



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**BÚSQUEDA DE SUBSTANCIAS ANTI-INFLAMATORIAS Y CITOTÓXICAS
A PARTIR DE ESPECIES DE EUPHORBIACEAE. PREPARACIÓN
Y BIOEVALUACIÓN DE ANÁLOGOS SEMISINTÉTICOS**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. FERNANDO AUGUSTO NOVILLO LOGROÑO

DR. E. GUILLERMO DELGADO LAMAS
INSTITUTO DE QUÍMICA

CIUDAD DE MÉXICO, MARZO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO

Presidente:	Dr. Leovigildo Quijano
Vocal:	Dr. Carlos Martín Cerda García-Rojas
Vocal:	Dr. Ricardo Reyes Chilpa
Vocal:	Dra. María Isabel Aguilar Laurents
Secretario:	Dr. René Miranda Ruvalcaba

Esta tesis fue realizada en el laboratorio 1, edificio C, del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. E. Guillermo Delgado Lamas.

Sustentante:

M. en C. Fernando Augusto Novillo Logroño

Tutor:

Dr. E. Guillermo Delgado Lamas

CONGRESO Y ACTIVIDADES ACADÉMICAS

Los resultados obtenidos del presente trabajo se expusieron en las siguientes actividades académicas:

Actividad Académica	Lugar y fecha	Modalidad	Trabajo
63 rd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA).	Budapest-Hungría 23 al 27 agosto del 2015.	Cartel	Tri- and Diterpenoids from Some Species of Euphorbiaceae. Evaluation of their Antiinflammatory and Cytotoxic Properties.
Simposio Interno del Instituto de Química.	Ciudad de México, 29 de enero de 2014 y 8 al 10 de junio de 2015.	Cartel	Tonantzitlolona y otros constituyentes de <i>Sapium macrocarpum</i> . Tri- and Diterpenoids from Some Species of Euphorbiaceae. Evaluation of their Antiinflammatory and Cytotoxic Properties.
“QuimiUNAM 2015”	Ciudad de México, 22 al 24 de abril de 2015	Cartel	Tonantzitlolone and others constituents from <i>Sapium macrocarpum</i> .
Publicación en el <i>Journal of the Mexican Chemical Society</i>	Aceptado 9 enero de 2017	Artículo	“Tonantzitlolone A and other cytotoxic constituents of <i>Sapium macrocarpum</i> (Euphorbiaceae).”

AGRADECIMIENTOS

A la Coordinación de Estudios de Posgrado, al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, UNAM y al proyecto DGAPA PAPIIT IG200514.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada con referencia 288423 para la realización del presente trabajo.

A la Secretaria Nacional de Ciencia y Tecnología (SENESCYT-Ecuador) y a la Universidad Central del Ecuador por los apoyos económicos respectivos.

Al Dr. E. Guillermo Delgado Lamas por su infinita paciencia, por la asesoría brindada y por su apoyo incondicional en todo momento durante la realización del presente proyecto.

A los miembros del Comité Tutor: Dra. Laura Álvarez Berber y Dr. Guillermo Penieres Carrillo, por sus comentarios y sugerencias durante el desarrollo de la tesis.

A los miembros del Jurado: Dr. Leovigildo Quijano, Dr. Carlos Martín Cerda García-Rojas, Dr. Ricardo Reyes Chilpa, Dra. María Isabel Aguilar Laurents y Dr. René Miranda Ruvalcaba, por los comentarios y correcciones de la tesis.

A los compañeros del laboratorio 1C por la amistad y consejos recibidos durante el desarrollo de este trabajo.

Al personal técnico académico del Instituto de Química.

A mis padres: Luis Novillo† y Teresa Logroño†

A Vivi, Fer y Yuri

A mis hermanos, en especial a Vini†

con todo mi amor

ÍNDICE

	Página
Abstract	13
1. Resumen	14
2. Introducción	15
3. Antecedentes	17
3.1. Generalidades de la familia Euphorbiaceae	17
3.2. Generalidades del género <i>Sapium</i>	18
3.2.1. Generalidades de <i>Sapium nitidum</i>	19
3.2.2. Generalidades de <i>Sapium macrocarpum</i>	20
3.3. Generalidades del género <i>Sebastiania</i>	20
3.3.1. Generalidades del <i>Sebastiania longicuspis</i>	22
3.4. Generalidades del género <i>Croton</i>	23
3.4.1. Generalidades de <i>Croton glabellus</i>	25
3.5. Generalidades de <i>Garcia parviflora</i>	26
4. Justificación	28
5. Hipótesis	28
6. Objetivos	29
6.1. Objetivo general	29
6.2. Objetivos específicos	29
7. Discusión de resultados	30
7.1. Estudio químico del extracto de <i>Sapium nitidum</i>	30
7.2. Estudio químico del extracto de <i>Sebastiania longicuspis</i>	45
7.3. Estudio químico del extracto de <i>Sapium macrocarpum</i>	50
7.4. Estudio químico del extracto de <i>Croton glabellus</i>	55
7.5. Derivatizaciones químicas	57
7.5.1. Preparación de 1 β ,3 β -dibenzoiloxifriedelano (102)	57
7.5.2. Preparación del aldehído derivado de 19 β H-lupeol (103)	59
7.6. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los metabolitos secundarios aislados y de los derivados semisintéticos	60
7.7. Evaluación de la actividad citotóxica de los metabolitos secundarios aislados	

