de schinduf (*Trigonella foenum-graecum*) (Figura 1.8) [61].

Plantele din specia *Alibertia macrophylla* sunt bine cunoscute ca surse naturale de triterpenoide, dar recent, diterpenoida *ent*-kauranică **98** a fost izolată pentru prima dată din

această sursă [62]. Compusul hibrid **99** a fost izolat din plantele speciei *Aristolochia constricta*. Structura acestuia conține fragmentul *ent*-kaurenic cuplat cu un ligand (Figura 1.9) [63].



Fig. 1.8. Structurile ent-kauranilor izolați din surse naturale.

Un alt hibrid, compusul **100**, ce are în componență un fragment *ent*-kauranic și un rest de acid 3-metoxibutanoic în poziția C-15, a fost izolat din frunzele de *Coespeletia moritziana* [64]. Diterpenoidele *ent*-kauranice **101** – **103** au fost izolate din *Rubus corchorifolius* [65]. Compus inedit **104** a fost identificat printre metaboliții plantelor din genul *Polyalthia* [66]. Acest compus are o structură alcătuită din două unități *ent*-kauranice, acest fenomen întâlnindu-se destul de rar în cadrul diterpenoidelor native (Figura 1.9).

Medicina populară chineză folosește pe scară largă plantele *Siegesbeckia pubescens*, a căror proprietăți terapeutice în mare parte se datorează *ent*-kauranoidelor conținute în partea aeriană a plantelor [67]. În această direcție, au fost raportate patru diterpenoide *ent*-kauranice noi, **105** – **108** izolate din *S. pubescens* (Figura 1.9) [68].



Fig. 1.9. Structurile *ent*-kauranilor izolați din diferite specii de plante.

Recent, compuși **109** – **112** au fost izolați din *Helianthus annuus* L. Scheletul fără precedent al acestor compuși micști combină o lactonă sesquiterpenică și derivați ai acidului *ent*-kaur-16-en-19-oic (**4**) (Figura 1.10) [69].



Fig. 1.10. Structurile ent-kauranilor micști izolați din Helianthus annuus L.

1.2.2. Potențialul sintetic al diterpenoidelor ent-kauranice

Transformarea chimică a substanțelor naturale, este o direcție importantă și promițătoare în chimia medicinală și nu numai. În acest sens, marea varietate a diterpenoidelor *ent*-kauranice și conținutul relativ mare al unora în sursele naturale disponibile, alcătuiesc o bază foarte atractivă pentru chimia sintetică. Astfel, au fost și sunt efectuate numeroase studii în direcția modificării structurale a kauranilor, cu scopul de a obține noi substanțe cu bioactivitate potențială. Aceste transformări structurale au fost realizate chimic sau microbiologic, folosind culturi de microorganisme. De asemenea, trebuie remarcat faptul că, primele investigații, ce țin de transformările chimice ale *ent*-kauranilor au avut drept scop determinarea structurii compușilor, în special, a configurațiilor absolute [39], această metodă fiind utilizată până în prezent [70].

Reducerea legăturii duble C-16 = C-17 în diterpenoidelor *ent*-kaurenice a fost una dintre primele transformări chimice, raportate încă în 1948, prin care din *ent*-kauren (**3**) s-a obținut *ent*-kauran (**2**) [71]. Legătura dublă în *ent*-kaurani joacă un rol important în manifestarea activității biologice. Spre exemplu, s-a stabilit că hidrogenarea legăturii C-16 = C-17 în steviol (**5**) conduce la eliminarea proprietății mutagene în compusul obținut [72]. În aceiași ordine de idei, activitatea citotoxică a cetonei α,β -nesaturate **113** este mult mai pronunțată în comparație cu cea a derivatului **114** (Figura 1.11) [73].



Figura 1.11. Diterpenoidele *ent*-kauranice **113** – **116**.

Grupa carboxil din C-4, caracteristică multor *ent*-kaurani, este ecranată steric de grupele metil C-18 și C-20, și prin urmare, este mai puțin reactivă în comparație cu grupa analogă din acizii carboxilici. Important este că, funcționalizarea grupei date poate schimba semnificativ activitatea biologică a metabolitului inițial, dar în unele cazuri, aceasta este necesară în manifestarea proprietăților biologice. De exemplu, esterul metilic al dihidrosteviolului **115** și esterul metilic al 15-oxo-steviolului (**116**) (Figura 1.11), în comparație cu acizii inițiali, sunt complet lipsiți de proprietăți repelente față de păduchele verde al cerealelor (*Schizaphis graminum*) [74]. Rolul grupei carboxil este și mai important în cazul derivaților semisintetici, cum ar fi derivații *ent*-kaurenoidului **117**. Oxidarea grupei carbonil în compusul **118**, care este un agent anticancerigen foarte activ, până la grupa carboxil în **119** duce la pierderea completă a proprietăților date (Figura 1.12) [75].



Figura 1.12. Schema de sinteză a diterpenoidelor *ent*-kauranice **118** și **119** reieșind din compusul **117**.

Henrick și Jefferies [37], în baza compușii majoritari izolați din specia *Ricinocarpus stylosus*, au realizat diverse reacții de esterificare, oxidare, reducere și omologare, cu obținerea unei serii de derivați *ent*-kauranici sintetici și analogi naturali (ex. **120** – **126**) (Figura 1.13).



Fig. 1.13. Derivați ent-kauranici sintetici.

Mori si colab. [76], în studiul dedicat sintezei lactonelor prin metode fotolitice și nonfotolitice, au obținut lactona **128** reieșind din acidul *ent*-kauranic **127** (Figura 1.13). Caracteristic pentru toate substanțele folosite este grupa carboxil axială în C-4.

Cook și Knox [77-79], în mai multe lucrări, prezintă sinteza unor derivați *ent*-kauranici în baza acidului *ent*-kaur-16-en-19-oic (**4**). Transformarea *ent*-kaur-16-en-19-oat-ului de metil (**129**) în nor-cetona **130** și, ulterior, oxidare *Baeyer-Villiger* conduc la obținerea γ -lactonei **131**, care după o serie de transformări consecutive (hidroliză, metilare și oxidare), generează ceto-diesterul **132**. Tratarea compusului **132** cu sodiu în amoniac lichid a condus spre un produs similar acil-ciclizării, diolul **133**, iar oxidarea ulterioară a acestuia a generat derivatul **134**. Protejarea grupei hidroxil în **134**, urmată de reacția *Wittig* cu metilentrifenilfosforan și prelucrarea ulterioară a reacției într-un mediu slab acid, generează esterul metilic al steviolului, **135** (Figura 1.14).



Fig. 1.14. Sinteza derivatului 135 din acidul ent-kaurenoic (4).

Cloranhidridele acizilor carboxilici ce conțin fragmente labile, în mediu acid, se pot obține ușor printr-o metodă ce include amestecul de CCl_4 -PPh₃ [80]. Pe această cale, a fost sintetizată, cu un randament bun, cloroanhidrida acidului *ent*-kaur-16-en-19-oic (**4**), utilizată apoi la obținerea unor esteri [81]. În ultimii ani, această metodă a fost folosită cu succes la obținerea unei game largi de derivați *ent*-kauranici. Vieira și colab. au sintetizat o serie de amino-, amidoși oxim-derivați, **136** – **150**, pornind de la acidul *ent*-kaur-16-en-19-oic (**4**) (Figura 1.15) [82]. Studiul dat a avut drept scop reducerea sau a eliminarea efectul litic al acidului **4** asupra eritrocitelor din sânge. Dintre toți compușii, doar oxima **147** s-a dovedit a fi mai activă, manifestând activitatea tripanocidală, dar continuă să afecteze ușor celulele roșii din sânge. Clorhidratul **145** este singurul compus care nu induce hemoliza, iar proprietățile sale tripanocidale sunt comparabile cu cele ale substratului inițial **4** (Figura 1.15).



Fig. 1.15. Derivații sintetici ai acizilor *ent*-kaurenoic (4), 136 – 150 si grandiflorenic (151), 152 – 159.

Mai târziu, același centru de cercetare, [83] raportează monoamidele **152** – **159** noi obținute la interacțiunea acizilor *ent*-kaur-16-en-19-oic (**4**) și grandiflorenic (**151**) cu monoamine și diamine simetrice (Figura 1.15). Amidele ce provin din diamine simetrice au demonstrat o activitate inhibitoare semnificativă asupra germinării semințelor și creșterii plantei *Lactuca sativa*, la concentrații mari.

Fraga și colab. [84] au prezentat rezultatele unui studiu biosintetic în baza ciupercii *Gibberella fujikuroi* [84]. Astfel, au fost obținute dienele **160**, **161** și **162**. La incubare cu *Gibberella fujikuroi*, *ent*-kaur-6,16-diena (**160**) și 18-hidroxi-*ent*-kaur-6,16-diena (**161**) au fost transformate în 7,18-hidroxi kaurenolide, în timp 3β ,18-dihidroxi-*ent*-kaur-6,16-diena (**162**) a fost transformat în 6α , 7α -epoxidul **163** (Figura 1.16).



Fig. 1.16. Derivați *ent*-kauranici biosintetici 160 – 165.

Castellaro și colab. [85], cu scopul elucidării stereochimiei procesului de dehidrogenare enzimatică a acidului **4** la acțiunea ciupercii *Gibberella fujikuroi*, au sintetizat diverși derivați etichetați cu deuteriu în pozițiile C-6 și C-7. Astfel, a fost sintetizată diena **164**, un intermediar în biosinteza kaurenoidului **165** (Figura 1.16).

Pornind de la 7β ,18-dihidroxi-*ent*-kaur-15-ena (**166**), o diterpenoidă abundentă în specia *Sideritis infernalis*, Bellino și Venturella [86] au efectuat sinteza derivaților **167** – **172**, prin intermediul mai multor transformări (Figura 1.17).



Fig. 1.17. Derivații *ent*-kauranici **167 – 172**.

Schimbările lanțului carbociclic joacă un rol special în funcționalizarea *ent*-kauranilor, făcând posibilă sinteza compușilor cu structuri deosebite, ce nu pot fi obținuți prin alte metode. Astfel, compusul 14β -meziloxi **173**, fiind supus reducerii cu iodură de sodiu în prezență de zinc,

nu generează produsul demezilat, ci un compus regrupat total neașteptat, **174** (Figura 1.18) [87]. În aceiași ordine de idei, izomerizarea acidă a derivaților 9,11-dihidroxi **175** – **177** oferă compușii cu schelet regrupat **178** – **180** și un produs de fragmentare **181** (Figura 1.18) [88].

Boeck și colab. [89] vin cu o alternativă în obținerea esterilor *ent*-kauranici, prin -*O*-alchilarea în mediu bazic. A fost elaborată o metodă simplă de preparare a esterilor **182 – 186** prin alchilarea acidului *ent*-kaur-16-en-19-oic (**4**) cu halogenuri de alchil într-un sistem KOH – acetonă, evitând condițiile anhidre (Figura 1.19). Reacția steviolului (**5**) cu alchil-halogenuri în mediu KOH – DMSO a condus la compușii **187** și **188** (Figura 1.19) [90].



Fig. 1.18. Compuşii *ent*-kauranici **173**, **175** – **177** şi produşii de izomerizare corespunzători, **174**, **178** – **181**.

Într-o altă abordare de acest gen [91], steviolul (**5**) a fost alchilat cu etilendiamină în DMF, reacția fiind catalizată de sistemul (benzotriazol-1-iloxi)tripiroldinofosfoniu hexafluorofosfat – N,N-diisopropiletilamină (PyBOP-DIEA), obținându-se diamida **189** (Figura 1.19).



Fig. 1.19. Esterii acidului ent-kaur-16-en-19-oic (4), 182 – 186 și ai steviolului (5), 187 – 189.

O direcție atractivă și promițătoare în funcționalizarea *ent*-kaurenilor este oxidarea dublei legături. Acidul *meta*-cloroperbenzoic (*m*CPBA) a fost printre primii agenți de oxidare utilizați, acesta fiind antrenat în sinteza derivaților epoxidici ai acidului *ent*-kaur-16-en-19-oic (4) [92, 93], ai steviolului (5) [94, 95] și altor derivați cu legătură dublă [96].

În această direcție, Batista și colab. [93], prin intermediul epoxidului **190**, au sintetizat aldehidele *ent*-kauranice **191** și **192**, importanți intermediari pentru cuplările semisintetice. În plus, pentru prima dată, a fost descrisă sinteza derivaților *ent*-kauranici și *ent*-norkauranici **191**, **194** – **196** obținuți la tratarea cu dicromat de piridiniu (PDC) (Figura 1.20).



Fig. 1.20. Schema de sinteză a compușilor 190 – 196.

Alonso și colab. [97] au preparat compușii **197** și **198**, pornind de la epoxidarea acidului grandiflorenic (**151**) natural, urmată de regruparea ulterioară cu eterat de dietiltrifluoriolborat sau bor *N*-metil-*N*-nitrozouree. Produșii nu s-au dovedit a avea proprietăți antimicrobiene semnificative, dar au manifestat activitate citotoxică considerabilă împotriva unor linii de celule neoplazice umane și reprezintă substanțe antitumorale promițătoare (Figura 1.21).



Fig. 1.21. Derivații regrupați ai acidului grandiflorenic (151), 197 și 198.

Aparicio și colab., [98] au realizat oxidarea alilică a acidului *ent*-kaur-16-en-19-oic (**4**), a esterului metilic **129** și *ent*-kaur-16-en-19-ol-ului (**122**) (Figura 1.22). Tratarea acidului **4** cu SeO₂/H₂O₂ a condus la obținerea acidul 15α -hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oic (**12**). Aceleași

condiții de reacție, în cazul esterului metilic **129** și a *ent*-kaurenolului **122**, au generat câte două produse, derivații 15α-hidroxi **199** și **201**, și derivații 16α-epoxi-17-hidroxi **200** și **202** (Figura 1.22).



Fig. 1.22. Schema de sinteză a compușilor 12, 199 – 202.

Recent, a fost raportată [99] hidroformilarea legăturii C-16 = C-17 în esterii metilici ai acizilor *ent*-kaur-16-en-19-oic (**4**) și grandiflorenic (**151**) catalizată de rodiu. Trebuie de remarcat faptul că, formarea aldehidelor corespunzătoare **203** și **205** a fost însoțită de izomerizarea acizilor inițiali, rezultând derivații **204** și **206** respectivi, cu legături duble endociclice (Figura 1.23). Folosind același sistem catalitic cu rodiu, s-a efectuat hidroaminometilarea secvențială (hidroformilare, urmată de hidrogenare *in situ*) pe substrat *ent*-kaurenic, obținându-se diastereoizomerii **207** și **208** în raport de 61:39 (Figura 1.23) [100].



Fig. 1.23. Produșii de hidroformilare ai acizilor ent-kaur-16-en-19-oic (4) și grandiflorenic (151),

203 - 208.



Fig. 1.24. Adiția electrofilă la legătura dublă în acidului ent-kaur-16-en-19-oic (4).

Derivații **209** și **210** au fost sintetizați prin adiție electrofilă la dubla legătură (Figura 1.24). Dar ca și în multe alte cazuri, s-a stabilit că această modificare a condus la dispariția completă a proprietăților citotoxice caracteristice produsului inițial [101].

Metilarea ceto-acidului α,β -nesaturat **211** cu diazometan este însoțită de o cicloadiție-1,3 dipolară a diazometanului la legătura dublă și conduce la formarea derivatului pirazolinic **212** cu un randament cantitativ (Figura 1.25) [74]. Cu toate acestea, transformările ulterioare a *ent*kauranilor prin funcționalizarea α -oxo metilenică nu a fost dezvoltată, deoarece tot mai multe lucrări vin să susțină că această porțiune conferă derivaților activitate citotoxică. Această concluzie a fost reconfirmată și prin lipsa activității citotoxice în *ent*-kaurenul **213** (Figura 1.25) [102].



Fig. 1.25. Derivații 15-oxo-*ent*-kauranici **211** – **213**.

Diterpenoidele *ent*-kauranice alcătuiesc subiectul a multor studii de biotransformare sub acțiunea fungilor, în vederea obținerii compușilor bioactivi. Pechwang și colab. descriu biotransformarea acidului *ent*-kaur-16-en-19-oic (**4**) sub acțiunea ciupercii *Psilocybe cubensis* și evaluarea *in vitro* a activității citotoxice a metaboliților obținuți. La două zile de la incubare, a fost izolat acidul 16β ,17-dihidroxi-*ent*-kauran-19-oic (**54**). După nouă zile de incubare, au fost obținuți doi metaboliți noi, 12α , 16β ,17-trihidroxi-*ent*-kauran-19-oic (**214**) și 11α , 16β ,17trihidroxi-ent-kauran-19-oic (**215**) (Figura 1.26) [103]. Biotransformarea acidului grandifloric (**12**) sub acțiunea ciupercii *Fusarium proliferatum* a generat un derivat nou, acidul 2α , 15α dihidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oic (**216**) (Figura 1.26). Acest compus manifestă activitate alelopatică, inhibând cu o rată de 100% germinarea și creșterea rădăcinii și tulpinii de salată (*Lactuca sativa*), la concentrație testată (10^{-4} mol/L) [104].





1.3. Diterpenoidele ent-trachilobanice – caracteristica generală

Istoric preparatele naturale datează ca sursa majoră de agenți farmaceutici. Aceste produse au contribuit la progrese semnificative în domeniul științei și industriei. Astfel, în căutarea de substanțe cu potențial terapeutic nu au fost trecute cu vederea nici terpenoidele pentaciclice *ent*-trachilobanice.

1.3.1. Răspândirea în natură, diversitatea structurală și proprietățile biologice.

Trachilobanii reprezintă o clasă de diterpenoide mai rar întâlnite în natură și se caracterizează printr-un schelet carbonic pentaciclic (**217**), cu sistem triciclic[3,2,1,0]octanic caracteristic inelelor C, D și E. Toate diterpenoidele trachilobanice izolate până acum aparțin seriei *enantio* și figurează ca *ent*-trachilobani (Figura 1.27) [3].

Primii reprezentanți ai acestei clase au fost izolați din rășina de *Trachylobium verrucosum* (Leguminosae) de unde le provine și denumirea [105, 106]. Autorii francezi au izolat din această plantă alcoolul **221** și acizii *ent*-trachiloban-18-oic (**222**), și 3α -hidroxi-*ent*trachiloban-18-oic (**223**) (Figura 1.28). Mai târziu, Pyrek și colab. [6] au extras acidul *ent*trachiloban-19-oic (**219**) (Figura 1.27) din floarea-soarelui (*Helianthus annuus* L.). Pe parcurs, diterpenoidele *ent*-trachilobanice au fost identificate în mai multe specii de Euphorbiaceae (*Croton sp.* [107], *Stillingia* [108]), Annonaceae (*Xylopia* sp. [109]), Asteraceae (*Helianthus* sp. [6], *Viuiera* sp. [110]), Lamiaceae [111] și Leguminosae [105], Labiateae (*Sideritis* sp. [3]) și Apiaceae (*Arctopus* sp [112]).



Fig. 1.27. Structuri ce caracterizează grupul diterpenoidelor *ent*-trachilobanice.

Activitățile biologice ale compușilor *ent*-trachilobanici sunt slab investigate, cu toate acestea, unii compuși izolați au demonstrat proprietăți antitumorale [107, 113, 114],

vasorelaxante [115], antimicrobiene [114], activitate antiosteoclastogenică [116], repelentă și antifungică [3].

Familia Asteraceae (Compositae) reprezintă una dintre cele mai bogate surse de diterpenoide *ent*-trachilobanice, metaboliții respectivi fiind izolați împreună cu analogii lor *ent*-kaurenici. De exemplu, un număr mare de *ent*-trachilobani au fost identificat în genul *Helianthus* (Tabelul 1.2) [3].

Studiul modulării proceselor inflamatorii utilizând acizii diterpenici izolați din *Helianthus annuus* L. au demonstrat că acidul *ent*-trachiloban-19-oic (**219**) prezintă proprietăți anti-inflamatorii semnificative *in vivo* [117]. Pe când, acidul ciliaric (**220**), întâlnit în speciile *Helianthus annuus*, *Sclerotinium sclerotiorum* și *Verticilium dahliae*, manifestă proprietăți antifungice (Figura 1.27) [118].

Helianthus annuus	219, 220, 224, 225,	H. hirsutus	219
	226, 231, 232		
H. argophyllus	220	H. occidentalis	220
H. ciliaris	220	H. petiolaris	220
H. debilis	219	H. radula	233, 234
H. giganteus	219	H. rigidus	219, 220
H. grosseserratus	220	H. salicifolius	220
H. niveus	220	H. tomentosus	219

Tabelul 1.2. Diterpenoide ent-trachilobanice izolate din genul Helianthus [3]

Acidul *ent*-trachiloban-19-oic (**219**) împreună cu derivatul nesaturat **230** au fost izolați din plantele speciei *Viguiera bishopii* [110]. Iar specia *Viguiera pazensis* s-a dovedit a fi foarte bogată în *diterpenoide ent*-trachilobanice, fiind izolați compușii **219**, **220**, **225** – **229** [119] (Figura 1.27, Figura 1.28). Acidul **219** a fost, de asemenea, identificat în rădăcinile speciei *Isotephane heterophylla* [120].

Metabolitul primar, *ent*-trachilobanul (**218**) împreună cu derivații **235 – 240**, au fost izolați din specia *Sideritis canariensis* (Figura 1.27, Figura 1.29) [121]. Alte specii din genul *Sideritis* la fel, conțin diterpenoide *ent*-trachilobanice[122]. Hidrocarbura **218** a fost obținută și din uleiul esențial de *Araucaria araucana*, împreună cu o serie de diterpenoide biogenetic înrudite, *ent*-kaurani, *ent*-beierani și *ent*-atisani [123].



Fig. 1.28. Derivați *ent*-trachilobanici izolați din speciile *Trachylobium verrucosum, Helianthus, Sclerotinium sclerotiorum, Verticilium dahliae* și *Viguiera* sp.

Hasan și colab. [124] au izolat din scoarță speciei *Xylopia quintasii* acidul 7β -acetoxi-*ent*-trachiloban-18-oic (**241**), iar derivatul hidroxilat **242** a fost obținut din fructele speciei *Xylopia aromatice* (Figura 1.29) [125]. Acidul 15-oxo-*ent*-trachiloban-19-oic (**243**) împreună cu alcoolul **226** au fost izolați din *Xylopia aethiopica* [126]. Ceva mai târziu, autorii au identificat acizii **219** și **220**, având drept scop studiul proprietăților inhibitorii ale diterpenoidelor izolate din scoarța speciei date. Testele enzimatice *in vitro* au arătat că unii compuși manifestă activitate inhibitorie față de prolil endopeptidaza [127].



Fig. 1.29. Derivați *ent*-trachilobanici izolați din genurile *Sideritis*, *Xylopia*, *Croton* și specia *Stillingia sanguinolenta*.

Două diterpenoide noi, de tip *ent*-trachilobanic, au fost izolate din tulpinile speciei *Xylopia langsdorffiana*, acizii 7α -acetoxi-*ent*-trachiloban-18-oic (**244**) și 7α -hidroxi-*ent*- trachiloban-18-oic (**245**) (Figura 1.29). Acidul **244** a fost inclus într-un studiu al activității citotoxice împotriva culturilor de fibroblaști V79 și a hepatocitelor la șobolani [109].

Santos și colab. [128] au prezentat rezultatele studiului activității spasmolitice ale compușilor **244** și **245** asupra ileonului la cobai. Astfel, ambii compuși induc activitatea spasmolitică prin modularea pozitivă a canalelor de K^+ și blocarea canalelor de Ca^{2+} , generând o scădere a [Ca^{2+}] la nivel celular, ceea ce duce la o bună relaxare musculară. Studiile au continuat cu investigații *in vitro* și *in vivo* ale efectului antitumoral al acidului **244** (Trachilobane-360). Studiul vine să consolideze potențialul anti-cancer al produselor naturale, acidul manifestând o capacitate de inhibare a creșterii celulelor tumorale, fără a induce modificări biochimice, hematologice și histopatologice majore [4, 129].

Genul *Croton* este bine cunoscut drept sursă de diverse diterpenoide, iar specia *Croton* zambesicus s-a dovedit a fi bogată în diterpenoide *ent*-trachilobanice. Astfel, Block și colab. [130] au izolat din frunzele speciei date compusul *ent*-trachiloban- 3β -ol (242), un derivat cu proprietăți citotoxice [107]. Tot din frunze au fost izolați și compușii 18-hidroxi-*ent*-trachiloban-3-ona (246) și *ent*-trachiloban-3-ona (247), ambii manifestând citotoxicitate (Figura 1.29). Derivații 3-oxo au fost izolați și din specia *Stillingia sanguinolenta* (ex. 248) (Figura 1.29) [108]. O serie de *ent*-trachilobani a fost identificată în rădăcinile speciei *Croton flribundus, ent*-trachiloban-18,19-diol (249) (Figura 1.28), de rând cu alți derivați cunoscuți, acizii 219, 226 și alcoolul 224 [131].



Fig. 1.30. Derivați *ent*-trachilobanici izolați din specii de *Mitrephora glabra* și *Psiadia punctulata*.

Compuși noi cu structuri neordinare, **250 - 252**, au fost izolați din *Mitrephora glabra* (Figura 1.30) [132]. Mitreforona A (**250**) este prevăzută cu un sistem hexaciclici cu ceto-grupe amplasate adiacente și un inel epoxidic, ambele fără precedent în rândul *ent*-trachilobanilor.

Citotoxicitatea compuşilor a fost evaluată pe un şir de celule canceroase, compusul **250** demonstrând cel mai puternic și larg spectru de activitate citotoxică. Totodată, activitatea antimicrobiană s-a manifestat aproximativ echipotențial la toți compuşii izolați.

Trei diterpenoide *ent*-trachilobanice noi au fost izolate din secrețiile exsudate ale frunzelor de *Psiadia punctulata* și au fost caracterizate ca 6α ,17,19-*ent*-trachilobantriol (**253**), 2α ,18,19-*ent*-trachilobantriol (**254**), și 2β , 6α ,18,19-*ent*-trachilobantetraol (**255**) (Figura 1.30) [133].

Primul reprezentant al *ent*-trachilobanilor izolați din familia Hepaticae, acidul 3α ,18dihidroxi-*ent*-trachiloban-19-oic (**256**), a fost extras din specia *Jungermannia exsertifofia* [134] (Figura 1.31). Mai târziu, în căutarea de noi compuși biologic activi, din subspecia *cordifolia*, au fost izolate 11 diterpenoide *ent*-trachilobanice noi, **257** – **267** și trei compuși cunoscuți (Figura 1.31) [135]. Unii compuși izolați, în special **259** și **266**, au prezentat activitate considerabilă împotriva *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv, în concentrații inhibitorii minime (61 – 24 pg/mL).



Fig. 1.31. Derivați *ent*-trachilobanici izolați din speciile Jungermannia exsertifofia, Mastigophora diclados și Helichrysum sp.

Studiul fitochimic al plantei de origine malaieziană din specia *Mastigophora diclados* (Mastigopharaceae) a permis identificarea a câtorva *ent*-trachilobani cunoscuți (**219** și **222**), cât și a unui reprezentant nou C-18,19 funcționalizat, acidul 18-hidroxi-*ent*-trachiloban-19-oic (**268**) (Figura 1.31) [136].

Diterpenoide de tip *ent*-izotrachilobanic au fost izolate din genul *Helichrysum* (Compositae). Acidul helifulvanolic (**269**) a fost izolat din specia *H. fulvum* [137], în timp ce acidul helifulvanoic (**270**) și helifulvan-19-ol (**271**) au fost găsiți în specia *H. chionosphaerum* [138] (Figura 1.31).
1.3.2 Potențialul sintetic al diterpenoidelor ent-trachilobanice

Primele investigații, ce țin de transformările chimice ale *ent*-trachilobanilor, au avut drept scop determinarea structurii compușilor [6, 105, 106, 139], corelarea structurală pe cale chimică fiind folosită și în prezent. Un studiu propriu-zis, de valorificare a potențialului sintetic al diterpenoidelor *ent*-trachilobanice, vizează produsele formate la deschiderea inelului ciclopropanic sub acțiunea acidului trifluoracetic [140]. Mai târziu, a fost raportată interacțiunea acidului *ent*-trachiloban-19-oic (**219**) cu acid clorhidric uscat, obținându-se un amestec de diterpenoide *ent*-kauranice și *ent*-atisanice corespunzătoare [141].

Acidul 3,4-secotrachilobanic **272** reprezintă unul dintre componentele bioactive majore ale rășinii extrase din rădăcinile speciei *Croton sonderianus*. Structura acestuia a fost demonstrată pe cale sintetică. Astfel, compuși **273** – **276** au fost obținuți pe diverse căi, prin esterificare, ozonoliză, reducere și hidrogenare catalitică, confirmând scheletul trachilobanic (Figura 1.32) [142].



Fig. 1.32. Derivații acidului 3,4-secotrachilobanic, 273 – 276.

În 1968 Herz și colab. [143, 144], pornind de la acid levopimaric, au descris sinteza esterul metilic al acidului trachiloban-18-oic, reprezentant al seriei *normale*, enantiomer neîntâlnit în natură. Coates și Bertram [145], în 1968 au efectuat prima sinteză a unui derivat natural. Iar recent, a fost raportată sinteza asimetrică totală a esterului metilic al acidului *ent*-trachiloban-19-oic (**219**), împreună cu derivații *ent*-kaurenici și *ent*-atisenici corespunzători, realizată prin utilizarea unei strategii hibride de cicloalchinare catalizată de Pd și regrupare radicalică homoalil-homoalil [146].

Abad și colab. [147] a propus o abordare sintetică generală, construind scheletul carbonic al diterpenoidelor policiclice biogenetic înrudite (trachilobani, beierani, atisani și kaurani) pornind de la carvonă. Sinteza dată implică prepararea intermediarului comun **277**, cu schelet *ent*-trachilobanic, conceptual similar cu precursorul biogenetic, și transformarea regioselectivă a acestuia (Figura 1.33). Prepararea intermediarului **277** din carvonă, are la bază două etape cheie, reacția *Diels–Alder* intramoleculară și o ciclopropanare intramoleculară.



Fig. 1.33. Schema de sinteză a derivațiilor 279 și 280 din intermediarii 277 – 278.

Obținerea pe cale chimică și microbiologică a trachiloban-giberelinelor reprezintă o direcție interesantă de cercetare. Giberelinele sunt importanți hormoni de creștere ai plantelor, iar precursorii naturali ai acestora sunt diterpenoidele *ent*-kauranice. Astfel, Fraga și col. [3], reieșind din *ent*-trachinodiolul natural (237), în mai multe etape au sintetizat lactona 281, care la regrupare a generat trachiloban-giberelina 283. Stereochimia centrelor C-4, C-5 și C-6 este opusă giberelinelor naturale [148]. Mai târziu, s-a efectuat sinteza parțială a 4-*epi*-trachloban-giberelinei A_{12} (288), de asemenea, pornind de la *ent*-trachinodiol (237). Joncțiunea stereospecifică a inelul B a fost păstrată prin tratarea bromhidrinei 284 cu oxid de argint, obținându-se aldehida 285 (Figura 1.34) [149].



Figu. 1.34. Sinteza ent-trachiloban-giberelinelor 283 și 288.

Trachiloban-giberelinele TGA₉ (**289**) și TGA₁₂ (**290**) au fost preparate prin biotransformarea acidului *ent*-trachiloban-19-oic (**219**) sub acțiunea ciupercii *Gibberella fujikuroi* mutantă B1-41 (Figura 1.35). Studiul bioactivității a demonstrat că compusul **289** manifestă proprietăți biologice caracteristice giberelinelor naturale [150]. Acest studiu a fost mai târziu extins, folosind diferite condiții de incubare. Astfel, au fost identificați și alți produși de biotransformare, lactona 7β -hidroxi **291**, acidul tricarboxilic **292** și acidul 6α , 7α -dihidroxi-*ent*trachiloban-19-oic (**293**) (Figura 1.35) [151].



Fig. 1.35. Produșii de biotransformare a acidului *ent*-trachiloban-19-oic (219), 289 – 293.

Diterpenoidele *ent*-trachilobanice **235** și **236**, diterpenoide izolate anterior din specia *S*. *canariensis* [152], au fost preparate pornind de la diacetatul **294**, conform schemei din Figura 1.36. Hidroliza parțială a compusului **294** a generat monoacetatul majoritar **238** și diolul **237**. Primul a fost tratat cu trifenilfosfină, iod și imidazol, obținându-se derivatul iodurat **296**. Compusul dat, fără a fi purificat, a fost redus cu alumohidrură de litiu generând trachinolul **235** și o cantitate foarte mică de dimer **297**. Acetilarea obișnuită a compusului **235** a condus la obținerea substratul **236**.



Fig. 1.36. Sinteza compuşilor 235, 236 şi biosinteza compusului 298.

Iodurarea compusului minor 237 a condus, de asemenea, la obținerea unui derivat 18iodurat, 295. Compusul 236, fiind supus biotransformării sub acțiunea ciupercii *Gibberella fujikuroi*, generează derivatul acetilat 289 (Figura 1.36) [153].

Bacceili și colab. [154], în cadrul evaluări efectul vasorelaxant al diterpenelor izolate din frunzele speciei *C. zambesicus* și a derivaților *ent*-trachilobanici sintetici, au testat peste 26 de

compuși. Dintre compușii sintetici obținuți, diterpenoidele 280, 299 și 302 s-au dovedit mai active în comparație cu martorul, iar compușii 300 și 301 au prezentat proprietăți similare (Figura 1.37).