y de los derivados semisintéticos	63
8. Parte experimental	65
8.1. Material y equipo	65
8.2. Actividades biológicas	66
8.2.1. Actividades antiinflamatorias	66
8.2.2. Ensayo de citotoxicidad	68
8.3. Colecta del material vegetal	68
8.4. Preparación de los extractos	69
8.5. Extracción y aislamiento	70
8.5.1. <i>Sapium nitidum</i>	70
8.5.2. <i>Sebastiania longicuspis</i>	73
8.5.3. <i>Sapium macrocarpum</i>	75
8.5.4. <i>Croton glabellus</i>	76
8.6. Características físicas y espectroscópicas de los productos naturales	77
8.7. Preparación, propiedades físicas y espectroscópicas de los derivados	92
8.7.1. Preparación de derivados de 1 β -hidroxifriedelina (76)	92
8.7.2. Preparación del aldehído derivado de 19 β H-lupeol (103)	94
9. Conclusiones y Comentarios Finales	96
10. Referencias	98
11. Anexos	107
11.1. Espectros	108
11.2. Carta de aceptación de publicación del artículo	168
11.3. Artículo	169

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Derivados semisintéticos obtenidos a partir de 76	27
Figura 2. Representación de algunas correlaciones COSY de 93	38
Figura 3. Representación de algunas correlaciones NOESY de 93	39
Figura 4. Representación de algunas correlaciones HMBC de 93	40
Figura 5. Correlaciones NOESY relevantes para 38	54
Figura 6. Estructura de rayos X de 38	55

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Desplazamientos químicos de RMN ¹ H, RMN ¹³ C y algunas correlaciones de 93	37
Tabla 2. Desplazamientos químicos de RMN ¹ H, RMN ¹³ C y algunas correlaciones de 38	52
Tabla 3. Actividad antiinflamatoria de los productos aislados de <i>S. nitidum</i>	60
Tabla 4. DI ₅₀ (μM) de 93	61
Tabla 5. Actividad antiinflamatoria de los productos aislados de <i>C. glabellus</i>	61
Tabla 6. Actividad antiinflamatoria de los productos aislados de <i>G. parviflora</i>	62
Tabla 7. Actividad citotóxica de los productos aislados de <i>S. nitidum</i>	63
Tabla 8. Actividad citotóxica de los productos aislados de <i>S. macrocarpum</i>	64
Tabla 9. Sitios de colecta de especies de la familia Euphorbiaceae	69

ESPECTROS

Espectro 1. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) de palmitato de β-amirilo (88)	108
Espectro 2. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) de palmitato de β-amirilo (88)	109
Espectro 3. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) de palmitato de lupeño (89)	110
Espectro 4. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) de palmitato de lupeño (89)	111
Espectro 5. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) de acetato de lupeño (90)	112
Espectro 6. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) de acetato de lupeño (90)	113
Espectro 7. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) de palmitato de 11-oxo-β-amirilo (91)	114
Espectro 8. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) de palmitato de 11-oxo-β-amirilo (91)	115
Espectro 9. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) mezcla de β-sitosterol (27) y estigmasterol (28)	116
Espectro 10. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) mezcla de β-sitosterol (27) y estigmasterol (28)	117
Espectro 11. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) de cicloeucalenol (92)	118
Espectro 12. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) de cicloeucalenol (92)	119
Espectro 13. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) de 93	120
Espectro 14. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) de 93	121
Espectro 15. DEPT 135 (CDCl ₃ , 100 MHz) de 93	122
Espectro 16. DEPT 90 (CDCl ₃ , 100 MHz) de 93	123
Espectro 17. COSY (CDCl ₃ , 400 MHz) de 93	124
Espectro 18. NOESY (CDCl ₃ , 400 MHz) de 93	125