Fig. 1.37. Compușii sintetici activi 280, 299 - 302.

Coates și colab. [155] au raportat sinteza *aza*-derivaților din seria *ent*-beieranică și *ent*trachilobanică. Analogul 13-*aza-ent*-trachiloban (**305**) a fost obținut din *ent*-beieran-16-onă (**303**), prin scindarea inelului D, urmată de regruparea *Curtius*. Transformarea *seco*-noraminei **304** a fost realizată prin aziridare intramoleculară. Amina primară a fost oxidată cu Pb(OAc)₄, obținându-se cu un randament cantitativ derivatul *aza*-ciclizat **305**. Pentru stabilitate, produsul **305** a fost transformat în picratul **306** (Figura 1.38).



Fig. 1.38. Schema de sinteză a 13-aza-ent-tachilobanului (305) [155].

1.4. Concluzii la capitolul 1

În acest capitol au fost discutate și evidențiate principalele direcții de cercetare ale chimiei diterpenoidelor *ent*-kauranice și *ent*-trachilobanice: izolarea, diversitatea, activitatea biologică și potențialul sintetic, punându-se accent pe acizii accesibili *ent*-kaur-16-en-19-oic și *ent*-trachiloban-19-oic;

Analiza datelor bibliografice a demonstrat următoarele:

 În baza studiului de mai sus se poate concluziona că diterpenoidele *ent*-kauranice reprezintă un subiect actual important al cercetărilor, fiind caracterizate de structuri deosebite şi proprietățile biologice impunătoare;

- Studiul bibliografic, ce ține de diterpenoidele *ent*-trachilobanice, a demonstrat că diterpenoidele date prezintă un interes aparte, datorită structurii lor pentaciclice unice, precum și din punct de vederea al activității biologice;
- A fost pusă în evidență legătura biogenetică relevantă a diterpenoidelor *ent*-kauranice și *ent*-trachilobanice, acestea fiind precursori biomimetici valoroși în sinteza altor diterpenoide tetraciclice.

Reieşind din cele expuse mai sus, elaborarea metodei de izolare a diterpenoidelor cu structură *ent*-kauranică și *ent*-trachilobanică din deșeurile producției agro-industriale are o valoare practică deosebită. Aceste substanțe pot fi utilizați în calitate de precursori în sinteza altor diterpenoide bioactive și compuși sintetici cu potențial sporit de activitate biologică, ceea ce reprezintă o problemă de cercetare actuală și de perspectivă. Prezenta lucrare este dedicată soluționării acestei probleme.

2. TRANSFORMĂRI SINTETICE ALE ACIDULUI ENT-TRACHILOBAN-19-OIC

Compușii *ent*-trachilobanici sunt metaboliți secundari mai rar întâlniți în natură. Chiar și așa, acidul *ent*-trachiloban-19-oic (**219**) este relativ abundent și datorită structurii sale pentaciclice reprezintă o bază atractivă în sinteza diferitor derivați diterpenici, reprezentativi fiind produșii regrupați. Astfel, în aspect sintetic acidul **219**, datorită structurii sale și specificului biogenetic, reprezintă un substrat interesant și accesibil pentru sinteza diterpenoidelor polifuncționale cu bioactivitate potențială.

Acidul *ent*-trachiloban-19-oic (**219**), pentru prima dată a fost extras din floarea-soarelui, (*Helianthus annuus* L.) [6], iar pe parcursul anilor, acesta s-a regăsit în așa genuri de plante ca: *Helianthus* sp. [3], *Xylopia* sp., *Iostephane* sp., *Liatris* sp., *Psacalium* sp., *Roldana* sp., *Potentilla* sp.[156], *Croton* sp. [157], *Viguiera* sp [110]. Acidul **219** manifestă o activitate antiinflamatorie considerabilă *in vivo* [117] și proprietăți antibacteriene contra *B. subtilis* și *S. aureus* [158]. Acidul **219** acționează ca inhibitor al reacției Hill [159] și prezintă activitate citotoxică slabă împotriva carcinomului de colon și cel gastric [157].

2.1. Izolarea diterpenoidelor *ent*-trachilobanice și *ent*-kauranice din deșeurile de floareasoarelui

În prezent, plantele reprezintă o bază medicamentoasă importantă în tratarea bolilor și în calitate de parafarmaceutice. În acest context, uleiul, mugurii și tinctura din plante de floareasoarelui (*Helianthus annuus* L.) sunt folosite pe larg în medicina populară. Totuși această plantă este cultivată în primul rând pentru semințele ei, a doua cea mai importanta sursă de ulei comestibil din lume.

Recent, Saini și colab. [160] au prezenta un studiu privind utilizarea tradițională a floriisoarelui ca produs alimentar și în calitate de remediu pentru tratarea diferitor boli. Aceasta preponderent este utilizată pentru tămăduirea rapidă a plăgilor, tratarea bolilor renale, tratarea durerilor de piept și a problemelor pulmonare, astm, în atenuarea simptomatologiei reumatice. De asemenea, este arhicunoscută utilizarea florii-soarelui în calitate de lubrifiant, stimulent, antidiareic, dezinfectant și supliment dermatologic. În aceiași ordine de idei, ceaiurile și alte produse preparate din diferite părți ale plantei sunt utilizate la tratarea febrei, cataplasme pentru răni, edeme și înțepături de insecte, în tratamentul malariei și a diabetului.

Datorită complexității sale fitochimice, formei erbacee și accesibilității înalte, au fost efectuate numeroase studii de izolare a constituenților. Numărul impunător și varietatea compușilor izolați caracterizează capacitatea florii-soarelui de a produce metaboliți secundari. Acești compuși includ sesquiterpenoide, diterpenoide, lactone sesquiterpenice, triterpenoide, steroide, flavonoide, cumarine și fenoli. Mulți dintre acești compuși prezintă activitatea fitotoxică [161] și activități farmacologice utile [162, 163]. Un studiu fitochimic recent vine să confirme încă odată complexitatea acestei plante. Extractului obținut din frunze, cu fluide supercritice (CO_2), a permis izolarea a 52 compuși din 10 clase chimice diferite [161].

Diterpenoidele *ent*-trachilobanice și *ent*-kauranice sunt elemente bioactive importante, ce rezultă dintr-un precursor biogenetic comun, cu toate acestea, conform datelor literare, există doar două surse vegetale în care acizii **219** și **4** se regăsesc în comun: *Trachylobium verrucosum* [105] și *Helianthus annuus L*. [6]. Astfel, acizii *ent*-trachiloban-19-oic (**219**), *ent*-kaur-16-en-19-oic (**4**) și 15α -angeloil-*ent*-kaur-16-en-19-oic (**307**) (Figura 2.1) au fost izolați din deșeurile de floarea-soarelui conform autorilor [7].



Fig. 2.1. Acizii *ent*-kaur-16-en-19-oic (**4**), *ent*-trachiloban-19-oic (**219**), 15α-angeloil-*ent*-kaur-16-en-19-oic (**307**) și esterii metilici respectivi **129**, **308** și **309**.

Materia primă, alcătuită din tulpini și inflorescențe de floarea-soarelui, uscate și în prealabil mărunțite, a fost supusă extracției cu eter etilic într-un extractor de tip Soxhlet. Temperatura de fierbere joasă a solventului, proprietățile aprotice și calitățile extractive înalte, vin să reducă la minimum posibilitatea de izomerizare a diterpenoidelor *ent*-kaurenoice si *ent*-trachilobanoice sub acțiunea speciilor cu caracter acid prezente în sursa vegetală. Tratarea concretului cu soluție de 5% de KOH reprezintă o cale de acumulare a compușilor de interes în partea acidă a extractului.

Parte acidă este apoi supusă cromatografiei pe coloană cu silicagel, fiind eluate două fracții. Prima fracție este formată din amestecul de acizi izomeri *ent*-trachiloban-19-oic (**219**) și *ent*-kaur-16-en-19-oic (**4**), izolați cu un randamentul de 35%, iar a doua fracție include derivatul C-15 funcționalizat al acidului *ent*-kaurenoic, acidul 15α -angeloil-*ent*-kaur-16-en-19-oic (**307**) obținut cu un randament de 17%. Cercetările fitochimice recente au demonstrat că acidul **307**, de rând cu acidul *ent*-kaur-16-en-19-oic (**4**) manifestă o activitate inhibitorie asupra alungirii coleoptilului, care persistă la diluare, iar la concentrații ridicate efectul se intensifică [161].

Datorită proprietăților cromatografice similare, separarea amestecului de acizi izomeri **219** și **4** a fost posibilă doar prin cromatografie pe coloană cu silicagel impregnat cu nitrat de argint [164]. Raportul acizilor *ent*-trachiloban-19-oic (**219**) și *ent*-kaur-16-en-19-oic (**4**) izolați din extract este de ~ 2:7. Structurile acizilor **219** și **4** a fost confirmată prin compararea datelor spectrale și fizico-chimice cu cele disponibile în literatura de specialitate.

Astfel, a fost efectuată extracția deșeurilor de floarea-soarelui și izolarea cromatografică a acizilor *ent*-kaur-16-en-19-oic (**4**), *ent*-trachiloban-19-oic (**219**) și 15α-angeloil-*ent*-kaur-16-en-19-oic (**307**) - compuși naturali importanți ce manifestă o gamă largă de activități biologice.

2.1.1. Studiul procesului de extracție a deșeurilor de floarea-soarelui cu diferiți solvenți

În direcția optimizării procesului de extracție al diterpenoidelor *ent*-kauranice și *ent*trachilobanice din deșeurile de floarea-soarelui, s-a efectuat un studiu de extracție cu diferiți solvenți. Eterul etilic are o putere extractivă înaltă, dar totodată, este un solvent ușor inflamabil și volatil, ceea ce a direcționat cercetările spre alți solvenți, mai siguri din punct de vedere tehnologic. Astfel, luând în calcul datele literare, cât și unele considerații proprii, studiul extracției deșeurilor de floarea-soarelui a fost efectuat folosind următorii solvenți: eter de petrol, diclorometan, acetonă, etanol și toluen [165].

În toate cazurile, aceiași cantitate de material vegetal uscat a fost extrasă cu un volum identic de solvent. Extracțiile au fost efectuate într-un extractor de tip Soxhlet, în 10 cicluri consecutive. După îndepărtarea solventului, toate extractele brute au fost cântărite și împărțite în fracții neutre și acide. Apoi, fracțiile acide provenite de la fiecare proces de extracție au fost tratate cu diazometan, generând esterii metilici respectivi, **129**, **308** și **309** (Figura 2.1). Identificarea și cuantificarea componentelor s-a efectuat cu ajutorul cromatografiei cu cuplate cu detector de masă (GC-MS). Extractul cu eter etilic este utilizat în calitate de referință (Tabelul 2.1).

Conform datelor de mai jos, componenta predominantă a tuturor extractelor este acidul *ent*-kaur-16-en-19-oic (**4**). Extractele obținute cu eter etilic și etanol conțin cele mai mari cantități de acid **4**, 22% și 21% respectiv, iar eterul de petrol a manifestat proprietăți extractive relativ joase. Cantitatea cea mai mare de acid 15α -angeloil-*ent*-kaur-16-en-19-oic (**307**) a fost extrasă cu etanol (1%), în timp ce conținutul maxim de acid *ent*-trachiloban-19-oic (**219**) este extras cu eter etilic (8%) [165].

	Solvent*	Masă	Parte	Conținutul relativ al esterilor metilici*** (%)			
No		extract**	acidă	Metil ent-	Metil-15α-angeloil-	Metil ent-	
				kaur-16-en-	ent-kaur-16-en-19-	trachiloban-19-	
		(g)	(g)	19- oat (129)	oat (308)	oat (309)	
1	Eter de petrol	1.583	0.839	0.8	0	1.0	
2	Diclorometan	2.572	1.126	12.0	0	2.0	
3	Acetonă	3.138	1.568	17.0	0.5	4.0	
4	Etanol	5.043	2.571	21.0	1.0	6.0	
5	Toluen	2.820	1.466	17.0	0.5	5.0	
6	Eter etilic	5.082	2.592	22.0	0.5	8.0	

Tabelul 2.1. Conținutul relativ al esterilor metilici 129, 308 și 309

* A fost utilizat un volum de 750 mL de solvent;

** Greutatea extractului obținut din 100 g din deșeuri uscate de floarea-soarelui;

*** Determinat în baza datelor GC-MS.

Luând în calcul rezultatele prezentate în Tabelul 2.1, etanolul este recomandat pentru o extracție eficientă a diterpenoidelor *ent*-kauranice și *ent*-trachilobanice, fiind un solvent ecologic și industrial aplicabil.

2.2. Izomerizarea superacidă a acidului *ent*-trachiloban-19-oic. Sinteza *retro*-biomimetică a diterpenoidelor naturale *ent*-kauranice, *ent*-atisanice și *ent*-beieranice.

Diterpenoidele tetraciclice *ent*-atisanice, *ent*-beieranice, *ent*-kauranice și cele pentaciclice *ent*-trachilobanice reprezintă un grup important de diterpenoide policiclice biogenetic strâns legate între ele, multe dintre care prezintă o gamă largă de activități biologice [35, 159, 166 - 168]. Toate aceste diterpenoide au o structură complexă și sinteza lor reprezintă o provocare de loc facilă. Există puține publicații ce țin de sinteza totală a beieranilor sau atisanilor, iar performanța lor generală este relativ mică [146, 169]. O altă cale ar fi sinteza parțială a acestora, în baza transformărilor biomimetice ale diterpenoidelor naturale disponibile, cum ar fi cele trachilobanice [105] sau kauranice [145, 170]. Această abordare s-a dovedit a fi mai eficientă, atât din punct de vedere al complexității, cât și a randamentul total.

Conform ipotezei lui Wenkert privind biogeneza diterpenoidelor [171], clasele discutate mai sus ar putea rezulta din (-)-copalil pirofosfat (\mathbf{E}) prin intermediul unui carbocation neclasic, spre exemplu \mathbf{F} (Figura 2.2). Astfel, în atenția noastră se ridică problema transformării biomimetice a *ent*-trachilobanului (\mathbf{C}) și a *ent*-kaurenului (\mathbf{B}) în *ent*-beieren (\mathbf{A}) sau *ent*-atisen (\mathbf{D}).



Fig. 2.2. Ipoteza biogenezei diterpenoidelor după Wenkert [171].

În baza ideilor de mai sus, a fost dezvoltată o cale semi-sintetică pentru obținerea compușilor biogenetic apropiați reieșind din acidul *ent*-trachiloban-19-oic (**219**) disponibil (vezi subcapitolul 2.1). Această abordare este foarte simplă și implică izomerizarea substratului într-o singură etapă cu obținerea produșilor scontați în baza principiului *retro*-biomimetice elaborat ($\mathbf{C} \rightarrow \mathbf{F} \rightarrow \mathbf{A}$, **B** sau **D**).

Izomerizarea diterpenoidelor *ent*-trachilobanice sub acțiunea diferitor reactivi a fost raportată anterior [172]. Cele mai multe dintre exemple se referă la reacțiile care implică formarea carbocationului neclasic de tip \mathbf{F} (Figura 2.2). Este bine cunoscut din lucrările lui Olah și colab. [173], că superacizii sunt buni generatori de astfel de specii, fiind promotori eficienți în ciclizarea terpenoidelor și în regrupări.

Astfel, tratarea acidului *ent*-trachiloban-19-oic (**219**) cu exces de acid fluorosulfonic (5 eq.) în condiții blânde (-60 °C), permite generarea carbocationului și, prin urmarea, obținerea

unor compuşi cu schelet regrupat [174 – 177]. Produsul de reacție brut a fost separat cromatografic, pe coloană cu silicagel, în două fracții cu compuşi nepolari și compuși polari. Fracția nepolară a fost cromatografiată pe coloană cu silicagel impregnat cu nitrat de argint. Eluarea în gradient cu benzen – benzen/acetat de etil a permis izolarea unei serii de compuşi izomeri cu schelete regrupate. În ordinea creșterii polarității au fost izolați următorii compuşi: acizii *ent*-atisenici - *ent*-atis-15-en-19-oic (**310**; 12%) și *ent*-atis-16-en-19-oic (**311**; 22%); acizii *ent*-kaurenici - *ent*-kaur-16-en-19-oic (**4**, 3%), *ent*-kaur-15-en-19-oic (**63**; 1%); și în final, acidul *ent*-beier-15-en-19-oic (**312**; 2%) (Figura 2.3).



Reagenți și condiții: (a) FSO₃H (5 eq.), *i*-PrNO₂/CH₂Cl₂, -60 °C, 15 min; (b) CH₂N₂, Et₂O, 30 min.

Fig. 2.3. Schema reacției de izomerizare superacidă a acidului ent-trachiloban-19-oic (219).

Structurile produșilor izolați au fost stabilite în baza datelor spectrale, ¹*H*- și ¹³*C*-RMN, *DEPT*, inclusiv experimentele bidimensionale (*HSQC*, *HMBC*, *COSY*, *NOESY*). Aceste structuri au fost confirmate și prin corelare chimică. Tratarea acizilor individuali, **4**, **64**, **310** – **312**, cu soluție eterică de diazometan a condus la obținerea cu randamente cantitative a esterilor metilici corespunzători: *ent*-kaur-16-en-19-oat de metil (**129**), *ent*-atis-15-en-19-oat de metil (**315**), *ent*-atis-16-en-19-oat de metil (**316**), *ent*-kaur-15-en-19-oat de metil (**317**) și *ent*-beier-15-en-19-oat de metil (**318**) (Figura 2.3).

Fracția polară a fost recromatografiată pe coloană cu silicagel, obținându-se doi derivați hidroxilici izomeri cu schelet atisanic, (16β) -16-hidroxi-*ent*-atisan-19-oic (**313**; 23%) și (16 α)-16-hidroxi-*ent*-atisan-19-oic (**314**; 16%) (Figura 2.3). Structurile produșilor izolați au fost stabilite în baza datelor spectrale și prin corelare chimică. Tratarea hidroxiacizilor cu soluție

eterică de diazometan a condus cantitativ la esterii metilici corespunzători **319** și **320** (Figura 2.3).

Astfel, izomerizarea superacidă a acidului *ent*-trachiloban-19-oic (**219**), generează cu preponderență diterpenoide *ent*-atisanice, randamentul total al compuşilor **310**, **311**, **313** și **314** fiind de circa 73% [177].



Fig. 2.4. Mecanismul propus al transformării *retro*-biomimetice a acidului *ent*-trachiloban-19-oic (**219**).

Conform ultimelor studii cunoscute, ce țin de biosinteza compușilor dați, transformarea acidului *ent*-trachiloban-19-oic (**219**) în compuși de tip *ent*-atisanic are loc prin intermediul carbocationului beieranil **A**, care, suferind o serie de migrări, generează carbocationul *ent*atisanil **D** ($\mathbf{A} \rightarrow \mathbf{B} \rightarrow \mathbf{D}$) (Figura 2.4). Ruperea protonului din pozițiile C₁₅ sau C₁₇, conduce la formarea legăturii duble izomere în acizii *ent*-atisenoici **310** și **311**. Compușii hidroxilați **313** și **314** se formează la interacțiunea carbocationului **D** cu o moleculă de apă. Acizii izomeri *ent*kaurenoici sunt generați pe calea $\mathbf{A} \rightarrow \mathbf{C}$, ca urmare a migrării grupei alchil din poziția C₁₃ în C₁₆. La pierderea unui proton din C₁₅ sau din C₁₇ respectiv, carbocationul terțiar *ent*-kaurenil **C** generează acizii *ent*-kaur-16-en-19-oic (**4**) și *ent*-kaur-15-en-19-oic (**63**). Acidul *ent*-beier-15-en-19-oic (**312**) este format direct din carbocationul **A**, la ruperea unui proton din centrul C_{15} .

În compușii **310** și **311** corelațiilor ${}^{1}H{}^{-1}H$ COSY ale atomilor de hidrogen din pozițiile $H_{\beta}{}^{-9} \leftrightarrow H_{2}{}^{-11} \leftrightarrow H{}^{-12} \leftrightarrow H_{2}{}^{-13}$, sugerează o conexiune C-12 – C-16, specifică scheletului *ent*-atisanic (Figura 2.5, Figura 2.6).

În spectrul *IR* al compusul **310** sunt prezente benzile de absorbție ale grupei carboxil $(3550 - 3220 \text{ şi } 1695 \text{ cm}^{-1})$ şi ale legăturii duble (3050 şi 1467 cm⁻¹). În spectrul ¹*H NMR* sunt prezente semnalele singlet ale grupelor metil din C-17, C-18 şi C-20 (1.76, 1.25 şi 0.90 ppm), şi semnalul singlet al protonului din poziția C-15 de la legătura dublă endociclică (5.58 ppm).



Fig. 2.5. Corelatii ${}^{1}H^{-13}C$ HMBC si ${}^{1}H^{-1}H$ COSY selectate ale compusilor **310** si **315**.

Spectrul ¹³*C RMN* confirmă prezența în moleculă acestui compus a grupelor metil din pozițiile C-17 (20.0 ppm), C-18 (28.9 ppm) și C-20 (11.9 ppm), și a 8 grupe metilenice. De asemenea, din spectrul carbonic observăm semnalele carbonilor cuaternari din pozițiile C-4 (43.7 ppm), C-8 (37.4 ppm), C-10 (38.0 ppm) și C-16 (140.3 ppm), semnalul grupei carboxil din poziția C-19 (182.7 ppm) și ale carbonilor trisubstituiți C-5, C-9, C-12 și C-15 de la 57.2, 53.3, 35.9 și 135.9 ppm, legătura dublă fiind localizată la atomii de carbon din pozițiile C-15 și C-16. Unele corelații *HMBC*, ce confirmă atribuirile de mai sus, sunt: H₃-20 \rightarrow C-1, C-5, C-9, C-10; H₃-18 \rightarrow C-3, C-4, C-5, C-19; H_β-9 \rightarrow C-8, C-10, C-11, C-12, C-14; H₂-13 \rightarrow C-8, C-11, C-14, C-16; H-15 \rightarrow C-8, C-16 (Figura 2.5). Datele spectrale ale esterului metilic corespunzător **315**, coincid cu cele din literatură [178].

Acidul **311** în spectrul *IR* prezintă benzi de absorbție ale grupei carboxil (3550 - 3200 și 1690 cm⁻¹) și ale legăturii duble (3040 cm^{-1}). În spectrul ¹*H NMR* sunt prezente semnalele singlet ale grupelor metil din centrele C-18 și C-20 (1.24 și 0.90 ppm), și semnalele dublet monoprotonice ale grupei exometilenice din C-17 (4.73, 4.57 ppm). Spectrul ¹³*C RMN* atestă prezența în moleculă a grupelor metil în C-18 (28.9 ppm) și C-20 (12.1 ppm) și a 10 grupe

metilenice, dintre care se evidențiază grupa metilenică din C-17 (135.9 ppm). De asemenea, din spectrul carbonic observăm semnalele carbonilor cuaternari din pozițiile C-4 (43.7 ppm), C-8 (33.6 ppm), C-10 (38.4 ppm), C-16 (152.8 ppm), semnalul grupei carboxil din poziția C-19 (182.3 ppm) și semnalel carbonilor trisubstituiți C-5, C-9 și C-12 de la 57.2, 52,2 și 36.6 ppm. Unele corelații *HMBC*, ce confirmă atribuirile de mai sus, sunt: H₃-20 \rightarrow C-1, C-5, C-9, C-10; H₃-18 \rightarrow C-3, C-4, C-5, C-19; H_β-9 \rightarrow C-8, C-10, C-11, C-12, C-14; H₂-13 \rightarrow C-8, C-11 și C-16; H₂-15 \rightarrow C-8, C-12, C-14 și C-16 (Figura 2.6). Datele spectrale ale acidului **311** [179] și esterului **316** [178 - 180] coincid cu cele din literatură.



Fig. 2.6. Corelații ${}^{1}H - {}^{13}C HMBC$ și ${}^{1}H - {}^{1}H COSY$ selectate ale compușilor **311** și **316**.

În spectrul ${}^{1}H{}^{-1}H COSY$ ale acizilor **63** și **4** se observă corelații între protonii H_β-9 \leftrightarrow H₂-11 \leftrightarrow H₂-12 \leftrightarrow H_α-13 \leftrightarrow H₂-14, ce sugerează o conexiune între centrele C-13 – C-16, caracteristică diterpenodelor *ent*-kauranice.

Acidul **63** în spectrul *IR* prezintă benzi de absorbție specifice grupei carboxil (3540 – 3200 și 1690 cm⁻¹) și ale legăturii duble (3030 cm⁻¹). Legătura dublă este poziționată la carbonii C-15 – C-16. În spectrul ^{*I*}*H NMR* sunt prezente semnalele singlet ale grupelor metil din C-17, C-18 și C-20 (1.70, 1.23 și 0.97 ppm), și semnalul singlet monoprotonic din poziția C-15 (5.06 ppm). Spectrul ^{*I3*}*C RMN* atestă prezența în moleculă a grupelor metil din C-18 (28.9 ppm) și C-20 (15.4 ppm) și a 8 grupe metilenice. De asemenea, din spectrul carbonic observăm semnalele carbonilor cuaternari din pozițiile C-4 (43.7 ppm), C-8 (33.6 ppm), C-10 (38.4 ppm), C-16 (152.8 ppm), semnalul grupei carboxil din poziția C-19 (182.3 ppm) și a carbonilor trisubstituiți din C-5, C-9, C-13 și C-15 (56.9, 48.2, 44.8 și 135.2 ppm), legătura dublă fiind localizată la atomii de carbon din pozițiile C-15 – C-16. Unele corelații *HMBC*, ce confirmă atribuirile de mai sus, sunt: H₃-20 → C-1, C-5, C-9 și C-10; H₃-18 → C-3, C-4, C-5 și C-19; H_β-9 → C-8, C-10, C-11, C-14, C-15; H_α-13 → C-12, C-14, C-15 și C-16 (Figura 2.7). Datele spectrale ale acidului **63** [54] și esterului **317** [145] coincid cu cele din literatură. Acidul **63** a fost raportat ca componentă bioactivă a plantelor din specia *Wedelia biflora* și manifestă proprietăți antifungică și antifedantă [181].



Fig. 2.7. Corelații ${}^{1}H - {}^{13}C HMBC$ și ${}^{1}H - {}^{1}H COSY$ selectate ale compușilor 63 și 317.

În spectrul *IR*, compusului **312** prezintă benzile de absorbție ale grupei carboxil (3600 – 3200 și 1685 cm⁻¹) și ale legăturii duble (3025, 1580 și 740 cm⁻¹). Corelațiile ¹*H*-¹*H* COSY ale protonilor H-9 \leftrightarrow H₂-11 \leftrightarrow H₂-12, sugerează un compus de tip *ent*-beieranic (Figura 2.8). În spectrul ¹*H* NMR sunt prezente semnalele singlet ale grupelor metil din C-17 și C-20 (1.01 și 0.69 ppm) și a metilului din C-18 (1.26 ppm), semnalele dublet monoprotonice ale legăturii duble endociclice, C-15 (5.45 ppm, 5.47 ppm) și C-16 (5.72 ppm, 5.74 ppm). Spectrul ¹³*C* RMN confirmă prezența a trei grupe metil, din pozițiile C-17 (24.9 ppm), C-18 (29.1 ppm) și C-20 (13.8 ppm), și a 8 grupe metilenice. De asemenea, din spectrul carbonic observăm semnalele carbonilor cuaternari din pozițiile C-4 (43.9 ppm), C-8 (49.2 ppm), C-10 (37.7 ppm), C-13 (43.7) și a carbonilor trisubstituiți C-15 (134.8 ppm) și C-16 (136.5 ppm) de la legătura dublă, și a celor din pozițiile C-5 (57.2 ppm) și C-9 (52.4 ppm).



Fig. 2.8. Corelații ${}^{1}H - {}^{13}C HMBC$ și ${}^{1}H - {}^{1}H COSY$ selectate ale compușilor **312** și **318**.

Corelațiile *HMBC*, ce confirmă atribuirile de mai sus, sunt: $H_3-20 \rightarrow C-1$, C-5, C-9 și C-10; $H_3-18 \rightarrow C-3$, C-4, C-5 și C-19; $H_{\beta}-9 \rightarrow C-8$, C-10, C-11; $H_2-14 \rightarrow C-8$, C-9, C-12, C-13; $H_3-17 \rightarrow C-12$, C-13, și C-16 (Figura 2.8). Această structură a fost confirmată și prin corelare chimică cu esterul metilic corespunzător **318**, obținut la tratarea acidului individual cu soluție eterică de diazometan. Datele spectrale și constantele fizico-chimice ale compușilor **312** și **318** corespund cu datele descrise în literatură [170, 179].

Hidroxiacidul **313** este caracterizat în spectrul *IR* de benzile de absorbţie specifice grupei carboxil (1690 cm⁻¹) și a grupei hidroxil (3420 cm⁻¹). În spectrul ^{*I*}*H NMR* sunt prezente semnalele singlet ale grupelor metil din C-17, C-18 și C-20 (1.30, 1.26 și 0.90 ppm). Spectrul ^{*I*3}*C RMN* atestă prezența în moleculă a grupelor metil în C-17 (30.7 ppm), C-18 (28.9 ppm) și C-20 (12.1 ppm) și a 9 grupe metilenice. Semnalele carbonilor cuaternari din pozițiile C-4, C-8, C-10 și C-16 se găsesc la 43.7, 33.7, 38.2 și 72.4 ppm, semnalul grupei carboxil din poziția C-19 la 183.5 ppm, iar semnalele carbonilor trisubstituiți C-5, C-9 și C-12 le găsim la 57.2, 50.9 și 37.9 ppm. Unele corelații *HMBC*, ce confirmă atribuirile de mai sus, sunt: H₃-20 \rightarrow C-1, C-5, C-9, C-10; H₃-18 \rightarrow C-3, C-4, C-5, C-19; H₂-15 \rightarrow C-8, C-12, C-14; H₂-14 \rightarrow C-7, C-8, C-13; H₂-13 \rightarrow C-12, C-14 și C-16 (Figura 2.9). Stereochimia relativă a grupei OH din poziția C-16 a fost stabilită în baza experimentului *NOESY RMN*, ce atestă corelația dintre atomi de hidrogen din pozițiile H_a-13 \leftrightarrow H-17, ceea ce ne-ar indica că metilul din C-17 este α -orientat, și respectiv OH este β -orientat (Figura 2.9). Esterul metilic **319** corespunzător a fost obținut la tratarea acidului individual **313** cu soluție eterică de diazometan. Datele spectrale ale acidului **313** [182] și ale esterului metilic **319** [183] coincid cu cele din literatură.



Fig.2.9. Corelații cheie ${}^{1}H^{-13}C$ HMBC, ${}^{1}H^{-1}H$ COSY și NOESY ale compușilor **313** și **319**.

În spectru *IR* hidroxiacidul **314** prezintă benzi de absorbție specifice grupei carboxil (1690 cm⁻¹) și a grupei hidroxil (3350 cm⁻¹). În spectru ^{*I*}*H NMR* sunt prezente semnalele singlet ale grupelor metil din C-17, C-18 și C-20 (1.31, 1.26 și 0.90 ppm). Spectrul ^{*I3*}*C RMN* atestă prezența în moleculă a trei grupe metil în C-17 (30.5 ppm), C-18 (28.9 ppm) și C-20 (12.0 ppm)

și a 9 grupe metilenice. Semnalele carbonilor cuaternari din pozițiile C-4, C-8, C-10 și C-16 se găsesc la 43.7, 33.8, 38.3 și 72.2 ppm, semnalul grupei carboxil din poziția C-19 la 183.0 ppm, iar semnalele carbonilor trisubstituiți C-5, C-9 și C-12 se găsesc la 57.1, 50.6 și 38.0 ppm.

Unele corelații *HMBC*, ce confirmă atribuirile de mai sus, sunt: $H_3-20 \rightarrow C-1$, C-5, C-9, C-10; $H_3-18 \rightarrow C-3$, C-4, C-5, C-19; $H_2-15 \rightarrow C-8$, C-12, C-14; $H_a-13 \rightarrow C-8$, C-11, C-12, C-14 și C-16 (Figura 2.10). În cazul dat, corelația dintre atomi de hidrogen din pozițiile $H_a-13 \leftrightarrow H-17$ lipsește, ceea ce indică asupra unei configurații inverse a centrului C-16 în comparație cu izomerul **313**, metilul C-17 fiind β -orientat, iar OH – α -orientat (Figura 2.10). Esterul metilic corespunzător **320** a fost obținut la tratarea acidului individual **314** cu soluție eterică de diazometan. Datele spectrale ale acidului **314** [182] și ale esterului **320** [184] coincid cu cele din literatură.



Fig. 2.10. Corelații selectate ${}^{1}H-{}^{13}C HMBC$ și ${}^{1}H-{}^{1}H COSY$ ale compușilor **314** și **320**.

Acizii diteprenici obținuți reprezintă compuși naturali și sunt cunoscuți de o perioadă îndelungată de timp, totuși activitatea lor biologică rămâne a fi puțin explorată. Unele studii recente au relevat date destul de surprinzătoare. De exemplu, acidul *ent*-beier-15-en-19-oic **312** izolat din rădăcinile plantelor medicinale mexicane *Viguiera hypargyrea*, a demonstrat o activitate antispasmotică și antimicrobiană la concentrații scăzute [18]. De asemenea, multe diterpenoide *ent*-atisanice posedă activitate citotoxică [185 – 187].

Astfel, izomerizarea superacidă al acidului *ent*-trachiloban-19-oic (**219**) generează o serie de compuși naturali, predominând diterpenoidele *ent*-atisanice, compuși ce manifestă activitate citotoxică.