Espectro 19. HSQC (CDCl ₃ , 100 MHz) de 93	126
Espectro 20. HMBC (CDCl ₃ , 100 MHz) de 93	127
Espectro 21. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) de 94	128
Espectro 22. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) de 94	129
Espectro 23. RMN ¹ H (C ₅ D ₅ N, 300 MHz) de β-D-glucopiranosido de β-sitosterilo (95)	130
Espectro 24. RMN ¹³ C (C ₅ D ₅ N, 75 MHz) de β-D-glucopiranosido de β-sitosterilo (95)	131
Espectro 25. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) de acetato de β-amirilo (96)	132
Espectro 26. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) de acetato de β-amirilo (96)	133
Espectro 27. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) mezcla de 19β <i>H</i> -lupeol (37) y β-amirina (97)	134
Espectro 28. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) mezcla de 19β <i>H</i> -lupeol (37) y β-amirina (97)	135
Espectro 29. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) de <i>epi</i> -taraxerol (98)	136
Espectro 30. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) de <i>epi</i> -taraxerol (98)	137
Espectro 31. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) de taraxerol (43)	138
Espectro 32. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) de taraxerol (43)	139
Espectro 33. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) de 3-oxo-21α <i>H</i> -hop-22(29)-eno (25)	140
Espectro 34. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) de 3-oxo-21α <i>H</i> -hop-22(29)-eno (25)	141
Espectro 35. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) de ácido acetilaleurítico (62)	142
Espectro 36. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) de ácido acetilaleurítico (62)	143
Espectro 37. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) de 16β,17-dihidroxi- <i>ent</i> -kauran-3-ona (99)	144
Espectro 38. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) de 16β,17-dihidroxi- <i>ent</i> -kauran-3-ona (99)	145
Espectro 39. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) de lupenona (100)	146
Espectro 40. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) de lupenona (100)	147
Espectro 41. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) de sitostenona (101)	148
Espectro 42. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) of sitostenona (101)	149
Espectro 43. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) de tonantzitolona (38)	150
Espectro 44. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) de tonantzitolona (38)	151
Espectro 45. DEPT-135 (CDCl ₃ , 100 MHz) de tonantzitolona (38)	152
Espectro 46. DEPT-90 (CDCl ₃ , 100 MHz) de tonantzitolona (38)	153
Espectro 47. COSY (CDCl ₃ , 400 MHz) de tonantzitolona (38)	154
Espectro 48. NOESY (CDCl ₃ , 400 MHz) de tonantzitolona (38)	155
Espectro 49. HSQC (CDCl ₃ , 100 MHz) de tonantzitolona (38)	156

Espectro 50. HMBC (CDCl ₃ , 100 MHz) de tonantzitolona (38)	157
Espectro 51. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100MHz) de 6- <i>O</i> -acetilaustronulina (69)	158
Espectro 52. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) de 6- <i>O</i> -acetilaustronulina (69)	159
Espectro 53. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) de austronulina (70)	160
Espectro 54. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) de austronulina (70)	161
Espectro 55. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) de 1β,3β-dihidroxifriedelano (82)	162
Espectro 56. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) de 1β,3β-dihidroxifriedelano (82)	163
Espectro 57. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) de 1β,3β-dibenzoiloxifriedelano (102)	164
Espectro 58. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) de 1β,3β-dibenzoiloxifriedelano (102)	165
Espectro 59. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) de aldehído derivado de 19β <i>H</i> -lupeol (103)	166
Espectro 60. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) de aldehído derivado de 19β <i>H</i> -lupeol (103)	167

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de etilo
AMCPB	Ácido <i>m</i> -cloroperoxibenzoico
ATF	Acetato de tetradecanoilforbol
°C	Grado Celsius
CCG	Cromatografía en columna por gravedad
CCFP	Cromatografía de capa fina preparativa
CPP	Cromatografía de placa preparativa
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
C ₅ D ₅ N	Piridina deuterada
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media
COSY	Espectroscopia de Correlación (Correlation Spectroscopy)
c	Cuádruple
d	Doble
dd	Doble de dobles
ddd	Doble de doble de dobles
δ	Desplazamiento químico (en ppm)
DEPT	Aumento sin distorsión por transferencia de polarización (Distortionless enhancement by polarization transfer)
EM	Espectrometría de Masas
EMIE	Espectrometría de masas por impacto electrónico
eV	Electronvolts
g	Gramo
HMBC	Correlación heteronuclear a múltiples enlaces (Heteronuclear multiple bond correlation)
HSQC	Correlación Heteronuclear Cuántica Sencilla (Heteronuclear Single Quantum Correlation)
Hz	Hertz
IE	Impacto electrónico
IR	Espectrofotometría de absorción en el infrarrojo

<i>J</i>	Constante de acoplamiento (en Hz)
λ	Longitud de onda (cm^{-1})
Kg	Kilogramo
L	Litro
M^+	Ion molecular
m	Multiplete
mg	Miligramo
mL	Mililitro
μA	Microamperios
μM	Micromolar
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
nm	Nanómetro
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
pf	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
Rf	Frente de referencia
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN ^1H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno-1
RMN ^{13}C	Resonancia magnética nuclear de carbono-13
RO	Rotación óptica
s	Simple
sa	Simple ancha
SRB	Sulforrodamina B
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Tetrametilsilano
t	Triple
UV	Espectrofotometría de adsorción en el ultravioleta
% ar	Porcentaje de abundancia relativa

ABSTRACT

The Euphorbiaceae family is one of the largest in the plant kingdom. It is widespread throughout the world and their species biosynthesize a variety of bioactive natural products. The aim of present study is the characterization and bioevaluation of the secondary metabolites from five Euphorbiaceae species, *Sapium nitidum*, *Sebastiania longicuspis*, *Sapium macrocarpum*, *Croton glabellus* and *Garcia parviflora*.

From the aerial parts of *S. nitidum* were characterized β -amyrinyl palmitate (**88**), lupeyl palmitate (**89**), lupeyl acetate (**90**), 11-oxo- β -amyrinyl palmitate (**91**), β -sitosterol (**27**), stigmasterol (**28**), cycloeucalenol (**92**), 3 β -palmitoyloxy-1 β ,11 α -trihydroxy-olean-12-ene (**93**), β -sitosteryl-3-*O*- β -D-glucopyranoside-6'-*O*-palmitate (**94**), β -sitosteryl-3-*O*- β -D-glucopyranoside (**95**), β -amyrinyl acetate (**96**), 19 β *H*-lupeol (**37**) and β -amyrine (**97**). From *S. longicuspis* were isolated **27**, **37**, 3-*epi*-taraxerol (**98**), taraxerol (**43**), 3-acetyl-aleuritolic acid (**62**), 3-oxo-21 α *H*-hop-22(29)-ene (**25**) and 16 β ,17-dihydroxy-*ent*-kauran-3-one (**99**). Lupenone (**100**), sitostenone (**101**), tonantzitlolone A (**38**), **27**, **37**, and **95** were isolated from the aerial parts of *S. macrocarpum*. From the leaves of *C. glabellus* were isolated 6-*O*-acetylaustroinulin (**69**), austroinulin (**70**) and phytosterols. Preliminary biological evaluation of some natural compounds indicated moderate activity. Some semisynthetic compounds were prepared and their biological activities were also evaluated. From the integration of the chemical results from *Sapium* and *Sebastiania* species, some chemotaxonomic relationships are discussed, since they belong to the subtribe Hippomaninae, tribe Hippomaneae, subfamily Euphorbioideae of the family Euphorbiaceae.

1. RESUMEN

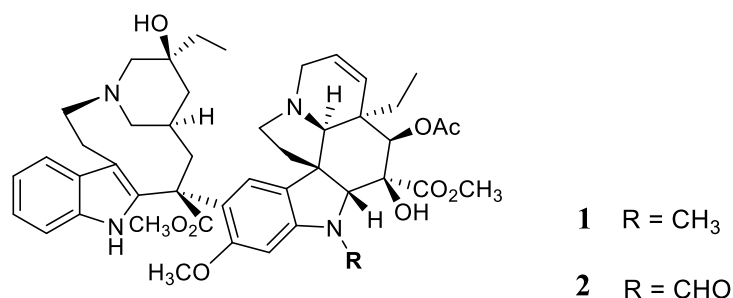
La familia Euphorbiaceae es una de las más grandes del reino vegetal. Se encuentra ampliamente distribuida en el mundo y sus especies biosintetizan una variedad de productos naturales bioactivos. El objetivo del presente estudio es la caracterización y bioevaluación de los metabolitos secundarios de cinco especies de Euphorbiaceae, *Sapium nitidum*, *Sebastiania longicuspis*, *Sapium macrocarpum*, *Croton glabellus* y *Garcia parviflora*.

De las partes aéreas de *S. nitidum* se caracterizaron palmitato de β -amirilo (**88**), palmitato de lupeño (**89**), acetato de lupeño (**90**), palmitato de 11-oxo- β -amirilo (**91**), β -sitosterol (**27**), estigmasterol (**28**), cicloeucalenol (**92**), 3 β -palmitoiloxi-1 β ,11 α -dihidroxi-olean-12-eno (**93**), 6'-palmitoil- β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo (**94**), β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo (**95**), acetato de β -amirilo (**96**), 19 β H-lupeol (**37**) y β -amirina (**97**). A partir de *S. longicuspis* se aislaron **27**, **37**, 3-*epi*-taraxerol (**98**), taraxerol (**43**), 3-oxo-21 α H-hop-22(29)-eno (**25**), ácido 3-acetilauritólico (**62**) y 16 β ,17-dihidroxi-*ent*-kauran-3-ona (**99**). De las partes aéreas de *S. macrocarpum* se aislaron **27**, **37**, **95**, lupenona (**100**), sitostenona (**101**) y tonantzitlolona A (**38**). De las hojas de *C. glabellus* se aislaron 6-*O*-acetilaustrinulina (**69**), austrinulina (**70**), y **27**. La evaluación de las actividades biológicas de algunos compuestos naturales indicaron una actividad moderada. Se prepararon algunos compuestos semisintéticos y se evaluó su actividad biológica. A partir de la integración de los resultados químicos obtenidos de las especies de *Sapium* y *Sebastiania*, se discuten ciertas relaciones quimiotaxonómicas, ya que pertenecen a la subtribu Hippomaninae, tribu Hippomaneae, subfamilia Euphorbioideae de la familia Euphorbiaceae.

2. INTRODUCCIÓN

Desde el inicio de la humanidad la flora ha constituido un recurso de gran importancia en todas las culturas del mundo. Su aprovechamiento ha incidido en muchos aspectos, entre los cuales pueden mencionarse la alimentación, salud y agronomía. Este conocimiento empírico ha generado una gran tradición que solo en las últimas décadas se ha ponderado adecuadamente, y se ha revalorado a la biodiversidad como parte esencial del patrimonio de la humanidad [1]. Todos los organismos vivos tienen la capacidad de sintetizar una serie de productos naturales, frecuentemente como mecanismos de defensa, supervivencia y evolutivos. En particular, los metabolitos secundarios de especies vegetales han sido la base para el desarrollo de nuevos agentes agronómicos y medicinales (tanto de uso humano como veterinario). Así, la investigación básica de los metabolitos secundarios presentes en la naturaleza constituye una línea de trabajo que incide no solo en el entendimiento de los mecanismos moleculares que operan en la naturaleza (en la defensa, interacciones y evolución de los organismos vivos), sino también como una fuente de conocimiento de agentes químicos con eventual uso medicinal, alimenticio y agronómico, entre otros [2,3].