2.3. Funcționalizarea acidului *ent*-trachiloban-19-oic cu diacetat de iodobenzen și bromură de litiu (PhI(OAc)₂ - LiBr)

Dacă privim inelul ciclopropanic din componența scheletului *ent*-trachilobanic, drept centru reactiv asemănător legăturii duble, o direcție promițătoare reprezintă oxidarea acestuia. Această abordare este echivalentă cu scindarea inelului și obținerea unor compuși regrupați cu un grad de funcționalizare mai ridicat. În acest sens, având ca punct de pornire oxidarea legăturii duble, dihidroxilarea ar fi o cale de funcționalizare interesantă. Astfel, "dihidroxilarea" substratului terpenic a fost realizată în baza unei metode catalitice elaborate de Sudalai și colab. [188]. Conform metodei, reacția se petrece în mediu de acid acetic, ceea ce este un plus în cazul dat, deoarece, în literatură deschiderea inelului ciclopropanic este efectuată preponderent în condiții acide [140, 141].

Astfel, acidul *ent*-trachiloban-19-oic (**219**) a fost tratat cu PhI(OAc)₂ și LiBr, în mediu de acid acetic, la temperatura de 95 °C [189]. După 18 ore produsul de reacție, ce reprezintă un amestec complex, a fost supus cromatografiei pe coloană. Eluarea în gradient cu eter de petrol – eter de petrol/acetat de etil a permis izolarea a doi compușii noi funcționalizați cu schelete regrupate, compusul minor acidul (13 β , 15 β)-13,15,17-tribromo-*ent*-atis-16Z-en-19-oic (**321**) și compusul majoritar scontat, acidul (12 β)-12-hidroxi-16 α -acetoxi-*ent*-kauran-19-oic (**322**) (Figura 2.11). Randamentul total al compușilor constituie 72% [189], iar structurile lor au fost stabilite în baza datelor spectrale.



Reagenți și condiții: (a) PhI(OAc)₂ (1 eq.), LiBr (20 mol/%), AcOH, 95 °C, 18 ore.

Fig. 2.11. Schema reacției acidului ent-trachiloban-19-oic (219) cu PhI(OAc)₂ – LiBr.

Transformarea dată uimește prin selectivitate înaltă, derivatul *ent*-kauranoic fiind obținut cu un randament de circa 60%. Acest fenomen nu este caracteristic reacțiilor de izomerizare, reacția dată prezentând un interes deosebit din punct de vedere sintetic. Datorită gradului înalt de funcționalizare compușii dați prezintă un potențial sporit de activitate biologică, fiind incluși în studii curente ce țin de activitatea citotoxică testată pe diferite linii de celule canceroase.

Realizând reacția cu al doilea sistem oxidant, NaIO₄ - LiBr, conform metodicii [188] s-a obținut un amestecul foarte complex și nu s-a reușit izolarea vreunui compus.

Conform ipotezei biogenezei, inelul ciclopropanic în *ent*-trachilobani poate scinda în trei moduri diferite (Figura 2.12), generând astfel diterpenoide biogenetic legate: *ent*-atisani, *ent*-beierani și *ent*-kaurani.



Fig. 2.12. Căi de scindare ale inelului ciclopropanic în diterpenoidele ent-trachilobanice.

În natură se întâlnesc o gamă largă de compuşi terpenici halogenați, iar algele marine roșii sunt o sursă bogată de metaboliți bromurați, inclusiv derivați diterpenici. Ce ține de mecanismul formării unor astfel de compuşi, în natură aceștia se obțin preponderent prin strategii oxidative, cu formarea ionului de bromoniul. Pornind de la ideea de mai sus, o posibilă cale de obținere a compusului **321** este propusă mai jos, iar drept model a servit reacția de adiție a halogenilor la legătura dublă (Figura 2.13). În acest caz, inelul ciclopropanic scindează pe calea **b**, cu generarea scheletului atisanic.



Fig. 2.13. Mecanismul propus de formare a compusului $(13\beta, 15\beta)$ -13,15,17-tribromo-*ent*-atis-16Z-en-19-oic (**321**).

Astfel, bromurarea acidului *ent*-trachiloban-19-oic (**219**) duce, în primă fază, la ionul de bromoniu **Ib**, care la adiție generează atesanil carbocationul **IIb**. Acesta, prin eliminarea unui proton conduce la compusul *ent*-atisenic bromurat **IIIb**. Urmează bromurarea legăturii duble în

IIIb și eliminarea unei molecule de HBr, cu formarea intermediarului **IVb**. În continuare, se presupune că are loc o substituție alilică la centrul C_{15} , care ar putea fi explicată prin apariția speciilor active de Br sub acțiunea temperaturii înalte (95 °C) timp îndelungat, iar poziția dată fiind steric accesibilă. Astfel, presupusa bromurare alilică a intermediarului **IVb**, generează compusul **321**. Randamentul acidului tribromurat **321** constituie doar 11%, dar luând în calcul complexitatea transformărilor și produsul în sine, este acceptabil.

Compus **321**, conform spectrelor protonic, carbonic și prin analiza corelațiile experimentelor bidimensionale au fost atribuite grupa carboxil, o legătură dublă, trei grupe CH-Br și două grupe metil. Corelațiile ${}^{1}H \cdot {}^{1}H COSY$ ale protonilor H_{β} -9 \leftrightarrow H_{2} -11 \leftrightarrow H-12 \leftrightarrow H_{2} -13, au sugerat o conexiune a carbonilor C-12 – C-16, specifică scheletului atisanic. Spectru *IR* prezintă benzi de absorbție specifice grupei carboxil (1690 cm⁻¹), legăturii duble exociclice (3040 cm⁻¹) și atomilor de Br (750 cm⁻¹). În spectrul ${}^{1}H NMR$ sunt prezente semnalele singlet ale grupelor metil din C-18 și C-20 (1.26 și 1.04 ppm), semnalul dublet al protonului din C-17 de la legătura dublă exociclică, la 6.24 – 6.25 ppm, semnalele singlet monoprotonice grupei –CH– din poziția C-15 la 4.27 ppm. Spectrul ${}^{13}C RMN$ atestă prezența în moleculă a grupelor metil în C-18 (28.9 ppm) și C-20 (14.05 ppm) și a șapte grupe metilenice. Semnalele carbonilor cuaternari din poziția C-19 la 183.3 ppm, iar semnalele carbonilor trisubstituiți C-5, C-9, C-12, C-13, C-15 și cel de la legătura dublă se regăsesc la 56.0, 50.0, 45.0, 47.8, 61.5 și 106.8 ppm.



COSY: H—H HMBC: H C NOESY: H H Figura 2.14. Corelații ${}^{1}H{-}^{13}C$ HMBC, ${}^{1}H{-}^{1}H$ COSY și NOESY cheie, și configurația relativă atribuită compusului **321**.

Unele corelații *HMBC*, ce confirmă atribuirile de mai sus, sunt: H₃-20 \rightarrow C-1, C-5, C-9, C-10; H₃-18 \rightarrow C-3, C-4, C-5, C-19; H_a-13 \rightarrow C-12, C-14; H₂-14 \rightarrow C-7, C-8, C-13; H-15 \rightarrow

C-13, C-14, C-16; H-17 \rightarrow C-16 (Figura 2.14). Stereochimia relativă a compusului **321** a fost stabilită prin analizarea corelațiilor *NOESY*. Joncțiunea stereospecifică a inelelor A, B, C și D este caracteristică diterpenoidelor *ent*-atisanice [179, 190]. Corelarea *NOESY* puternică H-13 \leftrightarrow H-14 și una mai slabă H-13 \leftrightarrow H_β-12, precum și, corelarea H-15 \leftrightarrow H_β-9 au sugerat că protonii H-13 și H-15 sunt β-orientați, și respectiv atomii Br-13 și Br-15 sunt α-orientați. Configurația legăturii duble a fost considerată Z (*cis*), în baza corelației H-17 \leftrightarrow H-12 (Figura 2.14). Astfel, structura compusului **321** a fost elucidată ca fiind acidul (13 β , 15 β)-13,15,17-tribromo-*ent*-atis-16Z-en-19-oic.

În cazul compusului **322**, inelul ciclopropanic a fost scindat pe calea **a**, generând schelet *ent*-kauranic. Acesta practic reprezintă un produs de reacție scontat, conform metodicii de dihidroxilarea a alchenelor catalizată de LiBr, mediată de un oxidant, în cazul dat, $PhI(OAc)_2$ în AcOH [188]. Conform ciclului catalitic propus de autori, Br₂ generat *in situ*, la oxidarea bromurei de litiu conduce rapid la bromoacetoxilarea substratului prin intermediul ionului de bromonium **Ia** și carbocationului *ent*-kauranil **IIa**, obținându-se produsul intermediar **IIIa**. Acesta, în prezență de PhI(OAc)₂ și asistată de grupa acetoxi, pierde Br și generează specia **IVa**, care la interacțiunea cu un nucleofil, în cazul dat apa, conduce la derivatul *ent*-kauranic **322** (Figura 2.15).



Fig. 2.15. Cale presupusă de obținere a compusului (12β) -12-hidroxi-16 α -acetoxient-kauran-19-oic (**322**).

Compusul majoritar **322**, conform spectrelor protonic, carbonic și a corelațiilor bidimensionale conține grupele carboxil, hidroxil, acetoxi și trei grupe metilice. Spectrul *IR* prezintă benzi de absorbție specifice grupei carboxil (1687 cm⁻¹), grupei hidroxil (3388 cm⁻¹) și a grupei acetoxi (1738 și 1255 cm⁻¹). Corelații ¹*H*-¹*H* COSY ale protonilor H_{β} -9 \leftrightarrow H₂-11 \leftrightarrow H₂-12 \leftrightarrow H_{α}-13 \leftrightarrow H₂-14 a sugerat o legătură C-13 – C-16 caracteristică diterpenoidelor *ent*- kauranice. În spectrul ¹*H NMR* sunt prezente semnalele singlet ale grupelor metil din pozițiile C-17, C-18 și C-20 (1.58, 1.24 și 1.01 ppm) și semnalul singlet al grupei metil din componența grupei OAc (2.00 ppm). De asemenea, se regăsesc semnalele multiplet și triplet al protonilor din pozițiile C-12 (4.40 ppm) și C-13 (2.67 ppm). Spectrul ¹³*C RMN* indică prezența în moleculă a grupelor metil în centrele C-17 (24.4 ppm), C-18 (28.9 ppm) și C-20 (12.9 ppm), a grupei metil din cadrul grupei OAc (22.3 ppm) și a opt grupe metilenice. Semnalele carbonilor cuaternari din pozițiile C-4, C-8, C-10 și C-16 se găsesc la 43.6, 34.3, 38.2 și 82.6 ppm. Semnalele grupelor carboxil din C-19 și acetoxi se regăsesc la 183.3 și 170.3 ppm, respectiv. Carbonii trisubstituiți din pozițiile C-5, C-9, C-12 și C-13 se află la 56.5, 49.5, 49.2 și 43.4 ppm.

Unele corelații *HMB*C, ce confirmă atribuirile de mai sus, sunt: $H_3-20 \rightarrow C-1$, C-5, C-9 și C-10; $H_3-18 \rightarrow C-3$, C-4, C-5 și C-19; $H_{\beta}-9 \rightarrow C-8$, C-10, C-11; $H_a-13 \rightarrow C-12$, C-16; $H_2-15 \rightarrow C-7$, C-8, C-13, C-14, C-16; $H_3-17 \rightarrow C-13$, C-16, OAc (Figura 2.16). Stereochimia relativă a compusului **322** a fost stabilită prin analiza corelațiilor *NOESY*. Prezența efectului Overhauser între protonii $H_{\beta}-9$ și H-12, vine să confirme α -orientarea grupei hidroxil din poziția C-12. Totodată, existența corelației între protonii H-12 \leftrightarrow H₃-17 indică că metilul din C-17 este β orientat, iar grupa OAc este α -orientată (Figura 2.16). Compusul majoritar (61%) reprezintă un derivat *ent*-kauranic, funcționalizat în pozițiile C-12 și C-16, și a fost identificat ca acidul (12 β)-12-hidroxi-16 α -acetoxi-*ent*-kauran-19-oic (**322**).



Fig. 2.16. Corelații ${}^{1}H^{-13}C$ HMBC, ${}^{1}H^{-1}H$ COSY și NOESY cheie, și configurația relativă atribuită compusului **322**.

Derivați *ent*-kauranici funcționalizați în poziția C-12 sunt destul de rar întâlniți în natură, cel mai frecvent raportat fiind acidul 12α -hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oic [191, 192] și o serie de derivați ai acidului grandifloric.

Astfel, interacțiunea acidului *ent*-trachiloban-19-oic (**219**) cu PhI(OAc)₂ și LiBr, în mediu de acid acetic a generat doi compuși cu schelet regrupat, acidul (13β , 15β)-13,15,17-tribromo-*ent*-atis-16Z-en-19-oic (**321**) și compusul majoritar scontat, acidul (12β)-12-hidroxi-16 α -acetoxi-*ent*-kauran-19-oic (**322**).

2.4. Transformări sintetice ale acidului ent-trachiloban-19-oic. Partea experimentală

Metode generale de sinteză și de studiu. Punctele de topire (p.t.) au fost determinate cu aparatul Boetius. Unghiul de rotație specifică a fost măsurat cu polarimetrul JASCO DIP 370 în cloroform. Spectrele în infraroșu (*IR*) au fost înregistrate pe spectrofotometrul Spectrum-100FT-IR (Perkin-Elmer) în tetraclorură de carbon, ulei de vaselină, bromură de potasiu sau în peliculă. Spectrele de rezonanță magnetică nucleară ¹*H* și ¹³*C RMN*, cât și experimentele bidimensionale au fost înregistrate pe spectrometrul Bruker Avance DRX-400 (400 și 100 MHz). Valoarea deplasărilor chimice este dată în sistemul ô ppm în coraport cu semnalele CHCl₃ ($\delta_{\rm H}$ 7.26 ppm) și CHCl₃ ($\delta_{\rm C}$ 77.00 ppm) sau DMSO-*d*₆ ($\delta_{\rm H}$ 2.50 ppm) și DMSO-*d*₆ ($\delta_{\rm c}$ 39.52 ppm). Constanta de cuplare (*J*) este raportată în Hertz (Hz). Spectrele de masă (MS-EI) au fost înregistrate pe spectrometrul AEI MS-902 la o tensiune de ionizare EI, 70 eV. Monitorizarea procesului chimic, cât și determinarea conținutului relativ al produșilor în extracte a fost efectuată la cromatograful cu gaze Agilent – 7890 cu detector MS cuadrupolar MSD 5975C și coloană capilară HP - 5ms (30 m/0.25 mm). Analiza elementală a fost realizată la analizatorul de elemente CHNOS,Vario EL III.

Obținerea și prelucrarea extractului natural include plasarea materialului vegetal uscat și mărunțit în extractorul de tip Soxhlet și extracția cu solventul ales. Urmează spălarea cu soluție de 5% NaOH, extracția ulterioară cu Et_2O , spălarea extractului cu soluție saturată de NaCl până la reacție neutră, uscare pe Na₂SO₄ anh. și distilarea solventului la presiune redusă. Prelucrarea produșilor de reacție include extracția exhaustivă cu eter etilic sau acetat de etil, spălarea cu soluție saturată de NaCl până la reacție neutră, iar în cazul extractelor acide, spălarea cu soluție de bicarbonat de sodiu și apoi cu soluție saturată de NaCl. Extractele organice sunt uscate pe Na₂SO₄ anh. și filtrate, iar solventul este distilat în vid.

Cromatografia pe coloană (CC) s-a efectuată cu silicagel 60 Merck (70 - 230 mesh; ASTM). Coloanele au fost eluate cu eter de petrol (p.f. 40 - 60 °C), cu amestec de eter de petrol (EP)– eter de petrol/acetat de etil (EP/EtOAc) în gradient, sau cu amestec de benzen – benzen/acetat de etil (benzen/EtOAc) în gradient. Monitorizarea reacțiilor a fost efectuată prin metoda cromatografiei în strat subțire (CSS) pe plăci cu silicagel Merck (60 G, 0.25 mm). Developarea plăcilor a fost realizată prin cufundare în soluția de 0,1% sulfat de ceriu (IV) în H₂SO₄ 2N, urmată de încălzire la 80 °C timp de 1 min.

Izolarea acizilor ent*-trachiloban-19-oic*, ent*-kaur-16-en-19-oic* şi 15α-angeloil-entkaur-16-en-19-oic din deşeuri de floarea-soarelui (Helianthus annuus L.)

1. Extracția deșeurilor de floarea-soarelui cu eter etilic. Tulpinile și inflorescențele (800 g), rămase după procesarea florii-soarelui, uscate și mărunțite, sunt plasate în Soxhlet și sunt extrase cu Et₂O timp de 2 ore. După distilarea solventului, s-au obținut 85 g de extract crud de culoare brună, 24 g fiind redizolvate în eter etilic și tratate cu soluție apoasă de 5% KOH (40 mL). Faza apoasă se separă și se acidulează cu soluție de 10% H₂SO₄ (20 mL), apoi se extrage cu Et₂O, se spală cu soluție salină până la reacție neutră și se concentrează la presiune redusă. Partea acidă obținută (18 g ulei galben-maroniu) a fost percolată pe coloană cu silicagel (300 g) și eluată în gradient cu EP – EP/EtOAc, obținându-se mai multe fracții. Prima fracție corespunde amestecului de acizi izomeri *ent*-trachiloban-19-oic (**219**) și *ent*-kaur-16-en-19-oic (**4**) (6.19 g, 35%). A doua fracție corespunde acidului 15α-angeloil-*ent*-kaur-16-en-19-oic (**307**) (3.11 g, 17%).

2. Separarea cromatografică a amestecului de acizi ent-trachiloban-19-oic și ent-kaur-16-en-19-oic. Amestecul de acizi (4) și (219) recristalizat (1.74 g) a fost percolat pe coloană cu SiO₂ (50 g) impregnat cu AgNO₃ (5.5 g) și eluat cu EP/EtOAc 1% - 2% , obținându-se 0.47 g de acid ent-trachiloban-19-oic (219) (28%) și 1.26 g de acid ent-kaur-16-en-19-oic (4) (72%).



Acidul ent-trachiloban-19-oic (**219**)

substanță cristalină, p.t. 124 – 126 °C ([136]: p.t. 125 – 127 °C); $[\alpha]_D^{20} = -43^\circ, c \ 1.5, CHCl_3 ([136]: [\alpha]_D^{20} = -52^\circ, c \ 0.8, CHCl_3);$ *IR* (v, cm⁻¹): 2846, 1691, 1443, 1261, 1178, 1022, 798, 630, 535; ^{*I*}*H NMR* (400 MHz, δ H): 0.87 (3H, s, Me-20), 1.13 (3H, s, Me -17), 1.21 (3H, s, Me -18);

¹³C NMR (100 MHz, δC): 12.5 (q, C-20), 18.7 (t, C-2), 19.8 (t, C-11), 20.6 (t, C-12), 20.7 (q, C-17), 21.8 (t, C-6), 22.4 (s, C-16) 24.3 (d, C-13), 28.9 (q, C-18), 33.2 (t, C-14), 37.9 (t, C-3), 38.9 (s, C-10), 39.3 (t, C-7), 39.4 (t, C-1), 40.8 (s, C-8), 43.7 (s, C-4), 50.4 (t, C-15), 52.8 (d, C-9), 57.0 (d, C-5), 184.5 (s, C-19);

Calcule analit. C₂₀H₃₀O₂: C 79.42, H 10.00; găsit: C 79.39, H 9.98.



Acidul ent-kaur-16-en-19-oic (**4**) substanță cristalină, p.t. 177 – 179 °C ([38]: p.t. 179 – 181 °C); $[\alpha]_D^{20} = -105^\circ$, c 2.3, CHCl₃ ([38]: $[\alpha]_D^{20} = -110^\circ$, c 3.0, CHCl₃); IR (v, cm⁻¹): 2937, 1686, 1258, 874, 794, 635, 530; ¹H NMR (400 MHz, δ H): 0.95 (3H, s, Me-20), 1.24 (3H, s, Me-19), 2.64 (1H, s, H-13), 4.74 (1H, s, H_a-17), 4.80 (1H, s, H_b-17); ¹³C NMR (100 MHz, δ C): 15.6 (q, C-20), 18.5 (t, C-11), 19.1 (t, C-2), 21.9 (t, C-6), 29.0 (q, C-18), 33.2 (t, C-14), 37.8 (t, C-3), 39.7 (s, C-10), 39.7 (t, C-12), 40.7 (t, C-1), 41.3 (s, C-4), 41.3 (t, C-7), 43.8 (d, C-13), 44.3 (s, C-8), 49.0 (t, C-15), 55.1 (d, C-9), 57.1 (d, C-5), 103.4 (t, C-17), 155.9 (s, C-16), 184.8 (s, C-19). *Calcule analit.* C₂₀H₃₀O₂: C 79.42, H 10.00; găsit: C 79.41, H 9.96.



*Acidul 15α-angeloil-*ent*kaur-16-en-19-oic* (**307**) *substanță cristalină, p.t.* 195 – 197 °C ([193]: *p.t.* 197 – 199 °C); *IR* (v, cm⁻¹): 3206-2450, 1705, 1255, 1040, 1010, 890;

¹*H NMR* (400 MHz, δH): 0.95 (3H, s, Me -20), 1.25 (3H, s, Me -18), 1.88 (3H, s, H-2'), 1.96 (3H, dq, J = 8, H-4'), 2.78 (1H, s, H-13), 5.42 (1H, s, H-15), 5.09 (1H, s, H_a-17), 5.20 (1H, s, H_b-17), 6.08 (1H, qq, J = 8, H-3');

¹³C NMR (100 MHz, δC): 40.4 (t, C-1), 18.9 (t, C-2), 35.3 (t, C-3),
43.7 (s, C-4), 56.5 (d, C-5), 20.6 (t, C-6), 37.3 (t, C-7), 47.8 (s, C-8),
53.1 (d, C-9), 39.7 (s, C-10), 20.7 (t, C-11), 32.5 (t, C-12), 42.7 (d,
C-13), 37.9 (t, C-14), 82.5 (d, C-15), 155.8 (s, C-16), 110.3 (t, C-17), 28.7 (q, C-18), 185.2 (s, C-19), 15.9 (q, C-20), 168.3 (s, C-1'),
128.6 (s, C-2'), 137.4 (d, C-3'), 15.9 (q, C-4'), 18.6 (q, C-5').
Calcule analit. C₂₅H₃₆O₄: C 74.96, H 9.06; găsit: C 74.89, H 9.08.

3. Esterificarea acizilor 4, 219 și 307 cu soluție eterică de diazometan. Metoda generală. Acidul 4 (21 mg) este tratat cu soluție eterică de CH_2N_2 în exces. După 1 oră solventul este distilat, iar reziduul este supus cromatografiei pe coloană (SiO₂, 0.5 g). Eluarea cu EP a permis izolarea a 21.2 mg de ester metilic 129. Conform metodei generale acidul 219 (23 mg) a generat 23.5 mg de ester 308, iar acidul 307 (27 mg) a generat 27.3 mg de ester 309. Toate reacțiile de esterificare au decurs cu randament cantitativ.



ent-Kaur-16-en-19-oat de metil (**129**) substanță cristalină, p.t. 76 – 77.5 °C ([6]: p.t. 73.5 – 74.5 °C); $[\alpha]_D^{20} = -101^\circ, c = 1.03, \text{CHCl}_3 (\text{lit. [6]: } [\alpha]_D^{20} = -104^\circ, \text{CHCl}_3);$ *IR* (v, cm⁻¹): 720, 1670, 1240, 1225, 1190, 1145;

¹*H-NMR* (400 MHz, δH): 0.83 (3H, s, Me-20), 1.17 (3H, s, Me-18), 2.64 (1H, s, H-13), 3.64 (3H, s, OMe), 4.74 (1H, s, H_a-17), 4.80 (1H, s, H_b-17);

¹³*C NMR* (100 MHz, δC): 15.4 (q, C-20), 18.4 (t, C-11), 19.1 (t, C-2), 21.9 (t, C-6), 28.7 (q, C-18), 33.1 (t, C-12), 38.1 (t, C-3), 39.4 (s, C-10), 39.7 (t, C-14), 40.8 (t, C-1), 43.3 (s, C-4), 41.3 (t, C-7), 43.8 (d, C-13), 44.2 (s, C-8), 48.9 (t, C-15), 51.1 (q, OMe) 55.1 (d, C-9), 57.1 (d, C-5), 102.9 (t, C-17), 155.9 (s, C-16), 178.0 (s, C-19). *Calcule analit.* $C_{21}H_{32}O_2$: C 79.70, H 10.19; găsit: C 79.69, H 10.17.



ent-Trachiloban-19-oat de metil (**308**)



Calcule analit. C₂₁H₃₂O₂: C 79.70, H 10.19; găsit: C 79.73, H 10.15.



15α-Angeloil-ent-kaur-16-en-19-oat de metil (**309**)

substanță cristalină, *p.t.* 132-135° ([193]: *p.t.* 135 – 137 °C) *IR* (v, cm⁻¹): 1730, 1675, 1240, 1165, 916;

^{*I*}*H NMR* (400 MHz, δ H): 0.95 (3H, s, Me -20), 1.26 (3H, s, Me -18), 1.89 (3H, d, *J* = 1.1, H-2'), 1.98 (3H dq, *J* = 8, H-4'), 2.73 (1H, s, H-13), 3.61 (3H, s, OMe), 5.41 (1H, s, H-15), 5.09 (1H, s, H_a-17), 5.20 (1H, s, H_b-17), 6.09 (1H, qq, *J* = 8, H-3'); ¹³C NMR (100 MHz, δC): 40.5 (t, C-1), 19.0 (t, C-2), 38.7 (t, C-3),
43.8 (s, C-4), 57.1 (d, C-5), 21.2 (t, C-6), 35.5 (t, C-7), 48.0 (s, C-8),
53.2 (d, C-9), 39.9 (s, C-10), 19.7 (t, C-11), 33.0 (t, C-12), 43.3 (d,
C-13), 37.6 (t, C-14), 83.5 (d, C-15), 155.9 (s, C-16), 110.3 (t, C-17), 29.7 (q, C-18), 178.0 (s, C-19), 15.9 (q, C-20), 51.5 (q, OMe),
168.3 (s, C-1'), 128.5 (s, C-2'), 137.6 (d, C-3'), 16.0 (q, C-4'), 21.1 (q, C-5').

Calcule analit. C₂₆H₃₈O₄: C 75.32, H 9.24; găsit: C 74.29, H 9.25.

4. Extracția deșeurilor de floarea-soarelui cu diferiși solvenți. Metodă generală. Deșeurile de floarea-soarelui (100 g), uscate și mărunțite, sunt plasate în Soxhlet și extrase cu EP (750 mL) în 10 cicluri consecutive. După distilarea solventului, s-au obținut 1.583 g de extract crud de culoare gălbuie, care a fost redizolvat în eter etilic și tratate cu soluție apoasă de 5% KOH (3 mL). Faza apoasă se separă și se acidulează cu soluție de 10% H_2SO_4 (2 ml), apoi se extrage cu eter etilic, se spală cu soluție salină până la reacție neutră și se concentrează la presiune redusă, generând 0.839 g ulei de culoare galbenă. Procedura se repetă cu diclorometan, etanol, acetonă și toluen folosind aceiași cantitate de materie primă vegetală (100 g) și același volum de solvent (750 mL) (Tabelul 2.1). Extracția cu diclorometan a generat 2.572 g extract maroniu, extracția cu acetonă – 3.138 g extract de culoare brună, extracția cu eter etilic – 5.082 g extract de culoare brună.

5. Esterificarea părților acide a extractelor cu soluție eterică de diazometan. Metodă generală. Partea acidă a extractului obținut cu eter de petrol (0.839 g) a fost tratat cu soluție eterică de CH_2N_2 în exces. După 1 oră, solventul este evaporate, iar reziduul este supus analizei GC-MS pentru identificarea componentelor diterpenice **129**, **308**, **309** și cuantificarea lor relativă. În mod similar s-a procedat cu părțile acide obținute individual din fiecare extract. Datele privind masele părților acide și conținutul relativ al esterilor diterpenici **129**, **308**, **309** în extractele din deșeuri de floarea-soarelui sunt prezentate în Tabelul 2.1.

Izomerizarea acidului ent-trachiloban-19-oic

1. Izomerizarea acidului ent-*trachiloban-19-oic*. Soluția formată din substratul **219** (297 mg, 0,938 mmol) în 2-nitropropan (1.2 mL) și CH₂Cl₂ (7.2 mL), răcită în prealabil (-60 °C), este tratată cu soluție răcită de FSO₃H (692 mg, 6.92 mmol) în 2-nitropropan (1.2 mL). După 15 min

de agitare la -60 °C, amestecul a fost neutralizat cu Et_3N /hexan 1: 1 (10 mL). Apoi, amestecul de reacție este diluat cu apă (10 mL) și prelucrat obișnuit, generând 290 mg produs brut. Acesta a fost supus cromatografiei pe coloană cu silicagel (7 g). Eluarea în gradient cu EP/EtOAc a permis izolarea primei fracții cu compușii nepolari (123 mg, 41%) și a doua fracție cu compușii polari (150 mg, 51%). Fracția nepolară (123 mg) a fost recromatografiat pe coloană cu silicagel impregnat cu nitrat de argint (7 g) și eluarea cu benzene și benzen/EtOAc a permis izolarea compușilor: **310** (36 mg, 12%; benzen), **311** (66 mg, 22%; benzen) și **4** (8,3 mg, 3%; benzen/EtOAc 1%) și **63** (3 mg, 1%; benzen/EtOAc 1%) și **312** (5,5 mg, 2%; benzen/EtOAc 3%). Fracția polară (150 mg) a fost recromatografiată pe coloană cu silo2 impregnat cu nitrat de argint (7 g) și eluarea cu benzen/EtOAc 1%) și **314** (47 mg, 16%).



Acidul ent-atis-15-en-19-oic (**310**)

substanță cristalină, p.t. 184 – 185 °C; $[\alpha]_D^{20} = -78.6^\circ, c \ 0.16, CHCl_3;$ *IR* (v, cm⁻¹): 3550 – 3220, 3050, 1695, 1467, 1440, 1272, 1250; ¹*H-NMR* (400 MHz, δ H): 5.58 (1H, t, *J* = 2, H-15); 1.76 (3H, s, Me-17); 1.25 (3H, s, Me-18); 0.90 (3H, s, Me-20); ¹³*C-NMR* (100 MHz, δ C): 182.7 (s, C-19); 140.3 (s, C-16); 135.9 (t, C-15); 57.2 (d, C-5); 53.3 (d, C-9); 43.7 (s, C-4); 40.3 (t, C-1); 38.0 (t, C-3); 38.0 (s, C-10); 37.9 (t, C-7); 37.4 (s, C-8); 35.9 (d, C-12); 28.9 (q, C-18); 28.3 (t, C-14); 27.5 (t, C-11); 26.6 (t, C-13); 20.4 (t, C-6); 20.0 (q, C-17); 18.8 (t, C-2); 11.9 (q, C-20); *EI-MS*: 302 (12, M⁺), 287 (10, [M-Me]⁺), 274 (18), 256 (3), 241 (6), 207 (10), 159 (14), 119 (29), 106 (44), 81 (50), 44 (100); *Calcule analit.* C₂₀H₃₀O₂: C 79.42, H 10.00; găsit: C 79.39, H 9.98.