El cáncer constituye una de las principales causas de muerte en el mundo. Basta mencionar que sólo en el 2008 fallecieron 7.6 millones de personas y más del 70% de los decesos se registraron en países de bajos y medianos ingresos [4]. Debido a que esta enfermedad constituye un problema de salud pública, la búsqueda de metabolitos secundarios provenientes de plantas se ha concentrado hacia la prevención y el tratamiento de este padecimiento y para este último caso, que actúen específica y selectivamente contra células tumorales. Es interesante notar que los porcentajes de nuevos fármacos anticancerígenos aprobados de origen natural directa o indirectamente durante los períodos 1981-2014 y 1940s-2014 son 52 y 53%, respectivamente [5]. Como ejemplos ilustrativos de la importancia del descubrimiento de productos naturales de uso terapéutico es posible mencionar a los alcaloides vinblastina (**1**) y vincristina (**2**), aislados de la planta *Catharantus roseus* (Apocynaceae), la cual es usada tradicionalmente para el tratamiento de la diabetes, y se ha descubierto que **1** es un agente de elección para el tratamiento de leucemias, cáncer de pecho, ovario y pulmón, mientras que **2** se emplea para el tratamiento de leucemia linfocítica, cáncer cervicouterino, de colon y de pecho [6].



La familia Euphorbiaceae se considera como una fuente de sustancias con propiedades citotóxicas y antitumorales relevantes (diterpenos de tipo latirano, jatrofano, tigliano, ingenano, entre otros) [7].

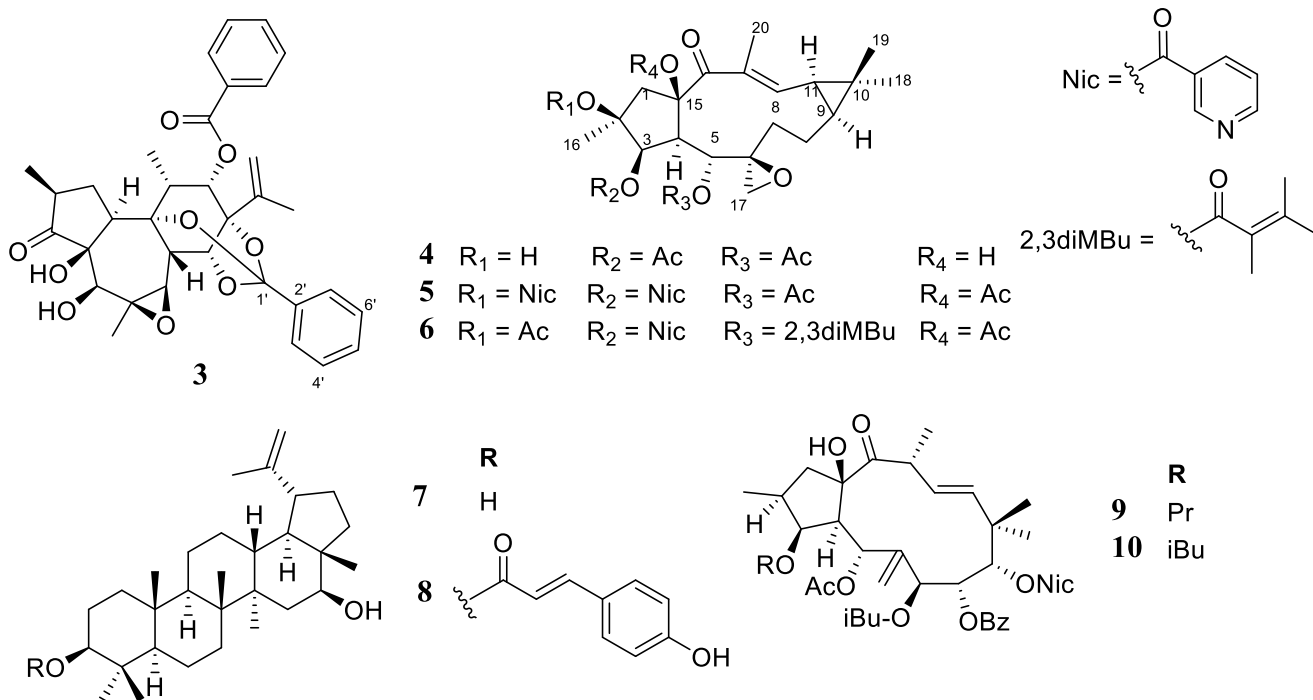
La terapia contra el cáncer ha evolucionado significativamente en las últimas décadas [8], y se ha reconocido que el uso de determinados agentes analgésicos e antiinflamatorios reduce el riesgo de generación de ciertos tipos de cáncer, ya que se han identificado mensajeros metabólicos comunes a los procesos de inflamación y cáncer [9]. Las plantas pertenecientes a la familia Euphorbiaceae biosintetizan compuestos que exhiben diversas actividades biológicas, entre las que destaca tanto la inhibición del crecimiento de células cancerosas (citotoxicidad) como la presencia de algunas sustancias antiinflamatorias. Así, se propuso en el presente trabajo de investigación, realizar el estudio químico de especies selectas de esta familia (*Sapium nitidum*, *Sebastiania longicuspis*, *Sapium macrocarpum*, *Croton glabellus* y *Garcia parviflora*), con el propósito de aislar y caracterizar estructuralmente a los constituyentes químicos, y ponderar la bioactividad de los mismos como agentes citotóxicos y antiinflamatorios. Adicionalmente, se describe la obtención de derivados semisintéticos de los metabolitos secundarios aislados y la bioevaluación de los mismos.

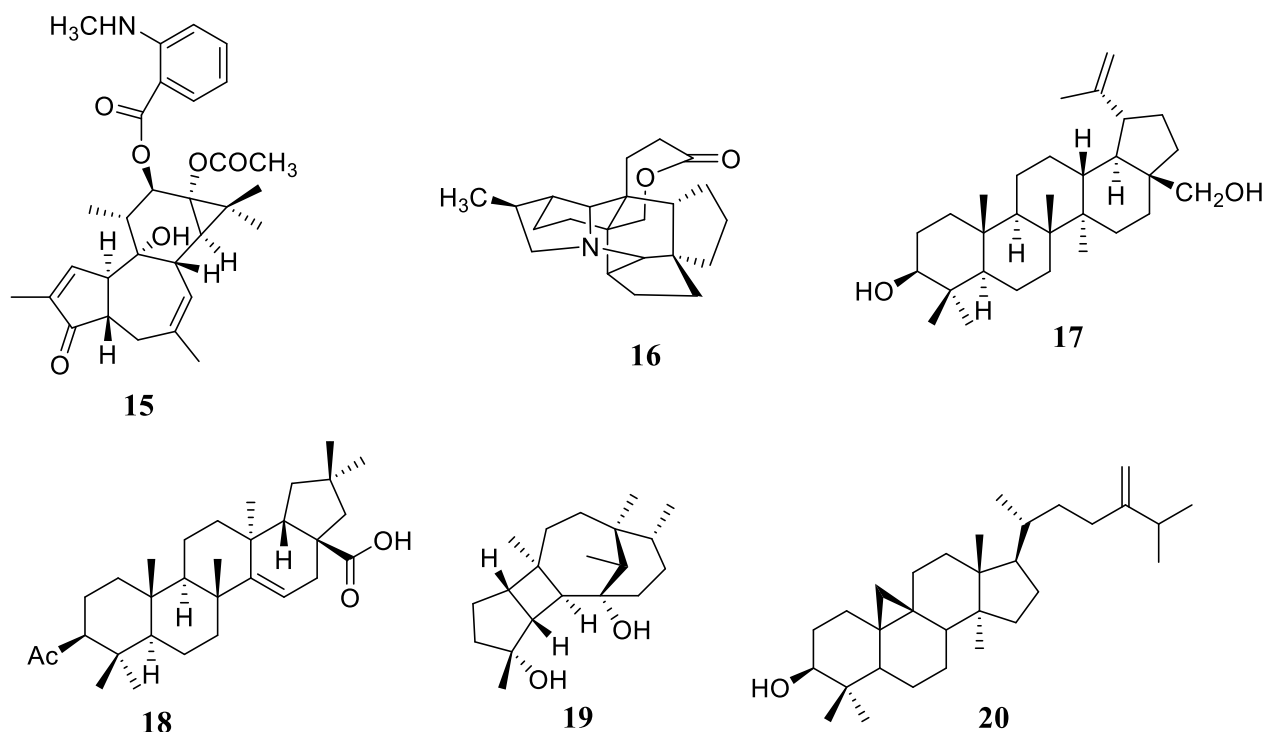
3. ANTECEDENTES

3.1 Generalidades de la familia Euphorbiaceae

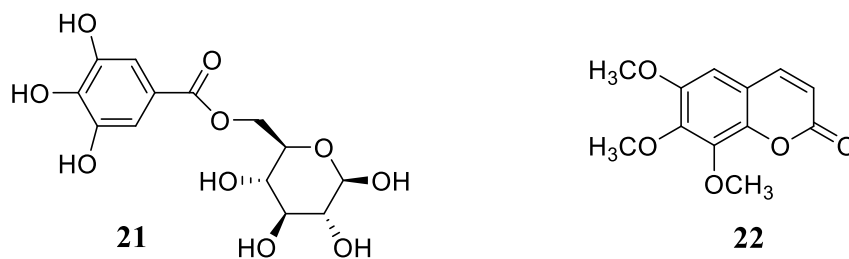
La familia Euphorbiaceae es una de las más grandes del reino vegetal y sus especies se encuentran distribuidas en todo el mundo. Incluye aproximadamente 8,700 especies agrupadas en 320 géneros [10]. Algunas especies de la familia son reconocidas por su uso alimenticio, como *Cnidoscolus chayamansa* (nombre común: chaya) [11]; industrial, como *Jatropha curcas* (nombre común: piñón) en la producción de biodiesel [12] o bien, por su uso ornamental, como *Euphorbia pulcherrima* (nombre común: nochebuena) [13].