Acidul ent-atis-16-en-19-oic (**311**)

substanță cristalină, p.t. 218 – 220 °C ([176]: p.t. 219 °C); $[\alpha]_D^{20} = -70.2^\circ, c \ 1.5, CHCl_3 ([176]: [\alpha]_D^{20} = -69.7^\circ, c \ 2.0, CHCl_3);$ *IR* (v, cm⁻¹): 3550 – 3200, 3040, 2918, 1690, 1464, 1446, 1273, 1260;

^{*I*}*H-NMR* (400 MHz, δ H): 4.73 (1H, d, *J* = 2, H_a-17); 4.57 (1H. d, *J* = 2, H_b-17); 1.24 (s, Me-18); 0.90 (s, Me-20);

¹³*C*-*NMR* (100 MHz, δC): 182.3 (s, C-19); 152.8 (s, C-16); 104.5 (t, C-17); 57.2 (d, C-5); 52.2 (d, C-9); 48.2 (t, C-15); 43.7 (s, C-4);

39.7 (t, C-1); 39.7 (t, C-7); 38.4 (s, C-10); 38.1 (t, C-3); 36.6 (d, C-12); 33.6 (s, C-8); 28.9 (q, C-18); 28.7 (t, C-14); 28.3 (t, C-13); 27.3 (t, C-11); 20.3 (t, C-6); 18.8 (t, C-2); 12.1 (q, C-20); *EI-MS*: 302 (23, M⁺), 287 (75, [M-Me]⁺), 274 (4), 257 (21), 241 (27), 213 (15), 159 (21), 107 (58), 91 (100), 44 (86); *Calcule analit.* C₂₀H₃₀O₂: C 79.42, H 10.00; găsit: C 79.37, H 9.96.

substanță cristalină, p.t. 172 – 173 °C ([54]: p.t. 189 – 191 °C); $[\alpha]_D^{20} = -59.2^\circ, c \ 0.16, \ CHCl_3 \ ([54]: \ [\alpha]_D^{20} = -47.6^\circ, c \ 0.4, MeOH);$

IR (v, cm⁻¹): 3540 – 3200, 3030, 1690, 1464, 1442, 1270, 1250; *¹H-NMR* (400 MHz, δ H): 5.07 (1H, t, *J* = 1.8, H-15); 1.70 (3H, s,

Me-17); 1.23 (3H, s, Me-18); 0.97 (3H, s, Me-20);

¹³*C-NMR* (100 MHz, δC): 184.0 (s, C-19); 142.5 (s, C-16); 135.2 (t, C-15); 56.9 (d, C-5); 49.2 (s, C-8); 48.2 (d, C-9); 44.8 (d, C-13); 43.9 (t, C-14); 43.8 (s, C-4); 40.8 (t, C-1); 39.9 (s, C-10); 39.5 (t, C-7); 37.9 (t, C-3); 28.9 (q, C-18); 24.9 (t, C-12); 20.8 (t, C-6); 19.1 (t, C-11);19.0 (t, C-2); 15.4 (q, C-20); 15.4 (q, C-17); *EI-MS*: 302 (13, M⁺), 287 (9, [M-Me]⁺), 274 (3), 258 (5), 241 (8), 213 (5), 159 (16), 119 (34), 107 (62), 94 (100);

Calcule analit. C₂₀H₃₀O₂: C 79.42, H 10.00; găsit: C 79.41, H 9.97.

substanță cristalină, p.t. 183 – 185 °C ([176]: p.t. 184 °C);



Acidul ent-beier-15-en-19-oic (**312**)

IR (v, cm⁻¹): 3025, 2935, 1685, 1445, 1255, 1190; *¹H-NMR* (400 MHz, δ H): 5.76 (1H, d, *J* = 5.7, H-15); 5.47 (1H, d, *J* = 5.7, H-16); 1.26 (3H, s, Me-18); 1.01 (3H, s, Me-17); 0.69 (3H, s, s)

 $[\alpha]_{D}^{20} = +8.2^{\circ}, c \ 0.33, \text{CHCl}_{3}([176]; [\alpha]_{D}^{20} = +7.0^{\circ}, c \ 1.8, \text{CHCl}_{3});$

Me-20);

¹³C-NMR (100 MHz, δC): 184.3 (s, C-19); 136.5 (d, C-16); 134.8 (d, C-15); 61.1 (t, C-14); 57.2 (d, C-5); 52.4 (d, C-9); 49.2 (s, C-8); 43.9 (s, C-4); 43.7 (s, C-13); 39.6 (t, C-1); 38.0 (t, C-3); 37.7 (t, C-7); 37.7 (s, C-10); 33.2 (t, C-12); 29.1 (q, C-18); 24.9 (q, C-17); 21.6 (t, C-6); 20.5 (t, C-11);19.3 (t, C-2); 13.8 (q, C-20);



Acidul ent-kaur-15-en-19-oic (**63**)

EI-MS: 302 (18, M⁺), 287 (8, [M-Me]⁺), 272 (2), 257 (3), 207 (7), 148 (11), 135 (34), 105 (27), 91 (31), 44 (100); *Calcule analit.* C₂₀H₃₀O₂: C 79.42, H 10.00; găsit: C 79.45, H 9.96.



*Acidul (16β)-16-hidroxi*ent-*atisan-19-oic (313)*

substanță cristalină, p.t. 203 – 205 °C ([179]: p.t. 206 °C); $[\alpha]_D^{20} = -31.2^\circ$, c 0.32, CHCl₃ ([179]: $[\alpha]_D^{20} = -10.8^\circ$, c 0.6, CHCl₃);

IR (v, cm⁻¹): 3420, 2925, 1690, 1455, 1270;

¹*H-NMR* (400 MHz, δH): 1.30 (3H, s, Me-17); 1.26 (3H, s, Me-18); 0.90 (3H, s, Me-20);

¹³C-NMR (100 MHz, δC): 183.5 (s, C-19); 72.4 (s, C-16); 57.4 (t, C-15); 57.2 (d, C-5); 50.9 (d, C-9); 43.7 (s, C-4); 39.8 (t, C-7); 39.8 (t, C-1); 37.9 (d, C-12); 38.2 (s, C-10); 38.0 (t, C-3); 33.7 (s, C-8); 30.7 (q, C-17); 28.9 (q, C-18); 26.9 (t, C-14); 25.5 (t, C-13); 22.0 (t, C-11); 20.0 (t, C-6); 18.7 (t, C-2); 12.1 (q, C-20);

EI-MS: 320 (2, M⁺), 302 (40, [M - H₂O]⁺), 287 (51, [M - H₂O - Me]⁺), 274 (13), 262 (57), 241 (23), 187 (32), 121 (68), 105 (85), 91 (100);

Calcule analit. C₂₀H₃₂O₃: C 74.96, H 10.06; găsit: C 74.89, H 10.02.



 $[\alpha]_D^{20} = +60.9^\circ, c \ 0.3, \text{CHCl}_3([179]: [\alpha]_D^{20} = +63.2^\circ, c \ 0.4, \text{CHCl}_3);$ *IR* (v, cm⁻¹): 3350, 1690, 1460, 1440, 1270, 1260;

¹*H-NMR* (400 MHz, δH): 1.31 (3H, s, Me-17); 1.26 (3H, s, Me-18); 0.90 (3H, s, Me-20);

¹³C-NMR (100 MHz, δC): 183.0 (s, C-19); 72.2 (s, C-16); 57.4 (t, C-15); 57.1 (d, C-5); 50.6 (d, C-9); 43.7 (s, C-4); 39.7 (t, C-7); 39.6 (t, C-1); 38.0 (d, C-12); 38.3 (s, C-10); 38.0 (t, C-3); 33.8 (s, C-8); 30.5 (q, C-17); 28.9 (q, C-18); 26.8 (t, C-14); 26.0 (t, C-11); 23.9 (t, C-13); 20.2 (t, C-6); 18.7 (t, C-2); 12.0 (q, C-20);

EI-MS: 302 (41, [M - H₂O]⁺), 287 (100, [M - H₂O - Me]⁺), 274 (7), 257 (24), 241 (21), 187 (22), 159 (27), 121 (41), 105 (50), 91 (54);



*Acidul (16α)-16-hidroxi*ent-*atisan-19-oic (314)* *Calcule analit.* C₂₀H₃₂O₃: C 74.96, H 10.06; găsit: C 74.91, H 10.07.

2. Esterificarea acizilor 63, 310 - 314 cu soluție eterică de diazometan. Metodă generală. Acid ent-atis-15-en-19-oic (310) (9 mg) a fost tratat cu un exces de soluție eterică de CH₂N₂. După 1 oră, solventul a fost distilat, iar reziduul a fost supus cromatografiei pe coloană (SiO₂, 0.5 g). Eluarea cu EP a permis izolarea a 7.7 mg ester metilic 315:



ent-*Atis-15-en-19-oat de metil* (**315**) substanță cristalină, p.t. 89 – 90 °C ([176]: p.t. 90 – 91 °C); $[\alpha]_D^{20} = -81.6^\circ, c \ 0.16, CHCl_3;$ *IR* (v, cm⁻¹): 2920, 1690, 1465, 1443, 1275, 1258; ¹*H-NMR* (400 MHz, δ H): 5.58 (1H, t, *J* = 1.8, H-15); 3.64 (3H, s, MeO); 1.73 (3H, s, Me-17); 1.17 (3H, s, Me-18); 0.77 (3H, s, Me-20); ¹³*C-NMR* (100 MHz, δ C): 178.1 (s, C-19); 140.3 (s, C-16); 135.8 (t, C-15); 57.2 (d, C-5); 53.3 (d, C-9); 51.1 (q, MeO); 43.7 (s, C-4); 40.3 (t, C-1); 38.2 (t, C-3); 37.9 (s, C-10); 37.8 (t, C-7); 37.3 (s, C-8); 35.8 (d, C-12); 28.8 (q, C-18); 28.3 (t, C-14); 27.5 (t, C-11); 26.4 (t, C-13); 20.4 (t, C-6); 20.1 (q, C-17); 18.7 (t, C-2); 11.6 (q, C-20).

Conform metodei generale acidul **311** (10.5 mg) a generat 9,1 mg ester metilic **316**:



ent-Atis-16-en-19-oat de metil (**316**) substanță cristalină, p.t. 124 – 125 °C ([176]: p.t. 125 – 126 °C); $[\alpha]_D^{20} = -67.3^\circ, c \ 0.35, \text{CHCl}_3([176] \ [\alpha]_D^{20} = -68.7^\circ, c \ 1.5, \text{CHCl}_3);$ $IR (v, \text{cm}^{-1})$: 3045, 1725, 1460, 1443, 1230;

¹*H-NMR* (400 MHz, δH): 4.74 (1H, d, J = 2, H_a-17); 4.58 (1H, d, J = 2, H_b-17); 3.66 (3H, s, MeO); 1.17 (3H, s, Me-18); 0.81 (3H, s, Me-20);

¹³C-NMR (100 MHz, δC): 177.9 (s, C-19); 152.8 (s, C-15); 104.5 (t, C-17); 57.3 (d, C-5); 52.2 (d, C-9); 51.0 (q, MeO); 48.2 (t, C-16); 43.9 (s, C-4); 39.7 (t, C-1); 39.7 (t, C-7); 38.2 (s, C-10); 38.3 (t, C-3); 36.6 (d, C-12); 33.5 (s, C-8); 28.7 (q, C-18); 28.7 (t, C-14); 28.3 (t, C-13); 27.3 (t, C-11); 20.3 (t, C-6); 18.8 (t, C-2); 11.9 (q, C-20).

Conform metodei generale acidul 63 (5 mg) a generat 4.3 mg eter metilic 317:



ent-*Kaur-15-en-19-oat de metil* (**317**) substanță cristalină, p.t. 78 – 79.5 °C ([54]: p.t. 79 – 80 °C); $[\alpha]_D^{20} = -61.6^\circ, c \ 0.18, CHCl_3 ([54]: [\alpha]_D^{20} = -54.0^\circ, c \ 4.1, CHCl_3);$ *IR* (v, cm⁻¹): 2915, 1686, 1460, 1445, 1271, 1256; ¹*H-NMR* (400 MHz, δ H): 5.06 (1H, t, *J* = 2, H-15); 3.63 (3H, s, MeO); 1.69 (3H, s, Me-17); 1.15 (3H, s, Me-18); 0.84 (3H, s, Me-20); ¹³*C-NMR* (100 MHz, δ C): 178.1 (s, C-19); 142.5 (s, C-16); 135.1 (t, C-15); 56.8 (d, C-5); 51.1 (q, MeO); 49.1 (s, C-8); 48.0 (d, C-9); 44.7 (d, C-13); 43.8 (s, C-4); 43.8 (t, C-14); 40.8 (t, C-1); 39.7 (t, C-7); 39.6 (s, C-10); 38.3 (t, C-3); 28.7 (q, C-18); 24.9 (t, C-12); 20.9 (t, C-6); 19.1 (t, C-11); 18.9 (t, C-2); 15.5 (q, C-20), 15.4 (q, C-17).

Conform metodei generale acidul 312 (7 mg) a generat 6.4 mg ester metilic 318:



ent-Beier-15-en-19-oat de metil (**318**)

substanță cristalină, p.t. 116 – 117 °C ([176]: p.t. 118 °C); $[\alpha]_D^{20} = +6.3^\circ, c \ 0.18, CHCl_3 ([176]: [\alpha]_D^{20} = +5.0^\circ, c \ 1.5, CHCl_3);$ *IR* (v, cm⁻¹): 3050, 3015, 2935, 1715, 1440, 1240, 1150; ¹*H-NMR* (400 MHz, δ H): 5.72 (1H, d, *J* = 5.7, H-15); 5.44 (1H, d, *J* = 5.7, H-16); 3.66 (3H, s, MeO); 1.20 (3H, s, Me-18); 1.17 (3H, s, Me-17); 0.55 (3H, s, Me-20); ¹³*C-NMR* (100 MHz, δ C): 178.1 (s, C-19); 134.5 (d, C-16); 134.7 (d, C-15); 61.1 (t, C-14); 57.0 (d, C-5); 52.2 (d, C-9); 51.1 (q, MeO); 49.1 (s, C-8); 43.6 (s, C-4); 43.8 (s, C-13); 39.5 (t, C-1); 38.2 (t, C-3); 37.6 (t, C-7); 37.7 (s, C-10); 32.9 (t, C-12); 28.9 (q, C-18); 24.9 (q, C-17); 21.6 (t, C-6); 20.4 (t, C-11); 19.3 (t, C-2); 13.6 (q, C-20).

Conform metodei generale acidul 313 (10 mg) a generat 9.3 mg ester metilic 319:



substanță cristalină, p.t. 146 – 148 °C ([180]: p.t. 148 – 150 °C); $[\alpha]_D^{20} = -34.3^\circ, c \ 0.35, CHCl_3 ([180]: [\alpha]_D^{20} = -36.7^\circ, c \ 0.8, CHCl_3);$ *IR* (v, cm⁻¹): 3385, 2916, 1690, 1464, 1272, 1257; ¹*H-NMR* (400 MHz, δ H): 3.64 (3H, s, MeO); 1.31 (3H, s, Me-17); 1.18 (3H, s, Me-18); 0.77 (3H, s, Me-20); ¹³*C-NMR* (100 MHz, δ C): 178.0 (s, C-19)); 72.3 (s, C-16); 57.4 (t, C- (16β)-16-Hidroxi-ent15); 57.2 (d, C-5); 51.1 (q, MeO); 50.8 (d, C-9); 43.8 (s, C-4); 39.8 (t, atisan-19-oat de metil
(C-7); 39.8 (t, C-1); 37.9 (d, C-12); 38.2 (s, C-10); 37.9 (t, C-3); 33.7 (s, C-8); 30.7 (q, C-17); 28.7 (q, C-18); 26.9 (t, C-14); 25.4 (t, C-13); 21.9 (t, C-11); 20.0 (t, C-6); 18.8 (t, C-2); 11.9 (q, C-20).

Conform metodei generale acidul **314** (8 mg) a generat 7.2 mg ester metilic **320**:



(16α)-16-Hidroxi-entatisan-19-oat de metil (**320**)

substanță cristalină, p.t. 135 – 138 °C ([180]: p.t. 139 – 141 °C); $[\alpha]_D^{20} = -48.2^\circ, c \ 0.36, \ CHCl_3 \ ([180]: \ [\alpha]_D^{20} = -51.76^\circ, c \ 0.7, \ CHCl_3);$ $IR (v, cm^{-1}): 3388, 2918, 1687, 1465, 1446, 1271, 1255;$

¹*H-NMR* (400 MHz, δH): 3.64 (3H, s, MeO); 1.28 (3H, s, Me-17); 1.16 (3H, s, Me-18); 0.77 (3H, s, Me-20);

¹³C-NMR (100 MHz, δC): 178.0 (s, C-19); 72.1 (s, C-16); 57.5 (t, C-15); 57.2 (d, C-5); 51.1 (q, MeO); 50.6 (d, C-9); 43.9 (s, C-4); 39.7 (t, C-7); 39.7 (t, C-1); 38.2 (s, C-10); 38.1 (d, C-12); 38.1 (t, C-3); 33.8 (s, C-8); 30.5 (q, C-17); 28.7 (q, C-18); 26.8 (t, C-14); 23.9 (t, C-13); 23.4 (t, C-11); 20.2 (t, C-6); 18.8 (t, C-2); 11.9 (q, C-20).

Funționalizarea acidului ent-*trachiloban-19-oic cu diacetat de iodobenzen și bromură de litiu (PhI(OAc)₂ / LiBr)*

La soluția formată din acidul *ent*-trachiloban-19-oic (**219**) (100 mg, 0.33 mmol) și acid acetic glacial (5 mL) se adaugă 1 eq. PhI(OAc)₂ (106 mg, 0.07 mmol) și se agită până la dizolvarea componentelor, apoi se adaugă 20 mmol % LiBr. Reacția decurge 98 h la temperatura de 95 °C, în regim de agitare. Culoarea gălbuie a amestecului reactant devine brun-roșietică spre sfirșitul reacției. Apoi, amestecul este răcit și extras cu Et₂O (30 mL × 3), iar faza organică este spălată cu soluție saturată de tiosulfat de sodiu, apă și soluție de NaHCO₃. Stratul organic este uscat pe Na₂SO₄ anh. și concentrat la presiune redusă. Produsul crud (163 mg) a fost supus cromatografie pe coloană cu SiO₂ (22 g). De pe coloană au fost eluați în gradient (EP/EtOAc) compușii **321** (19 mg, 11 %) și **322** (76 mg, 61%). Datele spectrale ale compușilor izolați, ¹*H RMN* și ¹³*C RMN*, sunt prezentate în Tabelul 2.3.



substanță amorfă; $[\alpha]_D^{20} = -8.2^\circ, c \ 0.3, CHCl_3;$ *IR* (v, cm⁻¹): 3050, 1690, 1467, 1440, 1272, 1250, 920, 750; ^{*I*}*H RMN* Tabelul 2.3. ^{*I*3}*C RMN* Tabelul 2.3.

Acidul (13β,15β)-13,15,17-tribromo-ent-

atis-16Z-en-19-oic (321)



substanță amorfă; $[\alpha]_D^{20} = -48.2^\circ, c \ 1.0, CHCl_3;$ *IR* (v, cm⁻¹): 3388, 2918, 1738, 1687, 1465, 1446, 1271, 1255; ¹*H RMN* Tabelul 2.3. ¹³*C RMN* Tabelul 2.3.

Acidul (12β)-12-hidroxi-16α-acetoxi-ent-kauran-

19-oic (**322**)

Tabelul 2.3. Datele spectrale ¹H RMN, ¹³C RMN şi¹H-¹³C HMBC ale compuşilor **321** şi **322** (CDCl₃, δ în ppm, J în Hz)

		321		322		
No. Carbon	$\delta^{I}H;$ m/J, Hz	δ^{13} C; m	$HMBC ({}^{1}H \rightarrow {}^{13}C)$	$\delta^{T}H;$ m/J, Hz	$\delta^{13}C; \mathbf{m}$	$HMBC ({}^{1}H \rightarrow {}^{13}C)$
1	1.70; m suprapus 0.91; m	40.00; t	C-2, 9, 10, 20	1.71; m uprapus 0.90; m	40.05; t	C-2, 9, 10, 20
2	1.87; m suprapus 1.44; m	18.62; t	C-1, 3	1.85; m suprapus 1.41; m	18.60; t	C-1, 3, 4
3	2.18; d/13.1 1.02; m suprapus	37.51; t	C-2, 4, 5, 18, 19	2.18; d/13.1 1.02; m suprapus	37.73; t	C-2, 4, 5, 18,
4	-	43.51; s	-	-	43.57; s	-
5	1.03; m suprapus	56.02; d	C-4, 6, 10	1.06; m	56.50; d	C-6, 7, 10
6	1.85; m suprapus1.71; m suprapus	20.00; t	C-5, 7, 8, 10	1.74; m suprapus 1.69; m suprapus	20.17; t	C-5, 7
7	2.00; m 1.16; m	38.26; t	C-5, 6, 8, 9, 14, 15	1.48; m 1.14; m	39.65; t	C-5, 6, 8, 15
8	-	38.80; s	-	-	34.33; s	-
9	1.08; m	50.00; d	C-8, 10, 11	1.21; m	49.47; d	C-8, 10, 11
10	-	39.27; s		-	38.20; s	-

11	2.04; m	22 72.4	C-8, 9, 12, 13,	1.82; m suprapus	19 60. 4	C-8, 9, 10, 12,
11	1.51; m	23.73; [16	1.1.61; m	18.00; t	13
12	275· t/22	45,06; d	C-13, 14, 15,	4.40° m	40.16; d	C 11 14 16
12	2.73, 02.2		16, 17	4.40, 111	49,10, u	C-11, 14, 10
13	4.51; m	47.80; d	C-11, 12, 14	2.67; t/1.7	43.43; d	C-12, 14, 16
14	2.41; m.	26 51. +	C 9 0 12 15	2.36; dq/14.8; 1.7	40.70; t	C 9 0 12 15
14		30.31; t	C-8, 9, 15, 15	1.64; m suprapus	40.70; t	C-8, 9, 12, 13
15	4 27: 6	61.54; t	C-7, 9, 12, 14,	1.51; m suprapus	52 79. +	C-8, 9, 13, 16,
15	4.27, 8		16, 17	1.26; m suprapus	<i>32.1</i> 8, t	17, OAc
16	-	145.23; s	-	-	82.66; s	-
17	6 25. 1/1 6	106.80. a	C 12 15 16	1 59. 0	24.41; q	C-13, 15, 16,
1/	0.25, 0/1.0	100.80, q	C-12, 15, 10	1.56, 8		OAc
18	1.26; s	28.90; q	C-3, 4, 5, 19	1.24; s	29.00; q	C-3, 4, 5, 19
19	-	182.48; s		-	183.34; s	-
20	1.04; s	14.05; q	C-5, 8, 9, 10	1.01; s	13.94; q	C-1, 5, 9, 10
CO (OAc)				-	170.26; s	-
Me (OAc)				2.00; s	22.27; q	OAc, C-16

2.5. Concluzii la capitolul 2

Cercetările efectuate în cadrul acestui capitol au demonstrat rolul important al diterpenoidelor pentaciclice *ent*-trachilobanice în calitate de precursori biogenetici ai diterpenoidelor *ent*-kauranice, *ent*-atisanice și *ent*-beieranice.

- A fost elaborată și optimizată o metodă eficientă de izolare, reieșind din deșeurile uscate de floarea-soarelui *Helianthus annuus* L. a acizilor *ent*-kaur-16-en-19-oic (4), *ent*-trachiloban-19-oic (219) și 15α-angeloil-*ent*-kaur-16-en-19-oic (307) compuși importanți ce posedă o gamă largă de activități biologice și pot servi ca sintoni convenabili la sinteza altor compuși biologic activi cu pondere mică în natură.
- A fost realizată pentru prima dată sinteza *retro*-biomimetică a diterpenoidelor tetraciclice bioactive, cu schelet carbonic *ent*-atisanic, *ent*-beieranic și *ent*-kauranic prin izomerizarea superacidă, la temperatură joasă, a acidului *ent*-trachiloban-19-oic (219). Ponderea compuşilor *ent*-atisanici este de aproximativ 70 %.
- A fost demonstrată eficiența sistemului diacetatat de iodobenzen/bromură de litiu în izomerizarea selectivă a acidului *ent*-trachiloban-19-oic (219), cu generarea unui produs regrupat majoritar cu schelet *ent*-kauranic, acidul (12β)-12-hidroxi-16α-acetoxi-*ent*-kauran-19-oic (322) compus diterpenic cu activitate biologică potențială.

3. TRANSFORMĂRILE SINTETICE ALE ACIDULUI ENT-KAUR-16-EN-19-OIC

Transformările chimice ale substanțelor naturale, în general, și a diterpenoidelor *ent*-kauranice în particular, constituie o direcție importantă și promițătoare în chimia medicamentelor. Cu toate acestea, există cel puțin trei factori care împiedică investigațiile în acest sens. Primul factor este conținutul lor extrem de scăzut în sursele naturale, majoritatea diterpenoidelor se găsesc în cantități forte mici. Al doilea impediment constă în prezența mai multor centre de reacție în moleculă, ceea ce împiedică cursul chemo-si regioselectiv al sintezei. Al treilea factor este susceptibilitatea la regrupări de schelet, foarte caracteristică *ent*-kauranilor. Totuși, marea varietate a diterpenoidelor *ent*-kauranice izolate, cât și abundența relativ mare a unora în sursele naturale disponibile, reprezintă o bază foarte atractivă pentru transformările chimice ulterioare.

În acest context, acidul *ent*-kaur-16-en-19-oic (**4**) este una dintre terpenoidele *ent*-kauranice prezente abundent în sursele naturale, se întâlnește în specii de plante ca: *Wedelia* [193], *Mikania* [194], *Annona* [195], *Xylopia* [196] și *Helianthus* [6, 161].

Acidul *ent*-kaur-16-en-19-oic (**4**) este unul dintre compușii intermediari implicați în biosinteza diverselor diterpenoide *ent*-kauranice, inclusiv a giberelinelor, un grup de fitohormoni de creștere importanți. Prin urmare, nu este surprinzător că mulți *ent*-kaurani și derivați ai acestora acționează ca reglatori de creștere ai plantelor [1].

E de menționat faptul că, acidul *ent*-kaur-16-en-19-oic (**4**) are un potențial de bioactivitate impunător și, practic, cuprinde în sine cele mai importante proprietăți. Acidul *ent*-kaurenoic (**4**) manifestă proprietăți antiinflamatorii, antibacteriene, antifungice și altele [2]. La fel, acidul **4** a fost raportat ca inhibitor al tirozinfosfatazei 1B (PTP1B) și a fost folosit ca remediu la tratarea diabetului de tip 2 și a obezității [197]; acidul **4** arată o înaltă selectivitate citotoxică pe liniile de celule MCF-7 [198], SF-268, MCF-7 și HepG2 [199], și activitate inhibitorie împotriva enzimelor prolil endopeptidaza (PEP) și trombina [127]; posedă proprietăți anti-Alzheimer [16].

Important este că, sinteze în baza acidului *ent*-kaur-16-en-19-oic (**4**) sunt la moment întrun număr limitat [200]. Astfel, elaborarea metodelor de sinteză a derivaților funcționalizați ai acidului *ent*-kaur-16-en-19-oic (**4**) reprezintă o cale de obținere a diterpenoidelor bioactive, inclusiv a celor naturale, care ar prezenta un interes pentru medicină și farmaceutică.

Floarea-soarelui (*Helianthus annuus* L), conform diferitor studii, reprezintă sursa cea mai bogată și accesibilă de *ent*-kaurani, cu un conținut de 0.65% din masa uscată [6, 7], iar acidul **4** este componenta predominantă extrasă din diferite părți ale plantei. În Republica Moldova
floarea-soarelui este una dintre plantele cultivate la scară industrială, iar deșeurile uscate ramase după recoltare alcătuiesc o materie primă accesibilă în vederea obținerii acidului *ent*-kaur-16-en-19-oic (**4**).

Astfel, acizii *ent*-kaur-16-en-19-oic (**4**) și angeloilgrandifloric (**307**) – compuși biologic activi, pot fi izolați în cantități sporite din deșeurile de floarea-soarelui (*Helianthus annuus* L) printr-o metodă simplă descrisă în capitolul anterior (vezi cap. 2, subcap. 2.1).

3.1. Izomerizarea superacidă a acidului *ent*-kaur-16-en-19-oic. Sinteza *retro*-biomimetică a diterpenoidelor naturale *ent*-kauranice, *ent*-atisanice și *ent*-beieranice.

Schema biogenetică de interconexiune a diferitelor clase de diterpenode tetraciclice implică o secvență de regrupare a scheletului, care a fost în măsură să explice concis diversitatea reprezentanților cunoscuți. Conform ipotezei biogenetice de proveniență a terpenoidelor, inițial propusă de Wenkert [171], diterpenoidele de tip *ent*-beiranic, *ent*-kauranic, *ent*-trachilobanic și *ent*-atisanic ar putea să provină de la *ent*-copalil pirofosfat prin intermediul unui carbocationilor neclasic (vezi cap. 2, Figura 2.2). În acest context, anterior au fost raportate o serie de izomerizări ale diterpenoidelor *ent*-kauranice sub acțiunea diferitelor reactivi, superacizii fiind generatori convenabili de specii active [172, 173]. Astfel, în baza concepție noi propuse de sinteză *retro*-biomimetică a diterpenoidelor menționate mai sus, a fost efectuată izomerizarea acidului *ent*-kaur-16-en-19-oic (**4**).

Tratarea acidului *ent*-kaur-16-en-19-oic (**4**) cu un exces de acid fluorosulfonic (5 eq.), în condiții blânde (-60 °C), permite obținerea unei serii de compuși naturali cu schelete regrupate [174, 176, 177, 201]. Produsul de reacție a fost mai întâi separat cromatografic pe coloană cu silicagel, cu obținerea fracție cu compuși nepolari și a fracției cu compuși polari. Fracția nepolară a fost recromatografiată pe coloană cu silicagel impregnat cu nitrat de argint. Eluarea în gradient a permis izolarea în ordinea creșterii polarității a următorilor compuși: acizii *ent*-atisenici – *ent*-atis-15-en-19-oic (**310**; 8%) și *ent*-atis-16-en-19-oic (**311**; 22%) [179], acizii *ent*-kaurenici – compus inițial recuperat (**4**, 18%) și izomerul acestuia, acidul *ent*-kaur-15-en-19-oic (**63**; 17%) [54], și în final, acidul *ent*-beier-15-en-19-oic (**312**; 7%) [179] (Figura 3.1). Structurile produșilor de sinteză au fost stabilite în baza datelor spectrale (¹*H*- și ¹³*C-RMN*; tehnici 1D și 2D). Aceste structuri au fost confirmate și prin corelare chimică. Tratarea acizilor individuali cu soluție eterică de diazometan a condus cantitativ la esterii metilici corespunzători: *ent*-atis-15-en-19-oat de metil (**315**) [178], *ent*-atis-16-en-19-oat de metil (**316**) [178 - 180], *ent*-kaur-15-en-19-oat de metil (**317**) [145] și *ent*-beier-15-en-19-oat de metil (**318**) [178].

Fracția polară a fost recromatografiată pe coloană cu silicagel, obținându-se doi derivați hidroxilici izomeri cu schelet atisanic, acidul (16β) -16-hidroxi-*ent*-atisan-19-oic (**313**; 5%) [182] și acidul (16α) -16-hidroxi-*ent*-atisan-19-oic (**314**; 4%) [184] (Figura 3.1). Structurile produșilor de sinteză au fost stabilite în baza datelor spectrale și prin corelare chimică. Tratarea hidroxiacizilor cu soluție eterică de diazometan a condus cantitativ la esterii metilici corespunzători **319** [183] și **320** [184]. Toți compușii obținuți au fost descriși în capitolul anterior (vezi capitolul 2, subcapitolul 2.2).



Reagenți și condiții: (a) FSO₃H (5 eq.), *i*-PrNO₂, CH₂Cl₂, -60 °C, 15 min; (b) CH₂N₂, Et₂O, 30 min.

Fig. 3.1. Schema reacției de izomerizare superacidă a acidului ent-kaur-16-en-19-oic (4).

Conform ultimelor cercetări în domeniul [12], mecanismul presupus al reacției de izomerizare a acidului *ent*-kaur-16-en-19-oic (**4**), ca și în cazul acidului *ent*-trachiloban-19-oic (**219**), presupune formarea intermediarului de tip beieranic **B**. Inițial se formează carbocationul terțiar *ent*-kauranil **A**, care la pierderea unui proton din C₁₅, conduce la acidul *ent*-kaur-15-en-19-oic (**63**). Carbocationul **A**, în urma migrării grupei metil, generează cabocationul *ent*-beieranil **B**, intermediarul cheie în obținerea diterpenoidelor de tip atisanic și beieranic. Acesta, suferind o serie de migrări, generează carbocationul *ent*-atisanil **D**, care pierde un proton din pozițiile C₁₅ sau C₁₇ pentru a forma legăturile C = C izomere în moleculele aciziilor *ent*-atisenici **310** și **311**. Paralel, compușii hidroxilați **313** și **314** se formează la interacțiunea carbocationului **D** cu o moleculă de apă. Acidul *ent*-beier-15-en-19-oic (**312**) se formează direct din carbocationului **B**, la ruperea unui proton din centrul C₁₅.



Fig. 3.2. Mecanismul propus al transformării *retro*-biomimetice a acidului *ent*-kaur-16-en-19-oic (**4**).

Astfel, izomerizarea superacidă a acidului *ent*-kaur-16-en-19-oic (**4**), în comparație cu cea a acidului *ent*-trachiloban-19-oic (**219**), generează o cantitate aproximativ de două ori mai mică de diterpenoide *ent*-atisanice, randamentul total al compușilor **310**, **311**, **313** și **314** fiind de circa 39%. În schimb, au crescut randamentele derivaților *ent*-kaurenic **63** și *ent*-beierenic **312** [177].

3.2. Tranformări oxidative ale acidului ent-kaur-16-en-19-oic.

Legătura dublă exociclică în *ent*-kaurani joacă un rol important în manifestarea activității lor biologice, prezența ei fiind definitorie în unele cazuri [74, 102]. Dar totodată, legătura dublă reprezintă un centru reactiv important. Multe diterpenoide naturale funcționalizați în centrele C-16, 17 sau în poziția alilică (C-15) manifestă diverse activități biologice, spre exemplu activitate citotoxică [199], anti-Alzheimer și antioxidantă [16], ceea ce îi face atractivi din punct

de vedere sintetic. Este cunoscut faptul că, un grad înalt de funcționalizare este foarte important în manifestarea proprietăților biologice relevante. În acest sens, au fost realizate o serie de transformări oxidative cu implicarea acidul *ent*-kaur-16-en-19-oic (**4**) accesibil, obținându-se o serie de compuși naturali bioactivi cât și unii compuși sintetici.

3.2.1. Oxidarea alilică a acidului ent-kaur-16-en-19-oic

Pornind de la ideea de mai sus, au fost sintetizați derivații acidului *ent*-kaur-16-en-19-oic (4) care posedă grupe funcționale suplimentare în poziția C-15. Astfel, oxidarea acidului 4 cu dioxid de seleniu în etanol, generează alcoolul corespunzător 12 cu randament de 68% (Figura 3.3). În același timp, saponificarea esterului angelic 307 cu o soluție etanolică de hidroxid de potasiu conduce la obținerea aceluiași hidroxiacid 12, cu un randament de 97% [202]. Structura acidului 15α -hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oic (12) a fost confirmată prin metode fizico-chimice.