Las investigaciones publicadas referentes al aislamiento de sustancias bioactivas a partir de euforbiáceas informan que este grupo de plantas biosintetizan diferentes tipos de productos naturales, tales como mono-, sesqui-, di- y triterpenos, flavonoides, alcaloides y acetogeninas, entre otros [14-16]. Entre los ejemplos específicos, puede mencionarse que de las ramas de *Trigonostemon heterophyllus* se obtuvieron varios diterpenos, de los cuales la trigoheterina E (**3**) exhibe actividad tóxica contra líneas celulares cancerosas humanas (HL-60 y A-549) [17]. El análisis químico de *Euphorbia sogdiana* permitió el aislamiento de diterpenos nuevos, con esqueleto del 6(17)-epoxilatrano (**4-6**), los cuales presentaron actividad citotóxica [18]. Los triterpenos **7** y **8** obtenidos de la corteza de *Jatropha neopauciflora* inhiben moderadamente el crecimiento de ciertas células cancerosas [19].





En la medicina tradicional china, las hojas de *S. sebiferum* son utilizadas por su acción anti-inflamatoria, diurética y anti-parasitaria. En estudios de esta especie se aislaron el 6-*O*-galoil-D-glucosa (**21**), el cual mostró un efecto anti-hipertensivo y la 6,7,8-trimetoxicoumarina (**22**) [33, 34].



3. 2. 1 Generalidades de *Sapium nitidum*

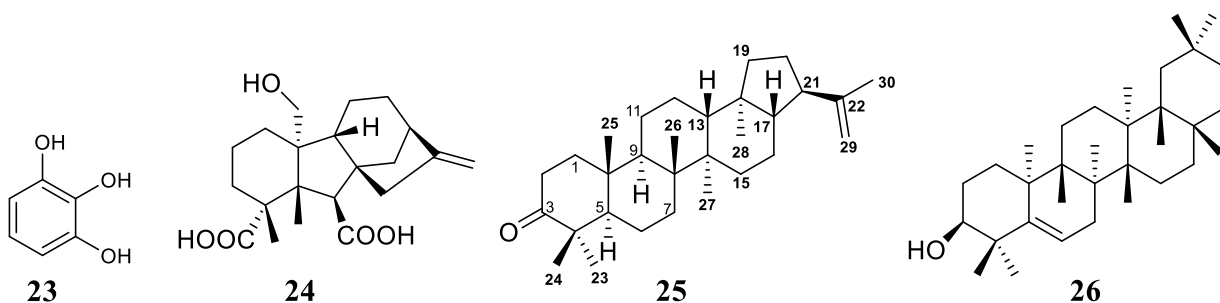
Sapium nitidum (Monach) Lundell es un árbol que alcanza aproximadamente 15 m de altura, de corteza lisa, café y exudado blanco. Se encuentra distribuido en los estados de Chiapas, Oaxaca, Puebla y Veracruz, y también se encuentran registros en Belice y Guatemala [35]. No se ha reportado todavía algún análisis químico sobre esta especie.

3. 2. 2 Generalidades de *Sapium macrocarpum*

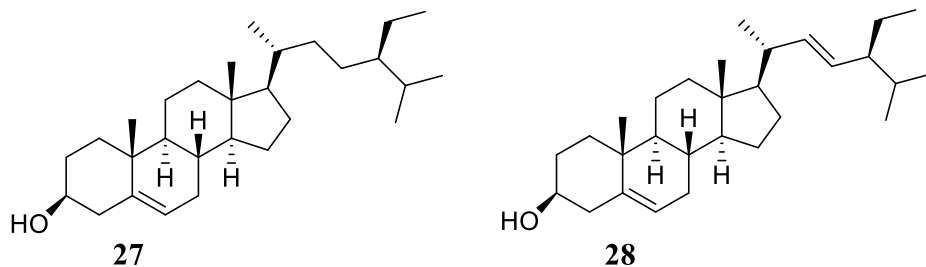
S. macrocarpum es un árbol que principalmente está localizado en la parte sur de México y en América Central. En la medicina tradicional los Mayas lo utilizan para curar infecciones de la piel, tales como las verrugas [36]. No hay reportes sobre el análisis químico de esta especie, y recientemente se ha informado el aislamiento de compuestos fitotóxicos a partir de un hongo endofítico de esta especie [37].