Reagenți și condiții: (a) SeO₂, EtOH, Δ, 4 ore, 68%; (b) KOH, EtOH, Δ, 4 ore, 97%; (c) PCC, CH₂Cl₂, 24 ore, 68%.

Fig. 3.3. Schema reacției de obținerea a acidului 15-oxo-ent-kaur-16-en-19-oic (115).

Acidul 15α-hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oic (**12**) este un compus natural, anterior izolat din diferite surse vegetale (*Helianthus niveus* subspecies *Canescens* [203], *Viguiera ladibractate* [204], *Viguiera potosina* [205], *Espeletia timotensis* [98]). Acidul grandifloric (**12**) este raportat ca antifedant [206], antifungal în cazul ciupercilor *Pythium ultimum* (70%) și *Rhizoctonia solani* (78%) [181]. De asemenea, manifestă proprietăți antibacteriene moderate asupra *Staphylococcus aureus 209* și *Escherichia coli* [207] și proprietăți citotoxice moderate asupra liniilor de celule canceroase SF-268, MCF-7 și HepG2 [199]. În bioteste mai recente, acidul grandifloric (**12**), stimulează depunerea ouălor la femelele moliei dungate de floarea-soarelui, *Cochylis Hospes* [208].

Hidroxiacidul **12** este caracterizat în spectrul *IR* prin benzi de absorbție specifice ale grupelor carboxil (1690 cm⁻¹), hidroxil (3415-2725 cm⁻¹) și a legăturii duble exociclice (895 și 1620 cm⁻¹). În spectrul ¹*H NMR* sunt prezente semnalele singlet ale grupelor metil din C-18 și C-20 (1.25 și 0.96 ppm), semnalul singlet monoprotonic din C-15 la 2.75 ppm și semnalul dublet al grupei metilenice de la legătura dublă din C-17 la 5.08 și 5.22 ppm. Spectrul ¹³*C RMN* atestă prezența în moleculă a grupelor metil în C-18 (29.1 ppm) și C-20 (15.9 ppm) și a celor nouă grupe metilenice, dintre care una este localizată la legătura dublă, C-17 la 108.3 ppm. Semnalele carbonilor cuaternari din pozițiile C-4, C-8, C-10 și C-16 se găsesc la 43.5, 47.7, 40.1 și 160.4 ppm, iar semnalul grupei carboxil din poziția C-19 la 183.7 ppm. Semnalele carbonilor trisubstituiți C-5, C-9 și C-15 se găsesc la 57.3, 53.4 și 82.7 ppm. Stereochimia relativă a grupei OH s-a stabilit a fi α -orientată, în baza coralației ¹*H* -¹*H NOESY* dintre atomi de hidrogen din pozițiile H-15 \leftrightarrow H_β-9, ceea ce coincide cu acidul natural. Datele spectrale ale acidului **12** coincid cu cele din literatură [203].

Având la discreție acid grandifloric (12), se deschide calea spre sinteza unui derivat *ent*-kaurenic important cu proprietăți citotoxice, acidul 15-oxo-*ent*-kaur-16-en-19-oic (115). Oxidarea hidroxiacidului 12 cu PCC [209] în diclorometan duce la formarea cetonei 115, cu un randament de 84% (Figura 3.3) [202]. Cetona 115 este un compus natural izolat din *Pteris longipes Don* [210], *Espeletia grandiflora* [211], *Xylopia aethiopica* [212] și posedă o activitate citotoxică relevantă.

Cetona **115** este caracterizată, în spectrul *IR*, de benzi de absorbție specifice ale grupelor carboxil (1680 cm⁻¹), carbonil (1718 cm⁻¹) și a legăturii duble exociclice (895 cm⁻¹). În spectrul ¹*H NMR* sunt prezente semnalele singlet ale grupelor metil din C-18 și C-20 (1.25 și 0.97 ppm), și semnalul dublet al grupei metilenice de la legătura dublă din C-17 la 5.22 și 5.88 ppm. Spectrul ¹³*C RMN* atestă prezența în moleculă a grupelor metil în C-18 (29.1 ppm) și C-20 (15.7 ppm) și a nouă grupe metilenice, dintre care una este localizată la legătura dublă, carbonul C-17 de la 114.7 ppm. Semnalele carbonilor cuaternari din pozițiile C-4, C-8, C-10 și C-16 se găsesc la 43.5, 52.3, 40.3 și 149.8 ppm, iar semnalele grupelor carbonil din poziția C-19 și C-15 la 192.5 și 210.8 ppm respectiv. Semnalele carbonilor trisubstituiți C-5 și C-9 se regăsesc la 57.0 și 51.4 ppm. Datele spectrale ale cetonei **115** coincid cu datele din literatură [210].

Astfel, pornind de la acidul *ent*-kaur-16-en-19-oic (**4**) și esterului angelic **307** au fost sintetizați doi compuși naturali biologic activi, funcționalizați în poziția C-15.

3.2.2. Oxidarea treptată a acidului ent-kaur-16-en-19-oic

O direcție atractivă și promițătoare în funcționalizarea *ent*-kaurenilor este oxidarea dublei legături. Acidul *meta*-cloroperbenzoic (*m*CPBA) a fost printre primii agenți de oxidare utilizați, acesta fiind antrenat în sinteza derivaților epoxidici ai acidului *ent*-kaur-16-en-19-oic (**4**) [92, 93].

Reacția de epoxidare cu *m*CPBA poate fi efectuată atât pe acidul *ent*-kaur-16-en-19-oic (4) individual, cât și pe amestecul de acizi izomeri 4 și 219, în al doilea caz reacționând doar acidul 4. Astfel, la tratarea acidului individual 4 cu *m*CPBA s-au obținut doi epoxizi izomeri, β epoxidul 321 (16%) și α -epoxidul majoritar 322 (74%) (Figura 3.4) [213]. Izolarea cromatografică pe coloană cu silicagel a epoxizilor este însoțită de izomerizarea parțială a produșilor cu generarea aldehidelor izomere corespunzătoare (~ 5%) [214].

Conform spectrelor protonic și carbonic, ambii compuși conțin grupe carboxil și ciclul epoxidic, fapt confirmat și prin analiza corelațiile corespunzătoare ${}^{1}H{}^{-1}H$ COSY și NOESY, ${}^{1}H{}^{13}C$ HSQC și HMBC. Epoxidul **321** este caracterizat în spectrul *IR* de benzi de absorbție specifice a grupei carboxil (1693 cm⁻¹) și a grupei epoxi (1264 cm⁻¹). În spectrul ${}^{1}H$ NMR sunt prezente semnalele singlet ale grupelor metil din centrele C-18, C-20 (1.24, 0.97 ppm) și semnalul dublet al grupei metilenice din C-17 la 2.76 și 2.86 ppm. Spectrul ${}^{13}C$ RMN atestă prezența în moleculă a grupelor metil în C-18 (28.9 ppm),C-20 (15.8 ppm) și C-17 (50.4 ppm). Semnalele carbonilor cuaternari din pozițiile C-4, C-8, C-10 și C-16 se găsesc la 43.7, 44.1, 39.6 și 64.7 ppm, iar semnalul grupei carboxilice din poziția C-19 la 184.1 ppm. Semnalele carbonilor trisubstituiți C-5 și C-9 se regăsesc la 56.9 și 55.2 ppm. Structura și stereochimia acestui compus a fost confirmată prin metode spectrale și prin comparație cu epoxidul **322**, corespunzând acidului 16 β ,17-epoxi-*ent*-kauren-19-oic (**321**).

Epoxidul majoritar **322** este caracterizat în spectrul *IR* prin benzi de absorbție specifice ale grupelor carboxil (1693 cm⁻¹) și epoxi (1263 cm⁻¹). În spectrul ^{*1*}*H NMR* sunt prezente semnalele singlet ale grupelor metil din centrele C-18, C-20 (1.23 și 0.95 ppm) și semnalul dublet al grupei metilenice din C-17 la 2.80 și 2.88 ppm. Spectrul ^{*13*}*C RMN* atestă prezența în moleculă a grupelor metil în C-18 (28.9 ppm) și C-20 (15.8 ppm) și C-17 (54.9 ppm). Semnalele carbonilor cuaternari din pozițiile C-4, C-8, C-10 și C-16 se găsesc la 43.7, 45.4, 39.6 și 64.4 ppm, iar semnalul grupei carboxil din poziția C-19 la 184.1 ppm. Semnalele carbonilor trisubstituiți C-5 și C-9 se regăsesc la 56.9 și 55.2 ppm. Structura și stereochimia acestui compus a fost confirmată prin metode spectrale și corespunde acidului 16*a*,17-epoxi-*ent*-kauren-19-oic (**322**).



Reagenți și condiții: (a) *m*CPBA, Et₂O, t.c, 2 ore, 91%; (b) HClO₄ (70 %), DMSO, H₂O, 50 °C, 4 ore, 70%; (c) FSO₃H (5 eq.), *i*-PrNO₂, CH₂Cl₂, -60 °C, 15 min, 75%; (d) LiOH (3 eq.), DMSO, 110 - 140 °C, 7 ore, 40%.



Fig. 3.4. Schema reacției de epoxidare a acidului 4 şi hidroliza ulterioară a acidul 16α,17-epoxient-kauran-19-oic (322). Mecanismul propus al reacției de deschidere a ciclului epoxidic în compusul 322.

Tratarea ulterioară a epoxidului majoritar **322** cu acid percloric de 70%, în mediu de DMSO și H₂O a dus la deschiderea ciclului epoxidic cu formarea aldehidei **192** și alcoolului alilic **64** cu un randament total de 70% (Figura 3.4). Structurile alcoolul natural **64** și a aldehidei sintetice **192** au fost demonstrate în baza datelor spectrale. Stereochimia centrului C-16 în aldehida **192** s-a determinat a fi inversă în comparație cu cea a substratului inițial **322**, fenomen care poate fi explicat printr-o posibilă enolizare a intermediarului **Ib** \rightarrow **Ic** (Figura 3.4).

O cale alternativă de deschidere a epoxidului **322** a fost realizată prin tratarea acestuia cu superacid. Astfel, la interacțiunea compusului **322** cu un exces de acid fluorosulfonic (5 eq.), în

condiții blânde (-60 °C), s-a obținut aldehida **192** cu un randament de 75% și doar urme de alcool alilic **64**. De asemenea, s-a încercat deschidere ciclului epoxidic în condiții bazice. Tratarea epoxidului **322** cu LiOH în DMSO, într-un interval de temperaturi de la 80 la 140 °C, a generat aldehida **192** (21%) și alcool alilic **64** (20%), randamentul total fiind modest. Aldehida **192** este un compus sintetic raportată anterior doar în formă metilată [74], iar alcoolul **64** este un compus natural, izolat din mai multe specii de plante [215 – 217]. Rezultatele obținute sunt reflectate in Tabelul 3.1.

N/o	Condiții de reacție	Substrat %	Aldehidă 192 , %	Alcool alilic 64 , %
1	70% HClO ₄ , DMSO, H ₂ O, 4 - 24 ore	-	26	44
2	HSO ₃ F, <i>i</i> -Pr NO ₂ , CH ₂ Cl ₂ , - 70°C, 15 min.	-	75	2
3	LiOH, DMSO, H ₂ O, 140°C, 24 ore	15	21	20

Tabelul 3.1. Raportul procentual al compușilor **192** și **64** obținuți în condiții diferite de hidroliză.

Aldehida **192** este caracterizată în spectrul *IR* de benzile de absorbție specifice ale grupelor carboxil (1691 cm⁻¹) și carbonil (2737 cm⁻¹). În spectrul ¹*H NMR* sunt prezente semnale singlet a două grupe metil terțiare la δ 1.23 și 0.92 ppm, C-18 ecuatorială și C-20 axială, care sunt caracteristice *ent*-kauranilor cu grupa carboxil axială în C-19. Tot aici, se găsesc semnalul triplet monoprotonic al grupei CH din C-16 la 2.58 ppm și semnalul dublet al protonului legat de grupa carbonil din C-17 la 9.64 - 9.65 ppm. Spectrul ¹³*C RMN* atestă prezența grupelor metil în C-18 (28.9 ppm) și C-20 (15.5 ppm) și a nouă grupe metilenice. Semnalele carbonilor cuaternari din pozițiile C-4, C-8 și C-10 se regăsesc la 43.7, 45.1 și 39.6 ppm, iar semnalul grupelor carbonil din pozițiile C-19 și C-17 se găsesc 184.0 și 203.7 ppm respectiv. Semnalele carbonilor trisubstituiți C-5, C-9 și C-16 se găsesc la 56.9, 55.2 și 53.6 ppm. Stereochimia relativă a grupei CHO s-a stabilit a fi α -orientată, în baza corelațiilor ¹*H*-¹*H NOESY* dintre atomi de hidrogen din pozițiile H_{α}-13 \leftrightarrow H-17 și H-16 \leftrightarrow H-15, precum și prin comparația deplasărilor chimice și a scindării centrului H-17 în compușii analogi din literatură [218].

Acidul 17-hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oic (**64**) este caracterizat în spectrul *IR* de benzi de absorbție specifice ale grupelor carboxil (2931 și 1693 cm⁻¹), hidroxil (3400 – 200 cm⁻¹) și a legăturii duble endociclice (917 cm⁻¹). În spectrul ^{*I*}*H NMR* sunt prezente semnalele singlet ale grupelor metil din C-18 și C-20 (1.24 și 0.97 ppm), semnalul singlet monoprotonic din C-15 la 5.36 ppm și semnalul dublet al grupei metilenice din C-17 la 4.19. Spectrul ^{*I3*}*C RMN* se atestă prezența grupelor metil în C-18 (28.9 ppm) și C-20 (15.4 ppm) și a nouă grupe metilenice, inclusiv a celei din C-17 de la 61.3 ppm. Semnalele carbonilor cuaternari din pozițiile C-4, C-8, C-10 și C-16 se găsesc la 43.7, 48.9, 39.8 și 146.1 ppm, iar semnalul grupei carboxil din poziția C-19 se găsește la 183.4 ppm. Semnalele carbonilor trisubstituiți C-5, C-9 și C-15 se găsesc la 56.7, 47.5 și 135,5 ppm. Datele spectrale ale hidroxiacidului **64** coincid cu cele din literatură [219].

Astfel, pornind de la acidul *ent*-kaur-16-en-19-oic (**4**) au fost obținuți o serie de compuși naturali și sintetici. De asemenea, au fost studiate diferite posibilități de hidroliză a epoxidului **322**.

3.2.3. Oxidarea acidului ent-kaur-16-en-19-oic cu tetraoxid de osmiu

O altă direcție atractivă și promițătoare în funcționalizarea *ent*-kaurenilor este oxidarea legăturii dublei cu obținerea unor compuși dihidroxilați. La oxidarea acidului *ent*-kaur-16-en-19-oic (**4**) cu tetraoxid de osmiu (OsO₄), în prezența cocatalizatorului K_3 [Fe(CN)₆] conform metodei [220], s-a obținut acidul 16 α ,17-dihidroxi-*ent*-kauran-19-oic (**53**) cu un randament de 70% (Figura 3.5) [213].



Reagenți și condiții: (a) OsO₄, K₃[Fe(CN)₆], *t*-BuOH, H₂O, t.c, 48 ore, 70%; (b) Ac₂O, Py, t.c, 48 ore, 95%; (c) Ac₂O, Py, DMAP, t.c, 24 ore, 95%.

Fig. 3.5. Schema reacției de obținere a acidului 16α,17-dihidroxi-*ent*-kauran-19-oic (53) și a acetaților 323 și 324, pornind de la acidul *ent*-kaur-16-en-19-oic (4).

Trebuie de menționat faptul că, acidul 16α ,17-dihidroxi-*ent*-kauran-19-oic (**53**) a fost izolat anterior din specii de *Helianthus* sp. [221], din plantele medicinale *Wedelia calycina*

[222] și *Siegesbeckia pubescens* [67], din fructe verzi, coajă și frunze de *Xylopia frutescens*.[223] și din fructele unor specii *Annona* sp.[164, 224]. Acidul **53** a fost raportat ca componentă biologic activă a plantelor, manifestând activitate anti-HIV [224], anti-cancer [225] și anti-Alzheimer [16]. Mai recent, acidul **53** este raportat, de rând cu alți *ent*-kaurani, ca având un efect inhibitor semnificativ asupra producerii de oxid nitric induse de lipopolizaharide în celulele microgliale BV2 [226], fiind un agent anti-neiroinflamator promițător.

Dihidroxiacidul **53** este caracterizat în spectrul *IR* prin benzi de absorbție specifice ale grupelor carboxil (2935, 1716 cm⁻¹) și hidroxil (3431 cm⁻¹). În spectrul ¹*H NMR* sunt prezente semnalele singlet ale grupelor metil din C-18, C-20 (1.22, 0.96 ppm) și semnalele dublet la 3.62 și 3.74, indicând prezența unei grupe hidroxi-metilenice în C-17. Spectrul ¹³*C RMN* atestă prezența în moleculă a grupelor metil în centrele C-18 (28.9 ppm) și C-20 (15.6 ppm) și a zece grupe metilenice, evidențiindu-se carbonul din C-17 (66.2 ppm) la care este localizată grupa hidroxil. Semnalele carbonilor cuaternari din pozițiile C-4, C-8, C-10 și C-16 se găsesc la 43.7, 44.7, 39.6 și 81.9 ppm, iar semnalul grupei carboxilice din poziția C-19 se regăsește la 183.7 ppm. Semnalele carbonilor trisubstituiți C-5 și C-9 se găsesc la 57.0 și 56.1 ppm. Stereochimia relativă a centrului C-16 a fost stabilită în baza corelației ¹*H*-¹*H NOESY* și prin comparație cu datele din literatură. Corelația protonilor H₂-17 \leftrightarrow H₂-15 \leftrightarrow H_β-9, și lipsa unei corelații cu H_α-13, ne vorbește despre configurația 16α-OH. Datele spectrale ale acidul 16α,17-dihidroxi-*ent*kauran-19-oic (**53**) coincid cu cele din literatură [227].

Următorul pas a constat în acetilarea acidului **53** în condiții standard (Ac₂O în Py), obținându-se acidul 16 α -hidroxi-17-acetoxi-*ent*-kauran-19-oic (**323**) (95%) (Figura 3.5), compus natural izolat anterior din planta medicinală *Inula japonica* Thunb. Cercetările recente au demonstrat că compusul **323** inhibă semnificativ producerea monoxidului de azot (NO) în celulele RAW264.7 macrofage [227].

Compusul **323** este caracterizat în spectrul *IR* prin benzi de absorbție specifice grupelor carboxil (1705 cm⁻¹), hidroxil (3400 cm⁻¹) și acetoxi (1725 cm⁻¹). În spectrul ^{*I*}*H NMR* sunt prezente semnale singlet a două grupe metil terțiare la 1.21 și 0.93 ppm, din centrele C-18 ecuatorial și C-20 axial specifice *ent*-kauranilor cu grupă carboxilică axială în C-19. Altă caracteristică majoră în spectrul protonic este semnalul singlet din C-17 la 4.22 ppm, ce indică prezența unei grupe metilen exociclice oxigenate și un singlet la 2,08 ppm caracteristic grupei metil din componența OAc. Spectrul ^{*I3*}*C RMN* atestă prezența în moleculă a grupelor metil în C-18 (28.9 ppm), C-20 (15.6 ppm), a metilului (20.9 ppm) din componența grupei OAc și a zece grupe metilenice, cea din C-17 (68.4 ppm) fiind oxigenată (OAc). Semnalele carbonilor cuaternari din pozițiile C-4, C-8, C-10 și C-16 se găsesc la 43.6, 44.7, 39.6 și 80.1 ppm, iar semnalele carbonililor din componența grupelor COOH din C-19 și OAc se găsește la 183.8 și 171.3 ppm respectiv. Semnalele carbonilor trisubstituiți C-5 și C-9 se găsesc la 56.7 și 55.6 ppm. În experimentul 2D ${}^{1}H{-}^{13}C$ HMBC se observă o corelare a protonilor H-17 și a atomiilor de carbon din centrele C-13, C-15 și C-16 și grupa OAc (171.3 ppm). Stereochimia relativă a centrului C-16 rămâne neschimbată, ceea ce a fost stabilit în baza corelației ${}^{1}H{-}^{1}H$ NOESY și prin comparație cu datele din literatură. Datele spectrale ale acidul 16 α -hidroxi-17-acetoxi-*ent*-kauran-19-oic (**323**) coincid cu cele din literatură [227].

În continuare, compusul **323** a fost supus acetilării cu obținerea produsului diacetilat. Reacția de acetilare a grupei OH terțiare a fost efectuată în prezența unei cantități catalitice de dimetilaminopiridină. Astfel, în urma reacției s-a obținut diacetatul corespunzător, acidul 16α ,17-diacetoxi-*ent*-kauran-19-oic (**324**) cu un randament de 95% (Figura 3.5). Diacetatul **324** a fost anterior izolat din tulpina plantei *Annona senegalensis* și manifestă activitate citotoxică selectivă a supra celulelor PC-3 (cancer de prostată) [199].

Acidul 16 α ,17-diacetoxi-*ent*-kauran-19-oic (**324**) este caracterizat în spectrul *IR* prin benzi de absorbție specifice grupelor carboxil (1701 cm⁻¹) și acetoxi (1727 cm⁻¹). În spectrul ¹*H NMR* sunt prezente semnale singlet a două grupe metil terțiare la 1.23 și 0.93 ppm, din centrele C-18 și C-20. De asemenea, în spectrul protonic se evidențiază semnalele dublete la ô 4.42 și 4.93 ppm (2H), și două singlete la 1.99 și 2.05 ppm (3H), indicând prezența unei grupe metilen exociclice oxigenate și a două grupe metil din componența grupelor OAc. Spectrul ¹³*C RMN* atestă prezența în moleculă a grupelor metil în C-18 (28.9 ppm), C-20 (15.6 ppm), două grupe metil din componența grupelor OAc la 20.8 și 22.4 ppm, și a zece grupe metilenice, cea din C-17 (63.5 ppm) fiind oxigenată. Semnalele carbonilor cuaternari din pozițiile C-4, C-8, C-10 și C-16 se găsesc la 43.7, 44.4, 39.6 și 90.5 ppm, iar semnalele carbonililor din componența grupei carboxil din C-19 și a celor două grupe OAc se regăsesc la 183.6, 170.7 și 170.8 ppm, respectiv. Semnalele carbonilor trisubstituiți C-5 și C-9 se găsesc la 56.7 și 55.4 ppm. Experimentul ¹*H*–¹³*C HMBC* denotă o corelație a protonilor H-17 și a atomilor de carbon din centrele C-13, C-15, C -16 și grupa OAc. Stereochimia relativă a centrului C-16 se păstrează. Datele spectrale ale acidului **324** coincid cu cele din literatură [199].

Astfel, pornind de la acidul *ent*-kaur-16-en-19-oic (**4**) au fost obținuți o serie de compuși naturali bioactivi. Acidul **53** a fost raportat ca componentă biologic activă a plantelor, manifestând activitate anti-HIV, anti-cancer și anti-Alzheimer.

3.3. Funcționalizarea acidului *ent*-kaur-16-en-19-oic cu diacetat de iodobenzen – bromură de litiu (PhI(OAc)₂ – LiBr) și/sau periodat de sodiu – bromură de litiu (NaIO₄ – LiBr)

Următorul pas în funcționalizarea acidului *ent*-kaur-16-en-19-oic (**4**) a constat în obținerea derivaților funcționalizați printr-o serie de reacții diastereoselective de dihidroxilare a legăturii duble conform metodei [188]. În cazul diterpenoidelor în general și a kauranilor în particular, prezența mai multor centre reactive în aceiași moleculă creează dificultăți în parcursul chemo- și regioselectiv al reacțiilor, dar totodată, această particularitate poate genera produși cu totul neașteptați.

Astfel, la interacțiunea acidului *ent*-kaur-16-en-19-oic (**4**) cu PhI(OAc)₂, reacția fiind catalizată de LiBr în mediu de acid acetic glacial (95 °C), s-a obținut o serie de compuși polifuncționalizați interesanți [228]. Produsul de reacție, sub forma unui amestec complex, a fost supus cromatografiei pe coloană cu silicagel și eluarea în gradient cu eter de petrol/acetat de etil a permis izolarea a cinci compușii, dintre care, **325 – 327** și **329** nu au fost raportați anterior (Figura 3.6). Randamentul sumar al compușilor constituie 72%.

De pe coloană au fost eluați în ordinea creșterii polarității următorii compuși: amestecul de bromuri izomere (E/Z) **325** și **326** (13%), acidul 17-bromo-15 α -acetoxi-16Z-ent-kaur-16-en-19-oic (**327**) (40%), acidul 15 α -acetoxi-ent-kaur-16-en-19-oic (**328**) (2%) și acidul 17-bromo-16 α -acetoxi-ent-kauran-19-oic (**329**) (17%) (Figura 3.6).



Reagenți și condiții: (a) PhI(OAc)₂ (1 eq.), LiBr (20 mol/%), AcOH, 95 °C, 18 ore.

Fig. 3.6. Schema reacției acidului ent-kaur-16-en-19-oic (4) cu PhI(OAc)₂ - LiBr.

Compușii noi posedă un nivel înalt de funcționalizare, conținând grupa carboxil, legătura dublă, grupa OAc și brom, și reprezintă produse cu un potențial sporit de bioactivitate. Structura acizilor **325** – **329** a fost stabilită în baza datelor spectrale. Amestecul de bromuri izomere **325** și **326** a fost recromatografiat pe colană cu silicagel, în rezultat, obținându-se doi produși individuali, acizii 17-bromo-16*Z-ent*-kaur-16-en-19-oic (**325**) și 17-bromo-16*E-ent*-kaur-16-en-19-oic (**326**).

Mecanismul propus de obținere a bromurelor izomere presupune formarea ionilor de bromoniu **Iab** și formarea compușilor dibromurați **IIab**, prin adiție stereoselecivă. Eliminarea unei molecule de HBr generează, în primul caz, derivatul *cis* (*Z*) **325**, iar in al doilea caz derivatul *trans* (*E*) **326** (Figura 3.7).



Fig. 3.7. Mecanismul presupus al reacției de obținere a compușilor 325 și 326.

Structura acidului 17-bromo-16*Z-ent*-kaur-16-en-19-oic (**325**), conform spectrelor de rezonanță magnetică, conține grupa carboxil, legătura dublă, un atom de brom și două grupe metil, atribuite prin analiza corelațiilor corespunzătoare ${}^{1}H{}^{-1}H$ COSY și NOESY, ${}^{1}H{}^{-13}C$ HSQC și *HMBC*. Spectrul *IR* confirmă datele de mai sus, prin prezența benzilor de absorbție specifice ale grupei carboxil (3040 cm⁻¹), ale legăturii duble exociclice (1690cm⁻¹) și a unui atomului de Br (740 cm⁻¹). În spectrul ${}^{1}H$ NMR sunt prezente semnale singlet a două grupe metil la 1.24 și 0.94 ppm, din centrele C-18 ecuatorial și C-20 axial. Alte caracteristici în spectrul protonic sunt semnalul singlet al protonului din poziția C-13 (3.02 ppm) și semnalul singlet monoprotonic al grupei CH din C-17 (5.81 ppm) (Figura 3.10). Spectrul ${}^{13}C$ RMN confirmă prezența în molecula compusului **325** a grupelor metil din pozițiile C-18 (28.90 ppm) și C-20 (15.60 ppm), a 9 grupe

metilen, inclusiv, din poziția C-15 de la 48.91 ppm. De asemenea, din spectrul carbonic observăm semnalele carbonilor cuaternari din pozițiile C-4 (43.65 ppm), C-8 (45.24 ppm), C-10 (39.68 ppm) și a carbonului tetrasubstituit C-16 (151.02 ppm) de la legătura dublă. Tot aici, depistăm semnalul grupei carboxil din poziția C-19 la 183.12 ppm.

Unele corelații ${}^{1}H^{-13}C$ HMBC, ce confirmă atribuirile de mai sus, sunt: $H_{3}-20 \rightarrow C-1$, C-5, C-9 și C-10; $H_{3}-18 \rightarrow C-3$, C-4, C-5 și C-19; $H_{\beta}-9 \rightarrow C-8$, C-10, C-11, C-15; $H_{2}-14 \rightarrow C-9$, C-12; $H_{2}-15 \rightarrow C-8$, C-14, C-16; H-17 \rightarrow C-15, C-16 (Figura 3.8). Stereochimia legăturii duble a fost stabilită în baza exprerimentului *NOESY* și prin comparația deplasării semnalelor în ambii izomeri **325** și **326**. Corelația protonilor H-17 \leftrightarrow H-15 și lipsa corelației cu H-14 (Figura 3.8), precum și deplasarea în câmp mai puternic a semnalelor caracteristice H-17 în comparație cu bromura **326** (Figura 3.9), ne vorbește despre configurația 17Z și corespunde acidului 17-bromo-16Z-ent-kaur-16-en-19-oic (**325**).



Fig. 3.8. Corelații selectate ${}^{1}H^{-13}C HMBC$, ${}^{1}H^{-1}H COSY$ și *NOESY* ale acidului 17-bromo-16Z*ent*-kaur-16-en-19-oic (**325**).

Structura acidului **326** este caracterizată în spectrul *IR* de benzile de absorbție specifice grupei carboxil (1695 cm⁻¹), legăturii duble exociclice (3030cm⁻¹) și unui atomului de Br (733 cm⁻¹). În spectrul ¹*H RMN* al compusul **326** sunt prezente semnalele singlet ale grupelor metil din pozițiile C-18 (1.24 ppm) si C-20 (0.93 ppm), semnalul singlet al protonului din poziția C-13 (2.76 ppm) și semnalul triplet al grupei CH din poziția C-17 de la 5.87 ppm (Figura 3. 10). Spectrul ¹³*C RMN* confirmă prezența în moleculă acestui compus a grupelor metil din pozițiile C-18 (28.9 ppm) si C-20 (15.6 ppm), a nouă grupe metilen. De asemenea, din spectrul carbonic observăm semnalele carbonilor cuaternari tetrasubstituiți din pozițiile C-4 (43.6 ppm), C-8 (43.7 ppm), C-10 (39.6 ppm) și a carbonului cuaternar din C-16 (152.5 ppm) de la legătura dublă. Tot aici, depistam semnalul grupei carboxil din poziția C-19 (183.6 ppm). Corelații ¹*H*-¹³*C HMBC*,

ce confirmă atribuirile de mai sus, precum și majoritatea atribuirilor din compusul **326** sunt similare cu cele din compusul **325**, diferența constând doar în stereochimia legăturii duble.



Fig. 3.9. Corelații ${}^{1}H - {}^{1}H$ NOESY cheie ale acidului 17-bromo-16E-*ent*-kaur-16-en-19-oic (**326**).

Stereochimia legăturii duble a fost stabilită în baza corelațiilor ${}^{1}H^{-1}H$ NOESY și prin comparația deplasării semnalelor în ambii izomeri **325** și **326**. Corelația protonilor H-17 \leftrightarrow H_a-13 \leftrightarrow H-14 (Figura 3.9), precum și deplasarea în câmp mai slab a semnalelor caracteristice protonului H-17 în comparație cu bromura **325**, ne vorbește despre configurația 17*E* (*trans*), și corespunde acidului 17-bromo-16*E-ent*-kaur-16-en-19-oic (**326**).



Fig. 3.10. Spectrele ¹H RMN ale compuşilor **325** şi **326** - prezentarea comparativă.

Acizii **327** și **328** au multe similitudini structurale și în conformitate cu mecanismul propus (Figura 3.11), compusul **327** practic derivă din compusul **238**. Astfel, în cazul

compusului 238, mecanismul de obținere propus (Figura 3.11.) presupune formarea *ent*-kaurenil carbocationului bromurat I, prin intermediul ionului de bromoniu. Migrarea 1,2-H din centrul C_{15} (II) și acetoxilarea ulterioară conduce la bromoacetoxi-derivatul III. În continuare, are loc pierderea unei molecule de HBr și formarea legăturii duble în 238. Acidul 327 se formează la bromurarea compusului 238 cu generare specie IV și eliminarea ulterioară a unei molecule de HBr.



Fig. 3.11. Mecanismul presupus al reacției de obținere a compușilor 327 și 328.

Compusul **327** este caracterizată în spectrul *IR* de benzile de absorbție specifice grupelor carboxil (1690 cm⁻¹) și OAc (1725 cm⁻¹), legăturii duble exociclice (3100 cm⁻¹) și unui atomului de Br (730 cm⁻¹). În spectrul ¹*H NMR* sunt prezente semnale singlet a două grupe metil terțiare la 1.23 și 0.95 ppm, din centrele C-18 ecuatorial și C-20 axial specifice diterpenoidelor *ent*-kaurenice. Alte caracteristici majore în spectrul protonic sunt semnalul singlet al metilului din componența grupei OAc (2.06 ppm), semnalul singlet al protonului din poziția C-13 (3.12 ppm) și semnalele singlet monoprotonice ale grupelor CH din pozițiile C-15 (5.16 ppm) și C-17 (6.38 ppm) (Figura 3.13). Spectrul ¹³*C RMN* confirmă prezența grupei OAc (21.11 ppm), și a opt grupe metilenice, din pozițiile C-1 (40.61 ppm), C-2 (19.00), C-3 (37.67 ppm), C-6 (20.80 ppm), C-7 (34.74 ppm), C-11 (19.00 ppm), C-12 (28.71 ppm), C-14 (36.60 ppm). De asemenea, din spectrul carbonic observăm semnalele carbonilor tetrasubstituiți din pozițiile C-4, C-8 și C-10 de la 43.6, 48.6 și 39.9 ppm, și a carbonului cuaternar C-16 (151.3 ppm) de la legătura dublă. Tot aici, regăsim semnalele carbonililor din componența grupelor OAc din poziția C-15 (171.0 ppm) și COOH din poziția C-19 (183.7 ppm).

Corelațiile *HMBC* de bază ale compusului **327** sunt asemănătoare acizilor **325** și **325**, doar că suplimentar se observă interacțiuni ale protonului CH-15 cu grupa OAc (170.8 ppm) și cu centrele C-9, C-13, C-14 și C-16. Configurația grupei OAc din poziția C-15 a fost confirmată în baza experimentului *NOESY*, care indică corelații între atomi de hidrogen din pozițiile H_β-9 \leftrightarrow H-15 \leftrightarrow H-17 și H₂-14 \leftrightarrow H-13 \leftrightarrow H2-12 (Figura 3.12) și corespunde acidului 17-bromo-15 α acetoxi-16Z-*ent*-kaur-16-en-19-oic (**327**).



Fig. 3.12. Corelații ${}^{1}H^{-1}H$ NOESY cheie ale acidului 17-bromo-15 α -acetoxi-16Z-*ent*-kaur-16-en-19-oic (**327**).

Acetatul **328** este caracterizat în spectrul *IR* prin benzi de absorbție specifice grupelor COOH (1690 cm⁻¹), OAc (1730 cm⁻¹) și a legăturii duble exociclice (1620, 895 cm⁻¹). În spectrul ¹*H NMR* sunt prezente semnalele singlet ale grupelor metil din C-18, C-20 (1.23, 0.96 ppm), semnalul singlet monoprotonic C-15 la 5.09 ppm și semnalul dublet al grupei metilenice de la legătura dublă din C-17 la 5.09 și 5.25 ppm (Figura 3.13). Spectrul ¹³*C RMN* atestă prezența în moleculă a grupelor metil în C-18 (28.8 ppm), C-20 (15.8 ppm), Me(OAc) (21.2 ppm), a nouă grupe metilenice, deplasarea centrului C-17 (109.9 ppm) fiind specifică legăturii dublă. Semnalele carbonilor cuaternari din pozițiile C-4, C-8, C-10 și C-16 se găsesc la 43.7, 47.5, 39.9 și 155.4 ppm, iar semnalele grupelor carboxil C-19 și OAc se regăsesc la 183.9 și 171.0 ppm. Semnalele carbonilor trisubstituiți C-5, C-9 și C-15 se găsesc la 56.6, 53.0 și 83.0 ppm.



Fig. 3.14. Corelații ${}^{1}H^{-1}H$ NOESY cheie ale acidului 15 α -acetoxi-*ent*-kaur-16-en-19-oic (**328**).



Fig. 3.13. Spectrele ¹*H RMN* ale compuşilor **327**, **328** şi **329** - viziune comparativă.

Stereochimia relativă a grupei OAc s-a stabilit a fi α -orientată, în baza coralației *NOESY* dintre atomi de hidrogen din pozițiile H-15 \leftrightarrow H_{β}-9 (Figura 3.14). Conform datelor spectrale compusul analizat corespunde acidului 15 α -acetoxi-*ent*-kaur-16-en-19-oic (**328**), compus natural cunoscut în literatură și ca acid acetoxi-grandifloric. Datele spectrale ale acestui compus corespund cu cele din literatura [229].

În cazul compusului **329** mecanismul propus de obținere presupune formarea carbocationului bromurat **I**, prin intermediul ionului de bromoniu, și acetoxilarea ulterioară a acestuia, generând astfel bromoacetoxi-derivatul **329** (Figura 3.15).



Fig. 3.15. Mecanismul presupus al reacției de obținere a compusului 329.

Acidul 17-bromo-16α-acetoxi-ent-kauran-19-oic (329) prezintă în spectrul IR este benzi de absorbție specifice grupelor COOH (1690 cm⁻¹) și OAc (1717 cm⁻¹), și a unui atom de Br (720 cm⁻¹). În spectrul ¹H RMN (Figura 3.13) sunt prezente semnalele singlet ale grupelor metil din pozițiile C-18 (0.94 ppm) și C-20 (1.23 ppm), semnalul singlet al grupei metil din componența grupei OAc (2.05 ppm), semnalul triplet al protonului din poziția C-13 (2.47 ppm) si semnalele dublet monoprotonice ale grupei metilen din poziția C-17 (3.89 și 4.34 ppm). Spectrul ¹³C RMN confirmă prezența grupelor metil din pozițiile C-18 (28.87 ppm), C-20 (15.40 ppm) si Me(OAc) (22.24 ppm), a 9 grupe metilen, din pozitiile C-1 (40.50 ppm), C-2 (18.93), C-3 (37.68 ppm), C-6 (21.83 ppm), C-7 (41.79 ppm), C-11 (18.63 ppm), C-12 (25.38 ppm), C-14 (37.13 ppm) și C-17 (34.7 ppm). Semnalele carbonilor trisubstituiți C-5 și C-9 se regăsesc la 56.6 și 5.38 ppm. De asemenea, din spectrul carbonic observăm semnalele carbonilor tetrasubstituiți din pozițiile C-4 (43.7 ppm), C-8 (45.0 ppm), C-10 (39.6 ppm), C-16 (90.01 ppm) și semnalele carbonililor din componența grupelor OAc din poziția C-16 (170.8 ppm) și COOH din poziția C-19 (183.9 ppm). Unele corelații HMBC, ce confirmă atribuirile de mai sus, sunt: $H_3-20 \rightarrow C-1, C-5, C-9$ si C-10; $H_3-18 \rightarrow C-3, C-4, C-5$ si C-19; $H_{\beta}-9 \rightarrow C-8, C-10, C-11, C-15$; H_a -13 \rightarrow C-12, C-14, C-15 și C-16; H_2 -17 \rightarrow C-13, C-15 și C-16. Configurația centrului C-16 sa stabilit a fi α -OAc și a fost confirmată în baza experimentului *NOESY*, care indică o corelație între următorii atomi de hidrogen: $H_2-17 \leftrightarrow H_2-15 \leftrightarrow H_\beta-9$ (Figura 3.16).



Fig. 3.16. Corelații ${}^{1}H - {}^{1}H$ NOESY cheie ale acidului 17-bromo-16 α -acetoxi-*ent*-kauran-19-oic (**329**).

Funcționalizarea acidul *ent*-kaur-16-en-19-oic (**4**) cu sitemul NaIO₄/LiBr, a generat, la fel, cinci compuşi: amestecul de bromuri izomere **325** și **326** (10%), acidul 15 α -acetoxi-*ent*-kaur-16-en-19-oic (**328**; 32%), acidul 17-bromo-16 α -acetoxi-*ent*-kauran-19-oic (**329**; 17%) și acidul grandifloric (**12**; 19%) [230] (Figura 3.17). În comparație cu sistemul precedent, compușii obținuți sunt similari, excepția compusului **327** care nu a fost identificat ca produs de reacție. În schimd a fost izolat acidul grandifloric (**12**), o diterpenoidă naturală foarte des întâlnită în plante. Datele spectrale ale acestui compus au fost descrie anterior și coincid cu datele din literatură [203, 231].



Reagenți și condiții: (a) NaIO₄ (30 mol/%), LiBr (20 mol/%), AcOH, 95 °C, 18 ore.

Fig. 3.17. Schema reacției acidului ent-kaur-16-en-19-oic (4) cu NaIO₄ – LiBr.

Mecanismul propus, de obținere a compusului **12** (Figura 3.18), este similar celui de obținere a compusului **128**, diferă doar nucleofilul. Inițial, prin intermediul ionului de bromoniu, se formează carbocationul bromurat **I**, urmând migrarea 1,2-H din centrul C_{15} (**II**) și hidroxilarea

ulterioară, cu generarea bromohidroxi-derivatul **III**. În continuare, are loc eliminarea unei molecule de HBr și formarea legăturii duble în compusul **12**.



Fig. 3.18. Mecanismul presupus al reacției de obținere a compusului 12.

Astfel, interacțiunea acidului *ent*-kaur-16-en-19-oic (**4**) cu sintemele PhI(OAc)₂/LiBr și NaIO₄/LiBr, în mediu de acid acetic a generat o serie de compuși *ent*-kauranici funcționalizați în centrele C-15, C-16 și C-17. Datorită gradului înalt de funcționalizare acești derivați *ent*-kauranici reprezintă compuși cu un potențial sporit de activitate biologică, unii fiind incluși în studii curente ce țin de activitatea citotoxică testată pe diferite linii de celule canceroase.

3.4. Transformările sintetice ale acidului *ent*-kaur-16-en-19-oic. Partea experimentală *Izomerizarea superacidă a acidului* ent-*kaur-16-en-19-oic (4)*

Soluția formată din substratul 4 (403 mg, 1,324 mmol) în 2-nitropropan (2 mL) și CH_2Cl_2 (9 mL), răcită în prealabil (-60 °C), este tratată cu soluție răcită de FSO₃H (662 mg, 6,62 mmol) în 2-nitropropan (1,4 mL). După 15 min de agitare la -60 °C, amestecul de reacție a fost neutralizat cu Et_3N /hexan 1:1 (8 mL). Apoi, amestecul este diluat cu apă (10 mL) și se prelucrează obișnuit, generând 395 mg produs de reacție. Acesta a fost supus cromatografiei pe coloană cu SiO₂ (10 g). Eluarea în gradient cu EP/EtOAc a permis izolarea fracției cu compușii nepolari (298 mg, 74%) și a fracție cu compușii polari (74 mg, 18%). Prima fracție (298 mg) a fost recromatografiată pe coloană cu SiO₂ impregnat cu nitrat de argint (16 g) și eluarea cu benzene și cu sistemul benzen/EtOAc a permis izolarea compușilor izomeri: **310** (33 mg, 8%; benzen), **311** (89 mg, 22%; benzen) și **4** recuperat (74 mg, 18%; benzen/EtOAc 1%) și **63** (68 mg, 17%; benzen/EtOAc 1%) și **312** (30 mg, 7%; benzen/EtOAc 3%). Fracție polară (74 mg) la fel a fost recromatografiată pe coloană cu silicagel impregnat cu nitrat de argint (4 g) și eluarea

în gradient cu sistemele benzen/EtOAc (7 – 15%) a generat: **312** (19 mg, 5%) și **314** (16 mg, 4%). Produșii sunt descriși în capitolul 2 (vezi subcapitolul 2.4).

Oxidarea alilică a acidului ent-kaur-16-en-19-oic (4)

La soluția de SeO₂ (23 mg, 0.207 mmol) în etanol (1.5 mL), s-a adăugat soluția de acid *ent*-kaur-16-en-19-oic (**4**) (125 mg, 0.414 mmol) în etanol (1.5 mL) și reacția a fost refluxată 4 ore (CSS). Apoi amestecul de reacție a fost răcit la 0 °C și s-a adăugat NaBH₄ (7.8 mg, 0.207 mmol), continuând agitarea încă o jumătate de oră, la temperatura camerei. După prelucrare obișnuită s-au obținut 92 mg de produs crud, care fiind cromatografiat pe coloană cu silicagel (2 g; EP/EtOAc 20%) a generat 89.5 mg acid 15*α*-hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oic (**12**) (68%).



*Acidul 15α-hidroxi*ent-*kaur-16-en-19-oic* (**12**) substanță cristalină, p.t. 219 – 221 °C ([204]: p.t. 230 – 232 °C); $[\alpha]_D^{20} = -103.3^\circ, c 0.5, CHCl_3;$ *IR* (v, cm⁻¹): 3415-2725, 1690, 1620, 895; ¹*H-NMR* (400 MHz, δ H): 0.96 (3H, s, Me-20), 1.25 (3H, s, Me-18), 2.75 (1H, s, H-13), 3.80 (1H, s, H-15), 5.08 (1H, s, H_a-17), 5.22 (1H, s, H_b-17); ¹³*C-NMR* (100 MHz, δ C): 40.6 (t, C-1), 19.1 (t, C-2), 37.8 (t, C-3), 43.5 (s, C-4), 57.3 (d, C-5), 21.0 (t, C-6), 35.5 (t, C-7), 47.7 (s, C-8), 53.4 (d, C-9), 40.1 (s, C-10), 18.4 (t, C-11), 32.8 (t, C-12), 42.3 (d, C-13), 36.2 (t, C-14), 82.7 (d, C-15), 160.4 (s, C-16), 108.3 (t, C-17), 29.1 (q, C-18), 183.7 (s, C-19), 15.9 (q, C-20);

Calcule analit. C₂₀H₃₀O₃: C 75.43, H 9.5; găsit: C 75.40, H 9.08.

Saponificarea esterului angelic al acidului ent-kaur-16-en-19-oic (307)

La soluția formată din esterul 15α -angeloil-*ent*-kaur-16-en-19-oic (**307**) (115 mg, 0.287 mmol) în 2.0 mL de EtOH s-a adăugat 1.4 mL soluție de 10% KOH/EtOH. Amestecul reactant este refluxat 2 ore (CSS). După prelucrare obișnuită s-au obținut 98 mg de produs crud, care fiind cromatografiat pe coloană cu silicagel (2 g; EP/EtOAc 20%) generează 88.5 mg acid 15α -hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oic (**12**) (97%).

Oxidarea acidului 15a-hidroxi-ent-kaur-19-oic acid (12)

La soluția formată din alcoolul **12** (35 mg, 0.11 mmol) în CH_2Cl_2 uscată (4 mL) s-a adăugat complexul [C_5H_5NH][CrO_3Cl] (85 mg, 0.33 mmol). Reacția a fost agitată la temperatura camerei timp de 24 ore (CSS), apoi a fost filtrată, generând 31.5 mg de produs crud.

Cromatografia produsului de reacție pe coloană cu silicagel (0.5 g; EP/EtOAc 15 – 20%) a permis izolarea a 29.2 mg acid 15-oxo-*ent*-kaur-16-en-19-oic (**115**) (84%).

Acidul 15α-hidroxi-entkaur-16-en-19-oi (**115**) $[\alpha]_D^{20} = -176.0^\circ$, *c* 0.15, CHCl₃ ([211]: $[\alpha]_D^{20} = -169^\circ$, *c* 1.19, MeOH); *IR* (v, cm⁻¹): 1718, 1680, 1637, 896; ^{*1*}*H-NMR* (400 MHz, δ H): 0.97 (3H, s, Me-20), 1.25 (3H, s, Me-18), 2.93 (1H, s, H-13), 5.22 (1H, s, H_a-17), 5.88 (1H, s, H_b-17); ^{*13*}*C-NMR* (100 MHz, δ C): 39.8 (t, C-1), 18.9 (t, C-2), 37.9 (t, C-3), 43.5 (s, C-4), 57.0 (d, C-5), 20.9 (t, C-6), 32.4 (t, C-7), 52.3 (s, C-8), 51.4 (d, C-9), 40.3 (s, C-10), 18.5 (t, C-11), 33.6 (t, C-12), 38.4 (d, C-13), 36.7 (t, C-14), 210.8 (s, C-15), 149.8 (s, C-16), 114.7 (t, C-17),

substanță cristalină, *p.t.* 196 – 198 °C ([211]: *p.t.* 211 – 213 °C);

29.1 (q, C-18), 192.5 (s, C-19), 15.7 (q, C-20);

Calcule analit. C₂₀H₂₈O₃: C 75.91, H 8.92; găsit: C 75.94, H 8.89.

Epoxidarea acidului ent-kaur-16-en-19-oic (4)

La soluția formată din 180 mg acid *ent*-kaur-16-en-19-oic (**4**) (0,6 mmol) în 2,5 mL Et₂O s-a adăugat un exces de soluție eterică de *m*CPBA (4 mL, 1.5 mmol). După 2 ore de agitare la temperatura camerei (CSS), amestecul reactant este extras cu Et₂O (30 mL × 3). Ulterior, faza organică este spălată cu soluții saturate de tiosulfat, NaHCO₃ și NaCl până la reacție neutră. Stratul organic a fost uscat pe Na₂SO₄ anh. și concentrat. Produsul crud (193 mg) a fost cromatografiat pe coloană cu silicagel (7 g), obținându-se β -epoxidul **321** (27 mg, 16%; EP/EtOAc 5 – 7%) și α -epoxidul **322** (125,8 mg, 74%; EP/EtOAc 7 – 15%). Izolarea cromatografică a epoxizilor este însoțită de izomerizarea parțială a produșilor cu generarea aldehidelor izomere corespunzătoare (~ 5%).

*Acidul 16*β,*17-epoxi*ent-*kauran-19-oic* (**321**) substanță cristalină, p.t. 166 – 168 °C; $[\alpha]_D^{20} = -91.3^\circ, c \ 0.75, CHCl_3;$ *IR* (v, cm⁻¹): 2940, 1693, 1448, 1394, 1264; ^{*1*}*H-NMR* (400 MHz, δ H): 0.97 (3H, s, Me-20), 1.24 (3H, s, Me-18), 2.76 (1H, d, *J* = 4.7, H_a-17), 2.86 (1H, d, *J* = 4.7, H_b-17); ^{*13*}*C-NMR* (100 MHz, δ C): 15.7 (q, C-20), 19.03 (t, C-2), 19.22 (t, C-11), 21.4 (t, C-6), 27.5 (t, C-12), 28.9 (q, C-18), 37.8 (t, C-3), 38.7 (t, C-14), 39.6 (s, C-10), 40.0 (d, C-13), 40.6 (t, C-1), 41.3 (t, C-7), 43.7 (s, C-4), 44.1 (s, C-8), 48.1 (t, C-15), 55.2 (d, C-9), 55.9 (t, C-17), 56.9 (d, C-5), 64.7 (s, C-16), 184.1 (s, C-19); *GC-MS*: 318, 303, 273, 261, 243, 215, 203, 166, 147, 131, 123, 109, 91; *Calcule analit.* C₂₀H₃₀O₃: C 75.43, H 9.50; găsit: C 75.47, H 9.48.

*Acidul 16α,17-epoxi*ent-*kauran-19-oic* (**322**)

substanță cristalină, p.t. 172 – 174 °C; $[\alpha]_D^{20} = -89.5^\circ, c \ 0.97, CHCl_3;$ *IR* (v, cm⁻¹): 2933, 1693, 1449, 1394, 1263; ¹*H-NMR* (400 MHz, δ H): 0.95 (3H, s, Me-20), 1.23 (3H, s, Me-19), 2.80 (1H, d, *J* = 5.4, H_a-17), 2.88 (1H, d, *J* = 5.4, H_b-17); ¹³*C-NMR* (100 MHz, δ C): 15.8 (q, C-20), 19.03 (t, C-2), 19.55 (t, C-11), 21.7 (t, C-6), 28.92 (q, C-18), 28.99 (t, C-12), 37.7 (t, C-3), 38.44 (t, C-14), 39.6 (s, C-10), 40.7 (t, C-1), 41.1 (t, C-7), 42.5 (d, C-13), 43.7 (s, C-4), 45.4 (s, C-8), 48.7 (t, C-15), 50.4 (t, C-17), 54.9 (d, C-9), 56.9 (d, C-5), 64.4 (s, C-16), 184.1 (s, C-19); *GC-MS*: 318, 303, 273, 261, 243, 215, 207, 159, 147, 131, 123, 109, 91;

Calcule analit. C₂₀H₃₀O₃: C 75.43, H 9.50; găsit: C 75.46, H 9.49.

Hidroliza acidului 160,17-epoxi-ent-kauran-19-oic (322)

Metoda 1. La soluția formată din 270 mg epoxid **322** (0.846 mmol), 8.9 mL DMSO și 4.5 mL H₂O, la agitare s-a adăugat 1.34 mL soluție $HClO_4$ (70%). Reacția este agitată 4 ore la temperatura de 45 – 50 °C (CSS), apoi amestecul reactant este diluat cu apă (10 mL) și se prelucrează obișnuit. Produsul crud (300 mg) obținut este cromatografiat pe coloană cu silicagel (6 g), obținându-se doi compuși: aldehida **192** (53 mg, 26%; EP/EtOAc 7%) și alcool alilic **64** (108 mg, 44%, EP/EtOAc 15%).

substanță cristalină, p.t. 196 – 198 °C; [*α*]²⁰_D = -126.1°, *c* 2.2, CHCl₃; *IR* (v, cm⁻¹): 2737, 1691, 1451, 1266, 1242; ^{*1*}*H-NMR* (400 MHz, δH): 0.92 (3H, s, Me-20), 1.23 (3H, s, Me-19), 2.58 (1H, t, *J* = 7, H-16), 9.65 (1H, d, *J* = 1.6, H-17); *Acidul* ent-*kauran*-17-al-19-oic (**192**) ¹³*C-NMR* (100 MHz, δC): 15.7 (q, C-20), 19.03 (t, C-2), 19.22 (t, C-11), 21.4 (t, C-6), 27.5 (t, C-12), 28.9 (q, C-18), 37.8 (t, C-3), 38.7 (t, C-14), 39.6 (s, C-10), 40.0 (d, C-13), 40.6 (t, C-1), 41.3 (t, C-7), 43.7 (s, C-4), 44.1 (s, C-8), 48.1 (t, C-15), 55.2 (d, C-9), 55.9 (t, C-17), 56.9 (d, C-5), 64.7 (s, C-16), 184.1 (s, C-19); *GC-MS*: 318, 300, 275, 261, 243, 215, 136, 123, 109, 91; *Calcule analit.* C₂₀H₃₀O₃: C 75.43, H 9.50; găsit: C 75.45, H 9.51.

Acidul 17-hidroxi-entkaur-15-en-19-oic (64)

substanță cristalină, p.t. 201 – 203 °C ([219]: p.t. 193 – 194 °C); $[\alpha]_D^{20} = -33.2^\circ, c 2.7, CHCl_3 ([129]: [\alpha]_D^{20} = -60^\circ, c 0.3, MeOH;$ $IR (v, cm^{-1}): 3400-3200, 2931, 1693, 1447, 1254, 1241, 917;$ ¹*H-NMR* (400 MHz, δ H): 0.97 (3H, s, Me-20), 1.24 (3H, s, Me-19), 4.19 (2H, d, $J = 1.2, H_2$ -17), 5.36 (1H, s, H-15); ¹³*C-NMR* (100 MHz, δ C): 15.4 (q, C-20), 18.9 (t, C-11), 19.05 (t, C-2), 20.7 (t, C-6), 25.5 (t, C-12), 28.9 (q, C-18), 37.8 (t, C-3), 39.2 (t, C-7), 39.8 (s, C-10), 40.7 (t, C-1), 41.0 (d, C-13), 43.7 (t, C-4), 43.9 (t, C-14), 47.5 (d, C-9), 48.9 (s, C-8), 56.7 (d, C-5), 61. 3 (t, C-17), 135,5 (d, C-15), 146.1 (s, C-16), 183.4 (s, C-19); *GC-MS*: 318, 300, 285, 272, 257, 241, 207, 193, 163, 159, 148, 133, 119, 105, 91; *Calcule analit.* C₂₀H₃₀O₃: C 75.43, H 9.50; găsit: C 75.46, H 9.48.

Metoda 2. Soluția formată din substratul **322** (43 mg, 0.2 mmol), 2-nitropropan (0.5 mL) și CH₂Cl₂ (1 mL), răcită în prealabil (-60 °C), este tratată cu soluție rece de FSO₃H (100 mg, 1 mmol) în 2-nitropropan (0.5 mL). După 15 min de agitare la -60 °C, reacția este neutralizat cu Et₃N/hexan 1:1 (2 mL). Apoi, amestecul de reacție este diluat cu apă (10 mL) și extras cu Et₂O (5 mL × 3), ulterior, faza organică se spală cu soluție de 10 % H₂SO₄, apă și soluție saturată de NaCl până la mediu neutru. Stratul organic se usucă pe Na₂SO₄ anh. și este concentrat la presiune redusă. Produsul crud (38 mg) este supus cromatografiei pe coloană cu silicagel (1.5 g). Eluarea în gradient cu EP/EtOAc a permis izolarea a 32 mg de aldehidă **192** (75%), iar alcoolul **64** a fost detectate doar prin CSS, fiind prezent în cantități foarte mici.

Metoda 3. La epoxidul **322** (19 mg, 0.06 mmol) dizolvat în DMSO (1 mL) s-au adăugat 3 eq. de LiOH (~4.3 mg, 0.18 mmol). Reacția a decurs la agitare în intervalul de temperaturi 110

– 140 °C (CSS). După 5 ore s-au mai adăugat 3 eq. de LiOH, dar nu au survenit schimbări în dinamica reacției. După 7 ore aceasta a fost oprită, iar amestecul de reacție a fost diluat cu apă și extras cu Et_2O (3 ml × 3), urmând prelucrarea obișnuită și uscarea pe Na_2SO_4 anh. Cromatografia pe coloană cu silicagel (1.5 g) a produsului crud (17 mg), a general produs inițial nereacționat (15%), iar randamentele aldehidei **192** și alcoolul **64** constituie 21% și 20%, respectiv.

Oxidarea acidului ent-kaur-16-en-19-oic (4) cu OsO₄

La soluția formată din 157 mg acid *ent*-kaur-16-en-19-oic (4) (0.519 mmol), 3.9 mL *t*-BuOH și 3.9 mL H₂O, la agitare s-a adăugat OsO₄ (0.1 mmol) dizolvat într-un mL de *t*-BuOH, 513 mg K₃[Fe(CN)₆] și 215 mg K₂CO₃. Reacția a fost lăsată să se agite 24 de ore la temperatura camerei (CSS). Apoi, la amestecul reactant s-a adăugat soluția formată din 150 mg Na₂S₂O₅ în 5 mL H₂O și s-a mai agitat 24 ore. În continuare, amestecul a fost diluat cu apă și extras cu Et₂O (3 mL × 3), urmând prelucrarea obișnuită. Produsul crud (150 mg) a fost cromatografiat pe coloană cu silicagel (7 g), obținându-se 122 mg diol **53** (70%; EP/EtOAc 50%).

Acidul 16a, 17-dihidroxient-kauran-19-oic (53) substanță cristalină, p.t. 261 – 263 °C ([226]: p.t. 264 – 266 °C); $[\alpha]_D^{20} = -58.0^\circ, c \ 0.05, CHCl_3;$ *IR* (v, cm⁻¹): 3431, 2935, 1716, 1649, 1635, 1457, 1241, 1053, 873; ^{*1*}*H-NMR* (400 MHz, δ H): 0.96 (3H, s, Me-20), 1.22 (3H, s, Me-19), 3.62 (1H, d, *J* = 11.2, H_a-17), 3.74 (1H, d, *J* = 11.2, H_b-17); ^{*13*}*C-NMR* (100 MHz, δ C): 15.6 (q, C-20), 18.6 (t, C-11), 19.0 (t, C-2), 22.3 (t, C-6), 26.2 (t, C-12), 28.9 (q, C-18), 37.3 (t, C-14), 37.9 (t, C-3), 39.6 (s, C-10), 40.5 (t, C-1), 41.9 (t, C-7), 43.7 (s, C-4), 44.7 (s, C-8), 45.3 (d, C-13), 52.7 (t, C-15), 56.1 (d, C-9), 57.0 (d, C-5), 66.2 (t, C-17), 81.9 (s, C-16), 183.7 (s, C-19); *GC-MS*: 336, 318, 305, 287, 259, 123, 109, 107; *Calcule analit.* C₂₀H₃₂O₄: C 71.39, H 9.59; găsit: C 71.36, H 9.49.

Acetilarea acidului 160,17-dihidroxi-ent-kauran-19-oic (53)

La soluția formată din 50 mg (0.15 mmol) diol **53** și 1.2 mL piridină anhidră s-au adăugat 0.35 mL (0.37 mmol) anhidridă acetică. Amestecul obținut a fost agitat la temperatura camerei timp de 48 ore (CSS). Apoi amestecul reactant a fost diluat cu 10 ml apă și extras cu eter etilic, urmând prelucrarea obișnuită. Produsul crud (60 mg) a fost supus cromatografiei pe coloană cu silicagel (10 g), obținându-se 53 mg monoacetat **323**. (95%; EP/EtOAc 25%).

Acidul 16α-hidroxi-17acetoxi-ent-kauran-19-oic (**323**) substanță cristalină, p.t. 211 – 213 °C ([226]: p.t. 209 – 210 °C); $[\alpha]_D^{20} = -56.3^\circ, c \ 0.46, CHCl_3;$ $IR (v, cm^{-1})$: 3400-3200, 1725, 1705, 1244, 1241; 1H -NMR (400 MHz, δ H): 0.93 (3H, s, Me-20), 1.21 (3H, s, Me-19), 2.08 (3H, s, Me-OAc), 4.21 (2H, s, H₂-17); ^{13}C -NMR (100 MHz, δ C): 15.49 (q, C-20), 18.36 (t, C-11), 18.92 (t, C-2), 20.89 (q, Me(OAc)),21.98 (t, C-6), 26.11 (t, C-12), 28.87 (q, C-18), 36.98 (t, C-14), 37.68 (t, C-3), 39.60 (s, C-10), 40.47 (t, C-1), 41.71 (t, C-7), 43.63 (s, C-4), 44.72 (s, C-8), 45.75 (d, C-13), 52.74 (t, C-15), 55.58 (d, C-9), 56.71 (d, C-5), 68.43 (t, C-17), 80.12 (s, C-16), 171.34 (s, CO(OAc)), 183.85 (s, C-19); *GC-MS*: 360, 345, 327, 318, 300, 281, 260, 207, 193, 121, 105, 91; *Calcule analit.* C₂₂H₃₄O₅: C 69.81, H 9.05; găsit: C 69.83, H 9.02.

Acetilarea acidului 16a-hidroxi-17-acetoxi-ent-kauran-19-oic (323)

La soluția formată din 30 mg (0.078 mmol) monoacetat **323** și 0.3 mL piridină anhidră sau adăugat 0.2 mL (0.2 mmol) anhidridă acetică și o cantitate catalitică de dimetilaminopiridină. Amestecul obținut a fost agitat la temperatura camerei timp de 24 ore (CSS). Apoi amestecul reactant a fost diluat cu 10 mL apă și extras cu eter etilic, urmând prelucrarea obișnuită. Produsul crud (41 mg) a fost supus cromatografiei pe coloană cu silicagel (10 g), obținându-se 32 mg acid 16 α ,17-diacetoxi-*ent*-kauran-19-oic (**324**) (95%; EP/EtOAc 20%).

Acidul 16α,17-diacetoxient-kauran-19-oic (**324**) substanță cristalină, p.t. 188 – 190 °C ([200]: p.t. 185 – 186 °C); $[\alpha]_D^{20} = -61.2^\circ, c \ 0.5, \text{CHCl}_3([200]: [\alpha]_D^{20} = -60.5^\circ, c \ 1.5, \text{CHCl}_3);$ $IR (v, \text{cm}^{-1}): 1727, 1701, 1470, 1369, 1258;$

¹*H-NMR* (400 MHz, δ H): 0.93 (3H, s, Me-20), 1.23 (3H, s, Me-19), 1.99 (3H, s, Me-OAc), 2.05 (3H, s, Me-OAc), 4.42 (1H, d, *J* = 12.2, H_a-17), 4.93 (1H, d, *J* = 12.2, H_b-17);

¹³C-NMR (100 MHz, δC): 15.46 (q, C-20), 18.54 (t, C-11), 18.98 (t, C-2), 20.78 (q, Me(OAc)), 21.99 (t, C-6), 22.38 (q, Me(OAc)), 25.86 (t, C-12), 28.88 (q, C-18), 37.13 (t, C-14), 37.77 (t, C-3), 39.67 (s, C-10), 40.53 (t, C-1), 41.89 (t, C-7), 43.27 (d, C-13), 43.71 (s, C-4), 44.41 (s, C-8), 51.06 (t, C-15), 55.43 (d, C-9), 56.67 (d, C-5), 63.50 (t, C-17), 90.47 (s, C-16), 170.76 (s, CO(OAc)), 170.82 (s,

CO(OAc)), 183.6 (s, C-19); *GC-MS*: 421, 362, 315, 301, 281, 260, 207, 193, 121, 105, 91; *Calcule analit.* C₂₄H₃₆O₆: C 68.55, H 8.63; găsit: C 68. 52, H 8.66.

Funcționalizarea acidului ent-kaur-16-en-19-oic (4) cu PhI(OAc)₂- LiBr

Soluția formată din acid *ent*-kaur-16-en-19-oic (**4**) (106 mg, 0.35 mmol), 1 eq. PhI(OAc)₂ (113 mg, 0.35 mmol) și acid acetic glacial (5 mL), se agită până la dizolvarea componentelor, iar apoi se adaugă LiBr (20 mmol %). Amestecul de reacția a fost agitat 18 ore la temperatura de 95 °C. La finele reacției culoarea gălbuie a amestecului devine brun-roșietică. Astfel reacția a fost oprită, iar amestecul este răcit și extras cu Et₂O (30 mL \times 3), urmând prelucrarea obișnuită, uscarea pe Na₂SO₄ anh. și distilarea solventului la presiune joasă. Produsul crud (220 mg) a fost supus cromatografie pe coloană cu silicagel (22 g). De pe coloană au fost eluați în gradient (EP/EtOAc) următorii compuși: amestecul de bromuri izomere **325** și **326** (18 mg, 13%), compusul **327** (45 mg, 40%), compusul **328** (4 mg, 2%), compusul **329** (31 mg, 25%).

Amestecul de bromuri **325** și **326** (18 mg) a fost recromatografiat pe coloană cu silicagel (2g), obținându-se compușii individuali: acidul 17-bromo-16*E-ent*-kaur-16-en-19-oic (**325**) (11 mg) și acidul 17-bromo-16*Z-ent*-kaur-16-en-19-oic (**326**) (6 mg).

Acidul 17-bromo-16Eent-kaur-16-en-19-oic (325)

substanță amorfă; $[\alpha]_D^{20} = -21.2^\circ, c \ 0.7, CHCl_3;$ $IR (v, cm^{-1}): 3030, 2937, 1690, 1258, 874, 794, 740, 635;$ 1H -NMR (400 MHz, δ H): 0.94 (3H, s, Me-20), 1.24 (3H, s, Me-18), 3.02 (1H, s, H-13), 5.81 (1H, s, H-17); ^{13}C -NMR (100 MHz, δ C): 15.6 (q, C-20), 18.9 (t, C-11), 19.1 (t, C-2), 21.8 (t, C-6), 28.9 (t, C-12), 29.0 (q, C-18), 37.8 (t, C-3), 39.1 (t, C-14), 39.7 (s, C-10), 40.7 (t, C-1), 41.1 (t, C-7), 43.1 (d, C-13), 43.7 (s, C-4), 45.2 (s, C-8), 49.0 (t, C-15), 55.0 (d, C-9), 56.9 (d, C-5), 94.6 (s, C-17), 151.0 (s, C-16), 183.1 (s, C-19); Calcule analit. C₂₀H₂₉BrO₂: C 62.99, H 7.67; găsit: C 63.00, H 7.66.

Acidul 17-bromo-16Zent-kaur-16-en-19-oic (**326**) substanță amorfă;

 $[\alpha]_D^{20} = -11.2^\circ, c \ 0.4, \text{CHCl}_3;$

IR (v, cm⁻¹): 3040, 2943, 1695, 1258, 874, 794, 733;

¹*H-NMR* (400 MHz, δH): 0.94 (3H, s, Me-20), 1.24 (3H, s, Me-18), 2.76 (1H, s, H-13), 5.87 (1H, s, H-17);

¹³C-NMR (100 MHz, δC): 15.6 (q, C-20), 18.4 (t, C-11), 19.0 (t, C-2), 21.8 (t, C-6), 29.0 (q, C-18), 32.7 (t, C-12), 37.8 (t, C-3), 39.6 (s, C-10), 40.2 (t, C-14), 40.6 (t, C-1), 40.9 (t, C-7), 43.6 (s, C-4), 43.7 (s, C-8), 44.0 (d, C-13), 49.5 (t, C-15), 54.7 (d, C-9), 56.9 (d, C-5), 95.3 (s, C-17), 152.5 (s, C-16), 183.7 (s, C-19);

Calcule analit. C₂₀H₂₉BrO₂: C 62.99, H 7.67; găsit: C 63.01, H 7.65.

Acidul 17-bromo-15αacetoxi-16Z-ent-kaur-16-en-19-oic (**327**) substanță amorfă;

 $[\alpha]_D^{20} = -42.1^\circ, c \ 1.0, \text{CHCl}_3;$

IR (v, cm⁻¹): 3100, 2943, 1725, 1690, 1258, 874, 794, 730;

¹*H*-*NMR* (400 MHz, δH): 0.95 (3H, s, Me-20), 1.23 (3H, s, Me-18), 2.06 (3H, s, Me(OAc)), 3.02 (1H, s, H-13), 5.82 (1H, s, H-17);

¹³C-NMR (100 MHz, δC): 15.7 (q, C-20), 18.9 (t, C-11), 19.0 (t, C-2), 20.7 (t, C-6), 21.2 (q, Me(OAc)), 28.7 (t, C-12), 28.8 (q, C-18), 34.7 (t, C-7), 36.6 (t, C-14), 37.6 (t, C-3), 39.8 (s, C-10), 40.5 (t, C-1), 41.9 (d, C-13), 43.6 (s, C-4), 48.5 (s, C-8), 52.4 (d, C-9), 56.5 (d, C-5), 82.78 (s, C-15), 104.7 (s, C-17), 151.3 (s, C-16), 171.0 (s, CO(OAc)), 183.1 (s, C-19);

Calcule analit. C₂₂H₃₁BrO₄: C 60.14, H 7.11; găsit: C 60.19, H 7.09.

Acidul 15α-acetoxi-entkaur-16-en-19-oic (**328**) substanță cristalină, m.p. 172 – 174 °C ([180]: m.p. 139 – 141 °C); $[\alpha]_D^{20} = -86.0^\circ$, *c* 0.2, CHCl₃ ([228]: $[\alpha]_D^{20} = -84.9^\circ$, *c* 0.15, CHCl₃);

IR (v, cm⁻¹): 3415-2725, 1730, 1690, 1620, 895;

¹*H-NMR* (400 MHz, δH): 0.96 (3H, s, Me-20), 1.23 (3H, s, Me-18), 2.02 (3H, s, Me(OAc)), 3.02 (1H, s, H-13), 5.09 (H, s, H-15), 5.09 (1H, s, H_a-17), 5.25 (1H, s, H_b-17);

¹³*C-NMR* (100 MHz, δC): 15.8 (q, C-20), 18.4 (t, C-11), 19.0 (t, C-

2), 20.8 (t, C-6), 21.2 (q, Me(OAc)), 28.8 (q, C-18), 32.6 (t, C-12), 34.7 (t, C-7), 37.2 (t, C-14), 37.7 (t, C-3), 39.9 (s, C-10), 40.6 (t, C-1), 42.5 (d, C-13), 43.7 (s, C-4), 47.5 (s, C-8), 53.0 (d, C-9), 56.7 (d, C-5), 83.0 (s, C-15), 110.0 (s, C-17), 155.4 (s, C-16), 171.0 (s, CO(OAc)), 183.9 (s, C-19);

Calcule analit. C₂₂H₃₂O₄: C 73.30, H 8.95; găsit: C 73.34, H 8.92.

Acidul 17-bromo-16αacetoxi-ent-kauran-19-oic (**329**) substanță amorfă; $[\alpha]_D^{20} = -73.41^\circ, c 1.0, CHCl_3;$ $IR (v, cm^{-1}): 2943, 1717, 1690, 1258, 874, 794, 720;$ 1H -NMR (400 MHz, δ H): 0.94 (3H, s, Me-20), 1.23 (3H, s, Me-18), 2.05 (3H, s, Me(OAc)), 2.47 (1H, s, H-13), 3.89 (1H, d, J.= 11.2, H_a-17), 4.34 (1H, d, J.= 11.2, H_b-17); ^{13}C -NMR (100 MHz, δ C): 15.4 (q, C-20), 18.6 (t, C-11), 19.0 (t, C-2), 21.8 (t, C-6), 22.2 (q, Me(OAc)), 25.4 (t, C-12), 28.9 (q, C-18), 34.7 (d, C-17), 37.1 (t, C-14), 37.7 (t, C-3), 39.6 (s, C-10), 40.5 (t, C-1), 41.8 (t, C-7), 43.7 (s, C-4), 44.0 (d, C-13), 45.0 (s, C-8), 52.7(s, C-15), 55.4 (d, C-9), 56.6 (d, C-5), 90.0 (s, C-16), 170.9 (s, CO(OAc)), 183.9 (s, C-19);

Calcule analit. C₂₂H₃₃BrO₄: C 59.86, H 7.54; găsit: C 59.81, H 7.53.

Funcționalizarea acidului ent-kaur-16-en-19-oic 4 cu NaIO₄- LiBr

Soluția formată din acid *ent*-kaur-16-en-19-oic (**4**) (163 mg, 0.54 mmol), NaIO₄ (30 mmol %) și acid acetic glacial (5 mL) se agită până la dizolvarea componentelor, iar apoi se adaugă LiBr (20 mmol %) și agitarea continuă 18 ore la temperatura de 95°C. La finele reacției culoarea gălbuie a amestecului devine brun-roșietică. Apoi, amestecul de reacție se răcește și este extras cu Et_2O (30 mL × 3), iar faza organică se spălată cu soluție saturată de tiosulfat de sodiu, apă, soluții saturate de NaHCO₃ și NaCl până la mediu neutru. Urmează uscarea pe Na₂SO₄ anh. și distilarea solventului la presiune redusă. Produsul crud (180 mg) a fost supus cromatografiei pe coloană cu silicagel (18g). De pe coloană au fost eluați în gradient (EP/EtOAc) următorii compuși: amestecul de vinil-bromuri izomere **325** și **326** (23 mg, 10%), compusul **328** (70 mg,32%), compusul **329** (38 mg, 20%), compusul **12** (27 mg, 12%). Compușii **325 – 329** și hidroxi-derivatul **12** sunt descriși mai sus.

3.5. Concluzii la capitolul 3

Cercetările efectuate în cadrul acestui capitol au demonstrat potențialul sintetic al acidului *ent*-kaur-16-en-19-oic (**4**), prin sinteza unui șir de diterpenoide naturale bioactive și a unor compuși sintetici cu potențial sporit de bioactivitate.

- Acidul *ent*-kaur-16-en-19-oic (4) supus izomerizării superacide, la temperatură joasă, a generat următorii compuşi cu schelete regrupate: acidul *ent*-atis-15-en-19-oic (310), acidul *ent*-atis-16-en-19-oic (311), acidul *ent*-atis-16β-hidroxi-19-oic (313), acidul *ent*-atis-16α-hidroxi-19-oic (314), acidul *ent*-kaur-15-en-19-oic (63) şi acidul *ent*-beier-15-en-19-oic (312).
- Acidul *ent*-kaur-16-en-19-oic (4) a fost utilizat la sinteza diterpenoidelor *ent*-kaurenice: acizii 15α-hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oic (12) şi 15-oxo-*ent*-kaur-16-en-19-oic (115) compuşi bioactivi naturali cu activitate anti-cancer, conform datelor bibliografice.
- A fost elaborată o cale de sinteză a unui şir de diterpenoide naturale, prin funcționalizarea oxidativă a acidului *ent*-kaur-16-en-19-oic (4) în centrele C-16 şi C-17. În rezultat s-au obținut acizii diterpenici: 16α,17-dihidroxi-*ent*-kauran-19-oic (53), 16α-hidroxi-17-acetoxi-*ent*-kauran-19-oic (323), 16α,17-diacetoxi-*ent*-kauran-19-oic (324) şi 17-hidroxi-*ent*-kaur-15-en-19-oic (64) compuşi naturali cu activitate anti-HIV, anti-cancer şi anti-Alzheimer, conform datelor literare.
- Funcționalizarea acidului *ent*-kaur-16-en-19-oic (4), în prezența oxidanților iodurați și a bromurei de litiu, a condus la formarea unei serii de acizi diterpenici bromurați noi: 16Zși 16E-17-bromo-*ent*-kaur-16-en-19-oic (325) și (326), 15α-acetoxi-16E-17-bromo-*ent*-kaur-16-en-19-oic (327), 15α-acetoxi-*ent*-kaur-16-en-19-oic (328) și 16α-acetoxi-17bromo-*ent*-kauran-19-oic (329) – compuși cu potențial sporit de activitate biologică.

CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

Prezenta teză de doctorat are în vizor sinteza compuşilor naturali biologic activi cu pondere joasă în sursele naturale, cât și obținerea derivaților sintetici noi cu potențial sporit de bioactivitate, în baza diterpenoidelor *ent*-trachilobanice și *ent*-kaurenice accesibile.

Studiul literaturii de specialitate și rezultatele originale obținute în cadrul prezentei lucrări au permis formularea următoarelor concluzii:

- A fost pentru prima dată propusă o concepție nouă de sinteză a compuşilor naturali metoda *retro*-biomimetică. În baza acestui concept, acizii *ent*-trachiloban-19-oic şi *ent*kaur-16-en-19-oic uşor accesibili din deşeurile de floarea-soarelui au generat diterpenoide *ent*-atisanice şi *ent*-beieranice – compuşi naturali biologic activi.
- A fost elaborată şi optimizată o metodă eficientă şi ecologică de izolare din deşeurile de floarea-soarelui (*Helianthus annuus* L.) a acizilor ent-*trachiloban-19-oic*, ent-*kaur-16-en-19-oic şi 15α-angeloil-*ent-*kaur-16-en-19-oic* – diterpenoide naturale bioactive şi sintoni convenabili în sinteza altor compuşi cu activitate biologică.
- 3. Au fost efectuate un şir de sinteze a unor diterpenoide bioactive, prin funcționalizarea oxidativă a acidului ent-*kaur-16-en-19-oic* la centrele C-15, C-16 şi C-17. În rezultat s-au obținut acizii diterpenici: 15α-hidroxi-ent-kaur-16-en-19-oic şi 15-oxo-ent-kaur-16-en-19-oic, 16α, 17-dihidroxi-ent-kauran-19-oic, 16α-hidroxi-17-acetoxi-ent-kauran-19-oic, 16α, 17-diacetoxi-ent-kauran-19-oic şi acidul 17-hidroxi-ent-kaur-15-en-19-oic compuşi naturali biologic activi.
- 4. Pentru prima dată a fost demonstrată eficiența sistemului diacetatat de iodobenzen bromură de litiu în funcționalizarea acidului ent-*trachiloban-19-oic*. Această reacție decurge cu regrupare de schelet şi a demonstrat o selectivitate înaltă. Compuşii noi obținuți reprezintă acizi polifunctionalizați, cu schelete *ent*-kauranic şi *ent*-atisanic: acidul majoritar 12α-hidroxi-16α-acetoxi-ent-kauran-19-oic şi tribromura minoră, acidul 13α,15α-13,15,17-tribromo-ent-atis-16Z-en-19-oic. Diterpenoidele noi sintetizate prezintă interes, atât din punct de vedere structural, cât şi în calitate de substanțe cu activitate biologică potențială.
- 5. A fost elaborată o cale de funcționalizare a acidului ent-kaur-16-en-19-oic în prezență de diacetatat de iodobenzen/periodat de sodiu şi bromură de litiu, în mediu slab acid. În rezultat, s-a obținut o serie de acizi ent-kauranoici polifuncționalizați noi, cu conținut de

brom: acizii 16Z- şi 16E-17-bromo-ent-kaur-16-en-19-oic, 15α-acetoxi-16E-17-bromoent-kaur-16-en-19-oic, 16α-acetoxi-17-bromo-ent-kauran-19-oic; precum şi diterpenoidele ent-kauranice naturale cunoscute: acizii 15α-acetoxi-ent-kaur-16-en-19oic şi 15α-hidroxi-ent-kaur-16-en-19-oic.

În baza concluziilor prezentate putem recomanda:

- Metoda elaborată de valorificare a deşeurilor de floarea-soarelui (*Helianthus annuus* L.), prin obținerea compuşilor diterpenici valoroşi este de perspectivă atât pentru medicină şi farmaceutică, cât şi în sinteza altor diterpenoide naturale, bioactive şi greu accesibile.
- Izomerizarea acizilor *ent*-kaur-16-en-19-oic şi *ent*-trachiloban-19-oic şi-a demonstrat eficienţa în obţinerea diterpenoidelor *ent*-atisanice şi se recomandă în perspectiva utilizării amestecului de acizi, astfel excluzând etapa costisitoare de separare a acestora. În acelaşi context, metoda de epoxidare se recomandă ca o alternativă în separarea acizilor *ent*-kaur-16-en-19-oic şi *ent*-trachiloban-19-oic.
- Compuşii naturali şi cei sintetici obținuți, cu grad înalt de funcționalizare, se recomandă a fi investigați la activitate biologică.

BIBLIOGRAFIE

- Tudzynski B. et al. The P450-4 gene of *Gibberella fujikuroi* encodes *ent*-kaurene oxidase in the gibberellin biosynthesis pathway. In: Appl. Environ. Microbiol., 2001, 67 (8), p. 3514 – 3522.
- Ghisalberti E. L. The biological activity of naturally occurring kaurane diterpenes. In: Fitoterapia, 1997, 68, p. 303 – 325.
- 3. Fraga M. B. The Trachylobane Diterpenes. In: Phytochem. Anal., 1994, 5, p. 49 56.
- 4. Pita J. C. L. R. et al. *In Vitro* and *in Vivo* Antitumor Effect of Trachylobane-360, a Diterpene from *Xylopia langsdorffiana*. In: Molecules, 2012, 17, p. 9573 9589.
- 5. Block, S. et al. Induction of apoptosis in human promyelocytic leukemia cells by a natural trachylobane diterpene. In: Anticancer Res., 2005, 25, p. 363 371.
- Pyrek J. St. New pentacyclic diterpene, trachyloban-19-oic acid from sunflower. In: Tetrahedron, 1970, 26, p. 5029 – 5032.
- Ungur N. et al. Isolation of *ent*-kaur-16-en-19-oic and *ent*-trachiloban-19-oic acids from the sunflower (*Helianthus annuus* L.) dry waste. In: Chem. J. Mold., 2008, 3, p. 105 108.
- Cane D. E. Sesquiterpene biosynthesis: cyclization mechanisms. In: Elsevier 1999, 2, p. 155 – 200.
- Christianson D.W. Unearthing the roots of the terpenome. In: Curr. Opin. Chem. Biol., 2008, 12, p. 141 150.
- 10. Hanson J. R. Diterpenoids. In: Nat. Prod. Rep., 2007, 24, p. 1332 1341.
- Charlwood B. V., Banthorpe D. V. Methods in Plant Biochemistry. London: Academic Press 1991, 7, p. 263 – 287.
- Hong Y. J., Tantillo D. J. Formation of beyerene, kaurene, trachylobane, and atiserene diterpenes by rearrangements that avoid secondary carbocations. In: J. Am. Chem. Soc., 2010, 132, p. 5375 5386.
- Giles P. M. Revised Section F: Natural products and related compounds. In: Pure Appl. Chem., 1999, 71, 4, p. 587 – 643.
- Garsia P. A. et al. Occurrence, Biological activities and synthesis of kaurane diterpenes and their glycosides. In: Molecules, 2007, 12, p. 455 – 483.
- 15. Kataev V. E. et al. *Ent*-Kaurane diterpenoids and glycosides: Isolation, properties, and chemical transformations. In: Rev. J. of Chem., 2011, 1, p. 93 160.
- Jung H. A. et al. Cholinesterase and BACE1 inhibitory diterpenoids from *Aralia Cordata*. In: Arch. Pharm. Res., 2009, 32, p. 1399 – 1408.
- 17. Yang Y. L. et al. New *ent*-kaurane diterpenoids with anti-platelet aggregation activity from *Annona squamosa*. In: J. Nat. Prod., 2002, *65*, p. 1462 1467.

- Zamilpa A. et al. Antispasmodic and antimicrobial diterpenic acids from *Viguiera* hypargyrea roots. In: Planta Med., 2002, 68, p. 281 – 283.
- 19. Tirapelli C. R. et al. Analysis of the mechanisms underlying the vasorelaxant action of kaurenoic acid in the isolated rat aorta. In: Euro. J. Pharmacol., 2004, 492, p. 233 241.
- Kim S. et al. PTP1B inhibitory activity of kaurane diterpenes isolated from *Siegesbeckia glabrescens*. In: J. Enzyme Inhib. Med. Chem., 2006, 21, p. 379 383.
- 21. Block L. C. et al. Chemical and Pharmacological Examination of Antinociceptive Constituents of *Wedelia Paludosa*. In: J. Ethnopharmacol., 1998, 61, p. 85 89.
- 22. Cheenpracha S. et al. Potential anti-allergic *ent*-kaurene diterpenes from the bark of *Suregada multiflora*. In: Phytochem., 2006, 67, p. 2630 2634.
- Costa-Lotufo L. V. et al. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. In: Toxicon, 2002, 40, p. 1231 1127.
- 24. Cavalcanti B. C. et al. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. In: Food Chem. Toxicol., 2006, 44, p. 388 392.
- Bresciani L. F. V. et al. Comparative Study of Different Parts of *Wedelia paludosa* by Gas Chromatography. In: Nat. Prod. Lett., 2000, 14, p. 247 – 254.
- Bresciani L. F. V. et al. Seasonal Variation of Kaurenoic Acid, a Hypoglycemic Diterpene Present in *Wedelia paludosa* (Acmela brasiliensis) (Asteraceae). In: Z. Naturforsch., C: J. Biosci., 2004, 59C, p. 229 – 232.
- Duan H. et al. Immunosuppressive Diterpenoids from *Tripterygium wilfordii*. In: J. Nat. Prod., 1999, 62, p. 1522 – 1525.
- Duan H. et al. Immunosuppressive terpenoids from extracts of *Tripterygium wilfordii*. In: Tetrahedron, 2001, 57, p. 8413 – 8424.
- Zhang Y. et al. Distinct immunosuppressive effect by *Isodon serra* extracts. In: Int. Immunopharmacol., 2005, 5, p. 1957 – 1965.
- 30. Liu J. J. et al. Ponicidin, an *ent*-kaurane diterpenoid derived from a constituent of the herbal supplement PC-SPES, *Rabdosia rubescens*, induces apoptosis by activation of caspase-3 and mitochondrial events in lung cancer cells *in vitro*. In: Cancer Invest., 2006, 24, p. 136 148.
- 31. Cunha K. M. A. et al. Smooth muscle relaxant effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on rat uterus *in vitro*. In: Phytother. Res., 2003, 17, p. 320 324.
- 32. Ghisalberti E. L., Pennacchio M., Alexander E. Survey of Secondary Plant Metabolites with cardiovascular activity. In: Pharm. Biol., 1998, 36, p. 237 279.
- 33. Ambrosio S. R. et al. Kaurane and pimarane-type diterpenes from the Viguiera species inhibit vascular smooth muscle contractility. In: Life Sci., 2006, 79, p. 925 933.

- Muller S. et al. Studies of *ent*-kaurane diterpenes from *Oyedaea verbesinoides* for their inhibitory activity on vascular smooth muscle contraction. In: Phytochem., 2003, 63, p. 391 396.
- 35. Morris B. D. et al. Isolation of the diterpenoids, *ent*-kauran-16α-ol and *ent*-atisan-16α-ol, from sunflowers, as oviposition stimulants for the banded sunflower moth, *Cochylis hospes*. In: J. Chem. Ecol., 2005, 31, p. 89 102.
- 36. Baddeley G. V. et al. The chemistry of the Euphorbiaceae V. The diterpenes from a *Beyeria* sp. In: Australian J. Chem., 1964, 17, p. 578 586.
- Henrick C. A., Jefferies P. R. The chemistry of the Euphorbiaceae VII. The diterpenes of *Ricinocarpus stylosus* diels. In: Australian J. Chem., 1964, 17, p. 915 – 933.
- 38. Cannon J. R. et al. Isolation of (-)-kaur-16-en-19-oic acid and 15β -hydroxy-(-)-kaur-16-en-19-oic acid from *Phebalium rude* bartl. In: Australian J. Chem., 1966, 19, p. 861 – 867.
- Kaneda N. et al. Paniculosides I-V, diterpenes-glucosides from *Stevia ovata* L. In: Chem. Pharm. Bull., 1978, 26, p. 2266 – 2267.
- 40. Hanson J. R. Diterpenoids of terrestrial origin. In: Nat. Prod. Rep., 2013, 30, p. 1346 1356.
- 41. Zhao Y. et al. Two new *ent*-kaurane diterpenoids from *Isodon henryi*. In: Chin. Chem. Lett., 2008, 19, p. 1096 1098.
- 42. Yang L. B. et al. Symmetric and asymmetric *ent*-kaurane dimers isolated from *Isodon japonicus*. In: Tetrahedron Lett., 2008, 49, 22, p. 3574 1577.
- Zhao Y. et al. Two new 19-oxygenated *ent*-kaurane diterpenoids from *Isodon pharicus*. In:
 Chin. Chem. Lett., 2010, 21, p. 81 84.
- 44. Wang F. et al. New Terpenoids from *Isodon sculponeata*. In: Chem. Pharm. Bull., 2009, 57, p. 525 527.
- 45. Li L.-M. et al. *ent*-Kaurane and cembrane diterpenoids from *Isodon sculponeatus* and their cytotoxicity. In: J. Nat. Prod., 2009, 72, p. 1851 1856.
- 46. He F. et al. Cytotoxic *ent*-kaurane diterpenoids from *Isodon sinuolata*. In: Phytochem., 2009, 70, 12, p. 1462 1466.
- 47. Di X. M. et al. A new *ent*-kaurane diterpenoid from *Isodon japonica*. In: Chin. Chem. Lett., 2010, 21, 2, p. 200 202.
- Liu W. et al. Isolation and identification of a new *ent*-kaurane diterpenoid from the leaves of *Isodon japonica*. In: Nat. Prod. Res., 2013, 27, p. 1388 1392.
- 49. Liu Y. H. et al. A new *ent*-kauranoid from *Isodon lophanthoides* var. *Geradianus*. In: Nat. Prod. Res., 2008, 22, p. 860 864.
- Li L. M. et al. *ent*-Kaurane Diterpenoids from *Isodon nervosus*. In: J. Nat. Prod., 2008, 71, p. 684 688.
- 51. Yan F. L. et al. A new *ent*-kaurane diterpenoid from *Isodon nervosus*. In: J. Chem. Res., 2008, p. 522 524.
- 52. Liu X. et al. Diterpene alkaloids with an *aza-ent*-kaurane skeleton from *Isodon rubescens*. In:
 J. Nat. Prod., 2015, 78, p. 196 201.
- 53. Qu J.-B. et al. *ent*-Kaurane Diterpenoids from the Liverwort *Jungermannia atrobrunnea*. In: J. Nat. Prod., 2008, 71, 8, 1418 1422.
- Hsieh T.-J. et al. Chemical Constituents from *Annona glabra*. In: J. Chin. Chem. Soc., 2004, 51, p. 869 876.
- 55. Nhiem N. X. et al. New *ent*-kauranes from the fruits of *Annona glabra* and their inhibitory nitric oxide production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. In: Bioorg. Med. Chem. Lett., 2015, 25, p. 254 258.
- Zheng H. et al. *ent*-Kaurane diterpenoids from *Isodon pharicus*. In: J. Nat. Prod., 2013, 76, p. 2253 2262.
- 57. Alarif W. M. et al. Selective cytotoxic effects on human breast carcinoma of new methoxylated flavonoids from *Euryops arabicus* grown in Saudi Arabia. In: Eur. J. Med. Chem., 2013, 66, p. 204 210.
- Zhou C.-X. et al. Cytotoxic Diterpenoids from the Stem Bark of *Annona squamosa* L. In: Helv. Chim. Acta, 2013, 96, p. 656 – 662.
- Kuo P.-C. et al. Anti-inflammatory diterpenoids from *Croton tonkinensis*. In: J. Nat. Prod., 2013, 76, p. 230 236.
- Bai R. et al. Two new *ent*-Kaurane diterpenoids from *Pteris semipinnata*. J. Asian Nat. Prod. Res., 2013, 15, p. 1107 – 1111.
- Pang X. et al. New kaurene diterpenoid glycosides from fenugreek seeds. In: Nat. Prod. Res., 2013, 27, p. 1202 – 1207.
- Lopes M. N. et al. A new *ent*-Kaurane diterpene from stems of *Alibertia macrophylla* K. Schum. (Rubiaceae). In: Helv. Chim. Acta, 2007, 90, 9, p. 1781 1785.
- Zhang G. et al. Chemical Constituents of *Aristolochia constricta*: Antispasmodic effects of its constituents in Guinea-Pig ileum and isolation of a diterpeno-lignan hybrid. In: J. Nat. Prod., 2008, 71, p. 1167 1672.
- 64. Pena A. et al. *Ent*-15α-(3-methoxy-3-methyl-butanoyl)-kaur-16-en-19-oic acid a new *ent*-kaurenic acid derivative isolated from *Coespeletia moritziana*. Avanc. Quim., 2008, 3, p. 95 97.
- Chen X. X. et al. Additional *ent*-kaurane diterpenoids from *Rubus corchorifolius* L. In: Helv. Chim. Acta, 2010, 93, p. 84 – 89.

- 66. Saepou S. et al. Anti-HIV-1 diterpenoids from leaves and twigs of *Polyalthia sclerophylla*.
 In: Planta Med., 2010, 76, p. 721 725.
- Xiong J., Ma Y. B., Xu Y. L. Diterpenoids from *Siegesbeckia pubescens*. In: Phytochem., 1992, 31, p. 917 921.
- 68. Wang R., Chen W.-H., Shi Y.-P. *ent*-Kaurane and *ent*-pimarane diterpenoids from *Siegesbeckia pubescens*. In: J. Nat. Prod., 2010, 73, p. 17 21.
- Torres A. et al. Helikaurolides A D with a diterpene-sesquiterpene skeleton from supercritical fluid extracts of *Helianthus annuus* L. var. *arianna*. In: Org. Lett., 2015, 17, p 4730 – 4733.
- Subrahmanyam C., Rao B. V., Ward R., Hursthouse M. B. Diterpenes from the marine mangrove *Bruguiera gymnorhiza*. In: Phytochem., 1999, 51, p. 83 – 90.
- Briggs L. H., Cawley R.W. Diterpenes. Part I. The Identity of Kaurene with Podocarprene. In: J. Chem. Soc., 1948, p. 1888 – 1889.
- Pezzuto J. M. et al. Metabolically activated steviol, the aglycone of stevioside, is mutagenic.
 In: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, 82, p. 2478 2482.
- Hueso-Falcon I. et al. Synthesis and induction of apoptosis signaling pathway of *ent*-kaurane derivatives. In: Bioorg. Med. Chem., 2010, 18, p. 1724 1735.
- 74. Nanayakkara, N. P. D. et al. Characterization and feeding deterrent effects on the aphid, *Schizaphis graminum*, of some derivatives of the sweet compounds, stevioside and rebaudioside A. In: J. Nat. Prod., 1987, 50, p. 434 – 241.
- Zhao Yu. et al. Synthesis and cytotoxicity of some new eriocalyxin B derivatives. In: J. Med. Chem., 2007, 42, p. 494 – 502.
- 76. Mori K., Matsui M., Fujisawa, N. Diterpenoid total synthesis—IX : Lactones of podocarpane and kaurane series. In: Tetrahedron, 1968, 24, 3113 3125.
- 77. Cook I. F., Knox J. R. A synthesis of steviol. In: Tetrahedron Lett., 1970, 11, p. 4091 1493.
- 78. Cook I. F., Knox J. R. The synthesis of 13-hydroxylated *ent*-kaur-16-ene derivatives using an acyloin-like cyclization of keto esters. In: Tetrahedron, 1976, 32, p. 363 367.
- 79. Cook I. F., Knox J. R. Bridged-ring products from the acyloin-like cyclization of diterpenoid keto-esters. In: Tetrahedron, 1976, 32, p. 369 375.
- Lee J. B. Preparation of acyl halides under very mild conditions. In: J. Amer. Chem. Soc., 1966, 88, p. 3440 – 3441.
- Croft K. D. et al. Chemical and microbiological syntheses of intermediates in gibberellin biosynthesis. In: Tetrahedron, 1974, 30, p. 3663 – 3667.
- Vieira H. S. et al. Novel derivatives of kaurenoic acid: Preparation and evaluation of their trypanocidal activity. In: J. Braz. Chem. Soc., 2002, 13, p. 151 157.

- Boaventura M. A. D. et al. Preparation and phytotoxicity of novel kaurane diterpene amides with potential use as herbicides. In: J. Agric. Food Chem., 2008, 56, 9, p. 2985 – 2988.
- Fraga B. M. et al. The microbiological transformation of some *ent*-kaur-6,16-dienes by *Gibberella fujikuroi*. In: Phytochem., 1983, 22, p. 691 694.
- 85. Castellaro S. J. et al. Deuterium labelling of ent-kaur-16-en-19-oic acid at carbon-6 and -7.
 In: Phytochem., 1990, 29, p. 1823 1831.
- Bellino A., Venturella P. Some Transformations of episideridiol in the synthesis of naturally occurring tetracyclic kaurene diterpenes. In: J. Nat. Prod., 1988, 51, p. 1246 1248.
- Cheng Y.X., Zhou W., Wu H. A novel rearrangement of 14-mesyloxy-*ent*-kaurenoids. In: Tetrahedron, 1993, 49, p. 97 – 104.
- Nakano T. et al. Rearrangements of derivatives of methyl 9,11-dihydroxy-(-)-kauran-19-oate to new skeletal diterpenes. In: Nat. Prod. Lett., 1993, 1, p. 257 262.
- Boeck P. et al. A Simple synthesis of kaurenoic esters and other derivatives and evaluation of their antifungal activity. In: J. Braz. Chem. Soc., 2005, 16, p. 1360 – 1366.
- Khaibullin, R.N. et al. *O*-Alkylation of diterpenoid steviol in the system KOH-DMSO. In: Russ. J. Gen. Chem. (Engl. Transl.), 2009, 79, p. 2197 – 2201.
- 91. Lin L. H. et al. Study on the stevioside analogues of steviolbioside, steviol, and isosteviol 19alkyl amide dimers: synthesis and cytotoxic and antibacterial activity. In: Chem. Pharm. Bull., 2004, 52, p. 1117 – 1122.
- 92. Bohlmann F. et al. Diterpenes from *Mikania* species. In: Phytochem., 1981, 20, p. 1899 1902.
- 93. Batista R. et al. New oxidized *ent*-kaurane and *ent*-norkaurane derivatives from kaurenoic acid. In: J. Braz. Chem. Soc., 2007, 18, p. 622 627.
- 94. Mori K. et al. Diterpenoid total synthesis XIX: (±)-Steviol and erythroxydiol A: Rearrangements in bicyclooctane compounds. In: Tetrahedron, 1972, 28, p. 3217 – 3226.
- 95. Terai T. et al. Mutagenicity of steviol and its oxidative derivatives in *Salmonella typhimurium* TM677. In: Chem. Pharm. Bull., 2002, 50, 7, p. 1007 1010.
- 96. Avent A. G. et al. The influence of a 15-hydroxy group on the rearrangement reactions of steviol and its 16,17-epoxide. In: J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 1990, 10, p. 2661 2665.
- 97. Alonso R., Gomis H., Taddei A., Sajo C. Cytostatic and cytotoxic activity of synthetic diterpene derivatives obtained from (-)-kaur-9(11),16-dien-19-oic acid against human Cancer cell lines. In: Lett. Drug Des. Discov., 2005, 2, p. 255 259.
- Aparicio R., Bahsas A., Usubillaga A. Allylic oxidation of *ent*-kaurenic acid, *ent*-kaurenic acid methyl ester and *ent*-kaurenol. In: Avances en Química, 2007, 2, p. 3 8.

- 99. Peixoto A. F. et al. Rhodium catalyzed hydroformylation of kaurane derivatives: A route to new diterpenes with potential bioactivity. In: Appl. Catalysis A, 2008, 340, p. 212 219.
- 100. Peixoto A. F. Development of new transition metal catalysts (port.), Ph.D. Thesis, University of Coimbra, Coimbra, Portugalia, 2010.
- Cavalcanti B. C. et al. Kauren-19-oic acid induces DNA damage followed by apoptosis in human leukemia cells. In: J. Appl. Toxicol., 2009, 29, p. 560 – 568.
- 102. Piaz F. D. et al. 13-Hydroxy-15-oxo-zoapatlin, an *ent*-kaurane diterpene, induces apoptosis in human leukemia cells, affecting thiol-mediated redox regulation. In: Free Rad. Biol. Med., 2007, 43, p. 1409 – 1422.
- Pechwang J. et al. Biotransformation of *ent*-kaur-16-en-19-oic acid by *Psilocybe cubensis*. In:
 Nat. Prod. Res., 2010, 24, p. 905 914
- 104. Rocha A. D. et al. Synthesis of a new allelopathic agent from the biotransformation of *ent*-15α-hydroxy-16-kauren-19-oic acid with *Fusarium proliferatum*. In: Nat. Prod. Res., 2017, 31, 22, p. 2647 2653.
- 105. Hugel G. et al. Diterpenes de *Trachylobium*. I.-Introduction generale. Isolement du kauranol et de huit diterpenes nouveaux. In: Bull. Soc. Chim. France, 1965, p. 2882 2887.
- 106. Hugel G. et al. Diterpenes de *Trachylobium*. II.-Structure des diterpenes tetra- et pentacycliques de *Trachylobium*. Bull. Soc. Chim. France, 1965, p. 2888 2894.
- Block S. et al. Diterpenes from the leaves of *Croton zambesicus*. In: Phytochem., 2004, 65, p. 1165 1171.
- 108. Drager G. et al. Tonantzitlolone and other Diterpenes from *Stillingia sanguinolenta*. In: Eur. J. Org. Chem., 2007, 30, p. 5020 5026.
- Tavares J. F. et al. *ent*-Trachylobane diterpenoids from *Xylopia langsdorffiana*. In: J. Nat. Prod., 2006, 69, p. 960 – 962.
- Bohlmann F. et al. Germacranolides and diterpenes from *Viguiera* species. Phytochem., 1981, 20, p. 113 116.
- 111. Fraga B. M. et al. Chemotaxonomic study of nine Canarian *Sideritis* species. In: Phytochem., 2009, 70, p. 1038 1048.
- Olivier D. K., Van Wyk B.-E. The major diterpenoids of the genus *Arctopus* (Apiaceae) with notes on their chemotaxonomic and medicinal significance. In: South Afr. J. Bot., 2013, 85, p. 94 98.
- 113. Graikou K. et al. New diterpenes from *Croton insularis*. In: J. Nat. Prod., 2004, 67, p. 685 688.
- Li C. et al. A hexacyclic ent-trachylobane diterpenoid possessing an oxetane ring from *Mitrephora glabra*. In: Org. Lett., 2005, 7, p. 5709 – 5712.

- 115. Martinsen A. et al. Vascular activity of a natural diterpene isolated from *Croton zambesicus* and of a structurally similar synthetic trachylobane. In: Vascul. Pharmacol., 2009, 29, p. 63 69.
- Pan L. et al. Skeleton-rearranged pentacyclic diterpenoids possessing a cyclobutane ring from *Euphorbia wallichii*. In: Org. Lett., 2006, 8, p. 2775 – 2778.
- Diaz-Viciedo R. et al. Modulation of inflammatory responses by diterpene acids from *Helianthus annuus* L. In: Biochem. Biophys. Res. Com., 2008, 369, p. 761 – 766.
- 118. Picman A. K., Schneider E. F., Gershenzon J. Antifungal activities of sunflower terpenoids. In: Biochem. Syst. Ecol., 1990, 18, p. 325 – 328.
- Bohlmann F. et al. Heliangolide, trachyloban- und villanovan- derivative aus *Viguiera* arten.
 In: Liebigs Ann. Chem., 1984, p. 495 502
- Aguilar M. I., Delgado G., Bye R., Linares E. Bisabolenes, polycyclic diterpenoids and other constituents from the roots of *Lostephane heterophylla*. In: Phytochem., 1993, 33, p. 1161 1163.
- 121. Gonzalez A. G. et al. New diterpenes from *Sideritis canariensis*. In: Phytochem., 1973, 12, p. 1113 1116.
- 122. Fraga B. M. et al. Diterpenes from *Sideritis canariensis*. In: Phytochem., 1991, 30, p. 3361 3364.
- Briggs L. H., White G. W. Constituents of the essential oil of *Araucaria araucana*. In: Tetrahedron, 1975, 31, p. 1311 – 1314.
- 124. Hasan C. M., Healey T. M., Waterman P. G. 7β -Acetoxytrachyloban-18-oic acid from *Xylopia quintasii*. In: Phytochem., 1982, 21, p. 177 179.
- Moraes M. P. L., Roque N. F. Diterpenes from the fruits of *Xylopia aromatica*. In: Phytochem., 1988, 27, p. 3205 – 3208.
- Harrigan G. G. et al. Kaurane and trachylobane diterpenes from *Xylopia aethiopica*. In: Phytochem., 1994, 36, p. 109 – 113.
- Diderot N. T. et al. Prolyl endopeptidase and thrombin inhibitory diterpenoids from the bark of *Xylopia aethiopica*. In: Biosci. Biotech. Biochem., 2005, 69, p. 1763 – 1766.
- 128. Santos R. F. et al. *Ent-7α*-acetoxytrachyloban-18-oic acid and *ent-7α*-hydroxytrachyloban-18-oic acid from *Xylopia langsdorfiana* A. St-Hil. & Tul. modulate K⁺ and Ca²⁺ channels to reduce cytosolic calcium concentration on guinea pig ileum. In: Eur. J. Pharmacol., 2012, 678, p. 39 – 47.
- Pita J. C. et al. Matrix effect and optimization of LC-MSn determination of trachylobane-360 in mice blood. In: J. Pharm. Biomed. Anal., 2014, 100, p. 262 270.

- 130. Block S. et al. *ent*-Trachyloban- 3β -ol, a new cytotoxic diterpene from *Croton zambesicus*. In: Planta Med., 2002, 68, p. 647 649.
- Uchôa P. K. S. et al. Trachylobane and kaurane diterpenes from *Croton flribundus* spreng. In: Quim. Nova, 2013, 36, p. 778 – 782.
- Li. C. et al. A hexacyclic *ent*-trachylobane diterpenoid possessing an oxetane ring from *Mitrephora glabra*. In: Org.Lett., 2005, 7, p. 5709 – 5712.
- 133. Juma B. F. et al. Three *ent*-trachylobane diterpenes from the leaf exudates of *Psiadia punctulata*. In: Phytochem., 2006, 67, p. 1322 1325.
- 134. Harrison L. J., Asakawa Y. 3α, 18-Dihydroxytrachyloban-19-oic acid from the liverwort *Jungermannia exsertifolia* subsp. *cordifolia*. In: Phytochem., 1989, 28, p. 1533 – 1534.
- 135. Scher J.M. et al. Structure and Anti-TB Activity of Trachylobanes from the Liverwort *Jungermannia exsertifolia* ssp. *cordifolia*. In: J. Nat. Prod., 2010, 73, p. 656 – 663.
- Leong Z.-W., Harrison L. J. *Ent*-trachylobane diterpenoids from the liverwort *Mastigophora diclados*. In: Phytochem., 1997, 45, p. 1457 1459.
- Bohlmann F. et al. Helifulvanolsaure Ein neues diterpen mit anomalem kohlenstoffgerust aus *Heylchrysum fulvurn*. In: Phytochem., 1979, 18, p. 1359 – 1362.
- Bohlmann F. et al. Weitere diterpene mit helifulvan-gerust und andere inhaltsstoffe aus *Helychrysurn chionosphaerum*. In: Phytochem., 1980, 19, p. 869 – 871.
- Arnone A., Mondelli R., Pyrek J. St. ¹³C NMR studies of trachylobane diterpenes: complete carbon assignment. In: Org. Magn. Reson., 1979, 12, p. 429 431.
- Hugel G. et al. Diterpenes de *Trachylobium*. III.-Reactions des derives trachylobaniques. In:
 Bull. Soc. Chim. France, 1965, p. 2894 2902.
- 141. Appleton R. A. et al. The acid-catalysed rearrangement of diterpene hydrocarbons. Part I. Kaurene, isoatisirene, stachene and trachylobane. In: J. Chem. Soc., 1966, C, p. 2319 2322.
- McChesney J. D., Clark A. M., Silveira E. R. Antimicrobial diterpenes of *Croton* sonderianus, 1. Hardwickic and 3,4-secotrachylobanoic acids. In: J. Nat. Prod., 1991, 54, p. 1625 – 1633.
- Herz W., Mirrington R. N., Young H. Synthesis of *ent*-methyl trachylobanate from levopimaric acid. In: Tetrahedron Lett., 1968, p. 405 – 407.
- 144. Herz W. et al. The synthesis of methyl 13,16-cycloatisan-18-oate (methyl antitrachylobanate). In: J. Org. Chem., 1968, 33, p. 4210 4219.
- 145. Coates R. M., Bertram E. Biogenetic-like rearrangements of isosteviol derivatives a partial synthesis of trachylobane. In: Tetrahedron Lett., 1968, 49, p. 5145 – 5148.
- 146. Toyota M. et al. Total syntheses of (-)-methyl atis-16-en-19-oate, (-)-methyl kaur-16-en-19-oate, and (-)-methyl trachyloban-19-oate by a combination of palladium-catalyzed

cycloalkenylation and homoallyl-homoallyl radical rearrangement. In: J. Org. Chem., 2000, 65, p. 4565 – 4570.

- 147. Abad A. et al. A unified synthetic approach to trachylobane-, beyerane-, atisane- and kaurane-type diterpenes. In: Tetrahedron, 2006, 62, p. 3266 3283.
- 148. Arraez J. D. et al. Partial synthesis of a trachylobagibberellin analogue. In: J. Chem. Soc., Perkin Trans. I, 1985, p. 207 – 211.
- 149. Fraga B. M. et al. Partial synthesis of 4-*epi*-trachylobagibberellin A₁₂. In: J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 1988, p. 1513 – 1516.
- 150. Bearder J. R. et al. Conversion of trachylobanic acid into novel pentacyclic analogues of gibberellins by *Gibberella fujikuroi*, mutant B1-41a. In: J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1979, p. 649 650.
- 151. Beale M. H. et al. Diterpene acids from *Helianthus* species and their microbiological conversion by *Gibberella fujikuroi* mutant 61-41a. In: Phytochem., 1983, 22, p. 875 881.
- 152. Gonzalez A. G. et al. Trachinol and trachinodiol, two new diterpenes from *Sideritis canariensis* Ait. In: Tetrahedron Lett., 1971, p, 3097 3100.
- Fraga B. M. Phytochemistry and chemotaxonomy of *Sideritis* species from the Mediterranean region. In: Phytochem., 2012, 76, p. 7 24.
- Baccelli C. et al. Vasorelaxant activity of diterpenes from *Croton zambesicus* and synthetic trachylobanes and their structure activity relationships. In: J. Nat. Prod., 2007, 70, p. 910 917.
- 155. Roy A. et al. 16-Aza-*ent*-beyerane and 16-aza-*ent*-trachylobane: Potent mechanism based inhibitors of recombinant *ent*-kaurene synthase from *Arabidopsis thaliana*. In: J. Am. Chem. Soc., 2007, 129, p. 12453 12460.
- 156. Ponce-Monter H. et al. Effect of xanthorrhizol, xanthorrhizol glycoside and trachylobanoic acid isolated from *Cachani* complex plants upon the contractile activity of uterine smooth muscle. In: Phytother. Res., 1999, 13, p. 202 205.
- 157. Ngamrojnavanich N. et al. Diterpenoids from the stem barks of *Croton robustus*. In: Arch. Pharm. Res., 2003, 26, p. 898 901.
- Takahashi J. A. et al. Antibacterial activity of eight Brazilian Annonaceae plants. In: Nat.
 Prod. Res., 2006, 20, p. 21 26.
- 159. Hernandez-Terrones M. G. et al. Inhibition of photosystem II in spinach chloroplasts by trachyloban-19-oic acid. In: Pestic. Biochem. Physiol., 2003, 77, p. 12 – 17.
- Saini S., Sharma S. *Helianthus Annuus* (Asteracea): A Review. In: Int. J. Pharma Professional's Res., 2011, 2, p. 465 – 470.

- 161. Marsni Z. E. et al. Isolation of bioactive compounds from sunflower leaves extracted with supercritical carbon dioxide. In: J. Agric. Food Chem., 2015, 63, p. 6410 6421.
- Diaz-Viciedo R. Farmacología de terpenoides de *Helianthus annuus* L. In: An. R. Acad. Nac. Farm., 2007, 73, p. 725 – 746.
- 163. Mitscher L. A. et al. Isolation and identification of trachyloban-19-oic and (-)-kaur-16-en-19-oic acids as antimicrobial agents from the prairie sunflower, *Helianthus annuus*. In: J. Nat. Prod., 1983, 46, p. 745 746.
- 164. Zi T., Zi J., Zi H. Modified and convenient preparation of silica impregnated with silver nitrate and its application to the separation of steroids and triterpenes. In: J. Chromatography, 1995, 715, p. 372 – 375.
- 165. Morarescu O. et al. Study on extraction process of sunflower (*Helianthus Annuus* L.) dry wastes using different solvents. In: Chem. J. Mold., 2013, 8, p. 90 93.
- Han L. et al. New Diterpenoids from the Marine Mangrove *Bruguiera gymnorrhiza*. In: J. Nat. Prod., 2004, 67, p. 1620 1623.
- Giang P. M. et al. Cytotoxic diterpenoids from vietnamese medicinal plant *Croton* tonkinensis GAGNEP. In: Chem. Pharm. Bull., 2005, 53, p. 296 – 300.
- 168. Nagashima F. et al. Novel cytotoxic kaurane-type diterpenoids from the New Zealand Liverwort Jungermannia species. In: Tetrahedron, 2005, 61, p. 4531 – 4544.
- Abad A. et al. Diastereoselective synthesis of antiquorin and related polyoxygenated atisenetype diterpenes. In: Tetrahedron, 2007, 63, p. 1664 – 1679.
- 170. Coates R. M., Bertram E. F. Structural modifications of isosteviol. Partial synthesis of atiserene and isoatiserene. In: J. Org. Chem., 1971, 36, 2625 1631.
- 171. Wenkert E. Structural and biogenetic relationships in the diterpene series. In: Chem. Ind., London, 1955, p. 282 – 284.
- 172. Ungur N., Barba A.N., Vlad P. F. Molecular rearrangements of tetra- and pentacyclic diterpenoids formed with the participation of pimarane intermediates. In: Russ. Chem. Nat. Comp. (Engl. Transl.), 1991, 27, p. 1 12.
- 173. Olah G. A. et al. Superacid Chemistry, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2009, p. 867.
- 174. Chetraru O. et al. Superacidic rearrangement of *ent*-kaur-16(17)-en-19-oic and *ent*-trachiloban-19-oic acids. In: The XXXI-st Romanian Chemistry Conference. Organic Chemistry. Râmnicu Vâlcea, România, 2010, October 6 8, p. 8.
- 175. Chetraru O. et al. Biomimetic synthesis of atisanic diterpenoids from *ent*-trachiloban 19-oic acid. In: Simpozion Național PRIOCHEM ediția a VII-a. București, România, 2011, 27 28 octombrie (<u>http://www.icechim.ro/priochem/editia14/volumrezumate2011.pdf</u>).

- 176. Chetraru O. Studiul reacției de izomerizare superacidă a acizilor *ent*-kaur-16(17)-en-19-oic și *ent*-trachiloban-19-oic. In: International Conference of Young Researchers, VIIIth edition, Chișinău, Moldova, 2010, November 11, p. 72.
- 177. Ungur N. et al. Synthesis of natural atisane-type diterpenoids by *retro*-biomimetic transformations. In: Helv. Chim. Acta, 2013, 96, p. 864 871.
- 178. Coates R. M., Bertram E. F. Biogenetic-like rearrangements of isosteviol derivatives: π -route to the atiserene system. In: J. Chem. Soc. D, Chem. Com., 1969, 7, p. 97 798.
- Grande M., Mancheno B., Sanchez M. J. Elasclepial and other tetracyclic diterpenoids from *Elaeoselinum asclepium*. In: Phytochem., 1991, 30, 1977 – 1982.
- 180. Toyota M. et al. Total synthesis of (±)-methyl atis-16-en-19-oate via homoallyl homoallyl radical rearrangement. In: J. Am. Chem. Soc., 1998, 120, p. 916 4925.
- 181. Miles D. H. et al. Cotton boll weevil antifeedant activity and antifungal activity (*Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum*) of extracts of the stems of *Wedelia biflora*. In: J. Agric. Food Chem., 1990, 38, p. 1591 1594
- Ding Y.-L., Jia Z.-J. Tetracyclic diterpenols from *Euphorbia sieboldiana*. In: Phytochem., 1991, 30, p. 2413 2415.
- Terauchi T. et al. Synthesis and pharmacological profile of serofendic acids A and B. In: Bioorg. Med. Chem., 2007, 15, p. 7098 – 7107.
- 184. McAlees A. J. et al. Ring C functionalised diterpenoids. Part VII. Formolysis of (16S)-*ent*- 12α -*p*-tolylsulphonyloxykauran. In: J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 1976, p. 1042 1048.
- 185. Inden M. et al. Serofendic acid prevents 6-hydroxydopamine-induced nigral neurodegeneration and drug-induced rotational asymmetry in hemi-parkinsonian rats. In: J. Neurochem., 2005, 95, p. 950 – 961.
- 186. Osakada F. et al. Serofendic acid, a sulfur-containing diterpenoid derived from fetal calf serum, attenuates reactive oxygen species-induced oxidative stress in cultured striatal neurons. In: Pharmacol. Exp. Ther., 2004, 311, p. 51 – 59.
- 187. Mahringer A. et al. Inhibition of P-glycoprotein at the blood–brain barrier by phytochemicals derived from traditional Chinese medicine. In: Cancer Genom. Prot., 2010, 7, p. 191 – 206.
- Emmanuvel L., et al. NaIO₄/LiBr-mediated diastereoselective dihydroxylation of olefins: A Catalytic approach to the Prevost–Woodward reaction. In: Org. Lett., 2005, 7, p. 5071 – 5074.
- 189. Morarescu O. et al. IBDA / LiBr mediated functionalization of *ent*-trachiloban-19-oic acid. In: International Conference dedicated to the 55th anniversary from the foundation of the Institute of Chemistry of the Academy of Science of Moldova, Chişinău, Moldova, 2014, May 28 – 30, p. 209.

- Huang S. X. et al. Alboatisins A–C, *ent*-atisene diterpenoids from *Isodon albopilosus*. In: J Nat Prod., 2007, 70, p. 1053 – 1055.
- 191. Rios M. Y., Leon I. Chemical constituents and cytotoxic activity of *Smallanthus maculatus*. In: Chem. Nat. Compd., 2006, 42, p. 497 – 498.
- 192. Safer S. et al. Metabolic fingerprinting of *Leontopodium* species (Asteraceae) by means of ¹H
 NMR and HPLC–ESI-MS. In: Phytochem., 2011, 72, p. 1379 1389.
- 193. Batista R., Chiari E., Oliveira A. B. Trypanosomicidal Kaurane Diterpenes from Wedelia paludosa. In: Planta Med., 1999, 65, p. 83 284.
- 194. Alves T. M. A. et al. A diterpene from *Mikania obtusata* active on *Trypanosoma cruzi*. In: Planta Med, 1995, 61, 85 87.
- 195. Oliveira B. H., Santana A. E., Bastos D. Z. L. Determination of the diterpenoid, kaurenoic acid, in *Annona glabra* by HPLC. In: Phytochem. Anal., 2002, 13, p. 368 371.
- 196. Melo A. C., Cota B. B., Oliveira A. B., Braga F. C. HPLC quantitation of kaurane diterpenes in *Xylopia* species. In: Fitoterapia, 2001, 72, p. 40 – 45.
- 197. Na M. K. et al. Inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B by diterpenoids isolated from Acanthopanax koreanum. In:Bioorg. Med. Chem. Lett., 2006, 16, p. 3061 – 3064.
- Fatope M. O. et al. Bioactive *ent*-kaurene diterpenoids from *Annona senegalensis*. In: J. Nat. Prod., 1996, 59, p. 301 – 303.
- Suo M. R. et al. Diterpenes from *Helianthus annuus* and their cytotoxicity in vitro. In: Acta Pharm. Sinica, 2007, 42, p. 166 – 170.
- 200. Morarescu O. Synthetic transformations of *ent*-kaurenoic acid. In: Chem. J. Mold., 2015, 10, p. 9 19.
- Chetraru O. et al. A *retro*-biomimetic one-step synthesis of natural atisanic and beyeranic diterpenoids. In: Chem. J. Mold., 2010, 5, p. 121 123.
- 202. Grinco M. et al. C15 functionalized derivatives of *ent*-kaur-16-en-19-oic acid: isolation from the sunflower *Helianthus annuus L*. and synthesis. In: Chem. J. Mold., 2010, 5, p. 106 108.
- 203. Ohno N., Mabry T. J. Sesquiterpene lactones and diterpene carboxylic acids in *Helianthus niveus* subspecies *canescens*. In: Phytochem., 1980, 19, p. 609 614.
- 204. Gao F., Wang H., Mabry T. J. Diterpenoids and a sesquiterpene lactone from *Viguiera ladibractate*. In: Phytochem., 1987, 26, p. 779 781.
- 205. Gao F. et al. Terpenoids from Viguera potosina. In: J. Nat. Prod., 1985, 48, p. 489 490.
- 206. Mullin C. A. et al. Feeding and toxic effects of floral sesquiterpene lactones, diterpenes, and phenolics from sunflower (*Helianthus annuus* L.) on western corn rootworm. J. Agric. Food Chem., 1991, 39, p. 2293 2299.

- 207. Velikova M. et al. Antibacterial *ent*-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees.
 In: Fitoterapia, 2000, 71, p. 693 696.
- 208. Morris B. D. et al. Isolation of three diterpenoid acids from sunflowers, as oviposition stimulants for the banded sunflower moth, *Cochylis hospes*. In: J. Chem. Ecol., 2009, 35, p. 50 57.
- Collins J. C., Hess W. W. Aldehydes from primary alcohols by oxidation with Chromium Trioxide: Heptanal. In: Org. Synth. Coll., 1988, 6, p. 644 – 648.
- Murakami T. et al. Chemische und chemotaxonomische untersuchungen von filices. XXXIII. Chemische untersuchungen der inhaltsstoffe von *Pteris longipes* DON. In: Chem. Pharm. Bull., 1981, 29, p. 657 – 652.
- 211. Ruiza Y. et al. Cytotoxic and apoptosis-inducing effect of *ent*-15-oxo-kaur-16-en-19-oic acid, a derivative of grandiflorolic acid from *Espeletia schultzii*. In: Phytochem., 2008, 69, p. 432 438.
- 212. Choumessi A. T. et al. Characterization of the antiproliferative activity of *Xylopia aethiopica*.In: Cell Division, 2012, 7, p. 1 8.
- 213. Grinco M., et al. Synthesis of 16,17-dihydroxy-*ent*-kauran-19-oic acid. In: International Symposium on Advanced Science in Organic Chemistry, Miskhor, Crimea, 2010, June 21 25, p. 55 (Russ).
- 214. **Chetraru O**. *Ent*-kaurenic acid metabolitis obtaining. In: International Conference of Young Researchers, Chişinău, Moldova, 2012, November 23, p.72 (Ro).
- Rosselli S. et al. Cytotoxic activity of diterpenoids isolated from the aerial parts of *Elaeoselinum asclepium* subsp. *meoides*. In: Planta Med., 2008, 74, p. 1285 1287
- Piacente S. et al. Constituents of *Werneria ciliolata* and their *in vitro* anti-hiv activity. In: Phytochem., 1994, 36, p. 991 996.
- Pérez A. L. C., Olga L. M., de Vivar A. R. Sesquiterpenoids and diterpenoids from *Tithonia longiradiata*. In: Phytochem., 1992, 31, p. 4227 – 4231.
- 218. Bohlman F. et al. Diterpenes from *Baccharis* species. In: Phytochem., 1982, 21, p. 399 403.
- 219. Yahara S. et al. Minor diterpenes of *Aralia cordata* Thunb: 17-hydroxy-*ent*-kaur-15-en-19oic acid and grandifloric acid. In: Chem. Pharm. Bull., 1974, 22, p. 1629 – 1631.
- 220. Minato M. et al. Osmium tetraoxide catalyzed vicinal hydroxylation of higher olefins by using hexacyanoferrate(III) ion as a cooxidant. In:J. Org. Chem., 1990, 55, p. 766 768.
- 221. Herz W., Kulanthaivel P. Watanabe K. *Ent*-kauranes and other constituents of three *Helianthus* species. In: Phytochem., 1983, 22, p. 2021 2025.
- Herz W., Kulanthaivel P. *Ent*-kauranes and 10α-methyl-eudesman-8αh,12-olides from Wedelia calycina and Wedelia hispida. In: Phytochem., 1984, 23, p. 2271-2275.

- 223. Takahashi J. A. et al. Frutoic acid, a dimeric kaurane diterpene from *Xylopia frutescens*. In: Phytochem., 1995, 40, p. 607 609.
- Chang F.-R. et al. Bioactive kaurane diterpenoids from *Annona glabra*. In: J. Nat. Prod., 1998, 61, p. 437 439.
- Joy B., Remani P. Antitumor constituents from *Annona squamosa* fruit pericarp. In: Med. Chem. Res., 2008, 17, p. 345 – 355.
- 226. Lee M. et al. *ent*-Kaurane and *ent*-pimarane diterpenes from *Siegesbeckia pubescens* inhibit lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in BV2 Microglia. In: Biol. Pharm. Bull., 2014, 37, p. 152 157.
- Qin J. J. et al. A new *ent*-kaurane type diterpenoid glycoside from *Inula japonica* Thunb. In:
 Arch. Pharm. Res., 2009, 32, p. 1369 1372.
- 228. **Morarescu O**. et al. Obtaining of polyfunctional compounds from the *ent*-kaur-16-en-19-oic acid using the prevost woodward reaction approach. In: International Conference dedicated to the 55th anniversary from the foundation of the Institute of Chemistry of the ASM, Chişnău, Moldova, 2014, May 28 30, p. 210.
- 229. Brieskorn C. H., Poehlmann E. Kauradien-(9(11).16)-säure-(19) und 15α-Acetoxy-kauren-(16)-säure-(19). In: Chem. Ber., 1969, 102, p. 2621 2628.
- Morarescu O. et al. NaIO₄/LiBr-supported functionalization of *ent*-kaur-16-en-19-oic acid.
 In: XVIII-th International Conference "Physical Methods in Coordination and Supramolecular Chemistry", Chişinău, Moldova, 2015, October 8 9, p. 108.
- Ohno N. et al. Tetrachyrin, a new rearranged kaurenoid lactone, and diterpene acids from *Tetrachyron orizabaensis* and *Helianthus debilis*. In: Phytochem., 1979, 18, p. 1687 1689.

DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII

Subsemnata, declar pe răspundere personală că materialele prezentate în teza de doctorat sunt rezultatul propriilor cercetări și realizări științifice. Conștientizez că, în caz contrar, urmează să suport consecințele în conformitate cu legislația în vigoare.

Numele și prenumele: MORARESCU Olga

Semnătura:

Data: 04.03.2019

CURRICULUM VITAE

Numele și prenumele: MORARESCU Olga

Data nașterii: 27 aprilie 1985

Adresă, telefoane de contact, e-mail: mun. Chișinău

str. Academiei, 3, Institutul de Chimie, bir. 310. olea_chetraru@yahoo.com +373 69350526

Educație și formare:

2009 - 2014 - Universitatea de Stat "Dimitrie Cantemir", PhD

2008 - 2009 - Universitatea Academiei de Științe a Moldovei, master in chimie

2003 - 2008 - Universitatea de Stat din Moldova, Facultatea de Chimie – licențiată în chimie

1992 - 2003 - Școala medie din s. Colicăuți, r. Briceni, RM.

Experiența științifică și profesională:

2016 – prezent	Cercetător științific în cadrul laboratorului Chimia Compușilor Naturali și Biologic Activi, Institutul de Chimie al AȘM
2008 - 2016	Cercetător științific stagiar în cadrul laboratorului Chimia Compușilor Naturali și Biologic Activi, Institutul de Chimie al AŞM
2008 - 2009	Profesor de chimie Liceul teoretic "N. Iorga" Chișinău (Moldova)
Domeniile de activ	vitate stiintifică:

Sinteză organică fină, chimie bioorganică, chimia compușilor naturali și fiziologic activi, metode fizico-chimice de analiză.

Participarea la proiecte de cercetare-dezvoltare, inovare și transfer tehnologic:

- Proiect instituțional aplicativ: 11.817.08.23A. Obținerea și studiul compușilor organici, inclusiv a celor naturali din materie primă locală, utili pentru medicină și industrie, 2011-2014 (executor);
- Proiect pentru tineri cercetători: 12.819.08.05F. Noi căi de sinteza a compușilor terpenici polifuncționalizați cu potențialp activitate biologicp, 2012-2013 (executor).
- Proiect instituțional aplicativ: 15.817.02.14A. "Elaborarea metodelor de obținere a terpenoidelor valoroase prin valorificarea resurselor renovabile din Republica Moldova, 2015-2018 (executor);
- Proiect bilateral Moldova Bielorusia: *13.820.18.03/BF. Elaborarea metodelor regio- și stereoselective de oxigenare a izoprenoidelor naturale o modalitate de a obține noi tipuri de substanțe fiziologic active,* 2013-2014 (executor);
- Proiect SCOPES: IZ73Z0_152346/1. Modificarea compuşilor naturali mediată de radicali liberi, 2016-2017(executor).
- Proiect bilateral de cercetare pentru mobilitate Academia de Științe a Moldovei (AȘM) Consiliul Național pentru Cercetare din Italia (CNCI): *5.820.16.02.02/It. Sinteza*

terpenoidelor guanidinice cu activitate biologică relevantă și potențial terapeutic, 2015-2016 (executor); 18.800.16.02.02/It. "Sinteza terpenoidelor guanidinice cu activitate biologică relevantă și potențial terapeutic" (2018-2019), Institutul de Chimie (executor).

Participări la foruri științifice naționale și internaționale:

- -- The XXXIII^{-rd} Romanian Chemistry Conference, Călimănești-Căciulata, Vâlcea, România, 1 3 October **2010**;
- International Conference of Young Researchers, VIIIth edition, Chişinău Moldova, 11 November 2010;
- Simpozion Național PRIOCHEM ediția a VII-a. București, România, 27 28 octombrie 2011;
- International Conference of Young Researchers, Xth edition, Chişinău, Moldova, 23 November **2012**;

The International Conference dedicated to the 55th anniversary from the foundation of the Institute of Chemistry of the Academy of Sciences of Moldova, Chişinău, Moldova, 28-30 May **2014**;

- The XVIIth International Conference "*Physical Methods in Coordination and Supramolecular Chemistry*", Chisinău, Moldova, 8 9 October **2015**;
- The 12th National Symposium with International Participation "*MEDICINAL PLANTS PRESENT AND PERSPECTIVES*", Piatra Neamţ, Romania, 06 09 September **2016**;
- SWISS SUMMER SCHOOL 2017 "*TRENDS IN ORGANIC SYNTHESIS*", Villars-sur-Ollon, Switzerland, 27 31 August **2017**;
- International Symposium on Bioorganic Chemistry & Konstanz Symposium Chemical Biology, Konstanz, Germany, 26 30 September **2017**;

Date statistice privind numărul total de lucrări științifice și metodico-didactice publicate:

16 lucrări științifice, dintre care 3 publicații de un singur autor, 6 articole în reviste recenzate, 10 teze la forurile științifice.

Competențe și aptitudini organizatorice

- Organizarea meselor rotunde în cadrul proiectelor bilaterale;
- Participarea la pregătirea şi desfăşurarea celei de a XVIII-a conferințe internaționale "Physical Methods in Coordination and Supramolecular Chemistry", 2015, 8-9 October 2015, Moldova, Chişinău;
- Participarea la pregătirea și desfășurarea Conferinței Internaționale Dedicate celei de a 55-a aniversări a Institutului de Chimie al AȘM, 2014, 28 30 mai.

04.03.2019

MORARESCU Olga