3. 3. Generalidades del género *Sebastiania*

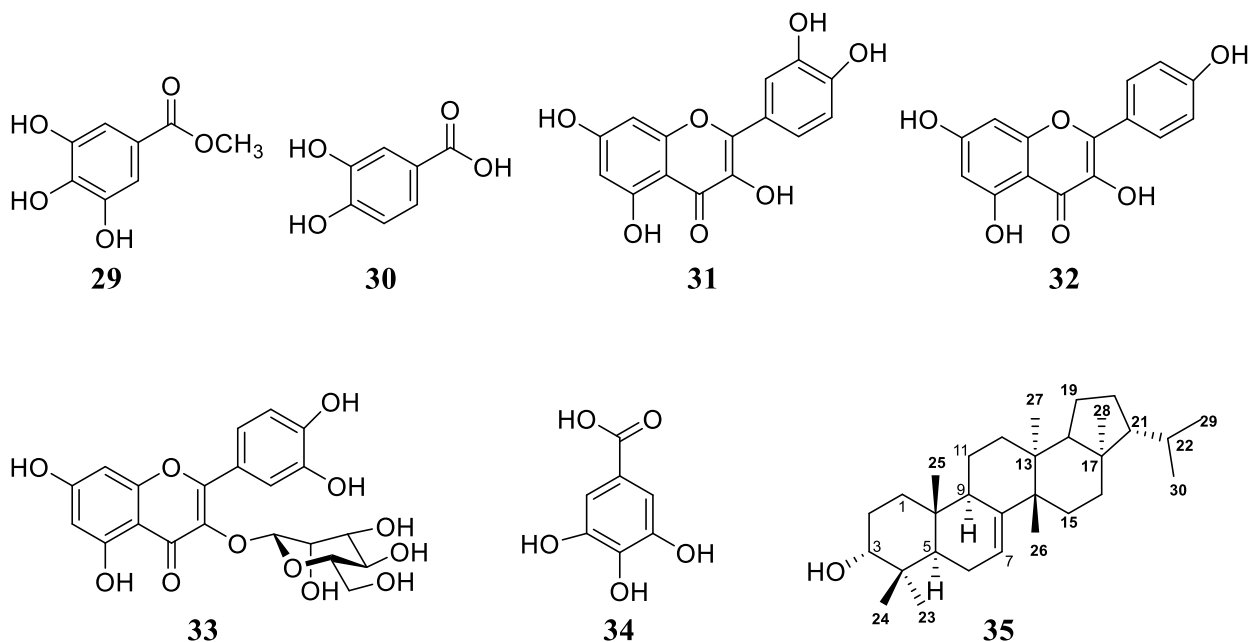
Se describen 188 nombres científicos de las especies pertenecientes al género *Sebastiania*, pero solo 72 especies corresponden a los nombres aceptados [38]. El género está principalmente distribuido en los trópicos, donde los mayores centros de dispersión se encuentran en América y África. De las 72 especies descritas, se han reportado estudios químicos de *S. commersoniana*, *S. corniculata*, *S. brasiliensis*, *S. argutidens*, *S. adenophora*, *S. pavoniana*, *S. schottiana*, *S. macrocarpa* y *S. chamaelea* [39]. Los compuestos químicos aislados de estas especies presentan una gran diversidad estructural. Al analizar el extracto metanólico de las hojas de *S. chamaelea* por CG-EM se identificaron los compuestos pirogalol (**23**), ácido 3-hidroxibenzoico, giberelina (**24**), pirocatecol, 1-eicosanol, entre otros [40].



El análisis del extracto metanólico de las raíces de *S. schottiana* condujo al aislamiento de los triterpenos moretenona (**25**) y glutinol (**26**) y de los esteroides β -sitosterol (**27**) y estigmasterol (**28**). Los compuestos **25** y **26** exhibieron notable acción analgésica, para las constricciones abdominales en ratones, las cuales fueron inducidas por ácido acético vía intraperitoneal [41].

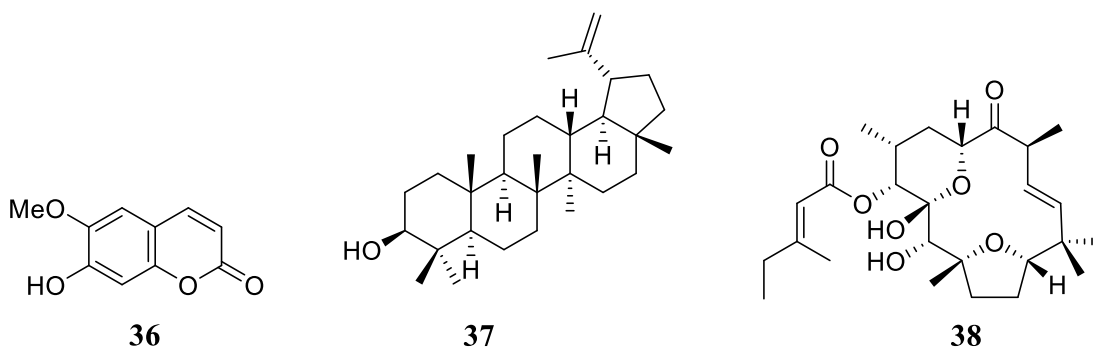


El estudio del extracto hidroalcohólico al 50% de *S. brasiliensis* [42], permitió identificar dos compuestos con actividad antimicrobiana, el galato de metilo (**29**) (CIM 128 $\mu\text{g/mL}$) y ácido protocatecuico (**30**) (CIM 128 $\mu\text{g/mL}$); además, se aislaron quercetina (**31**), kaempferol (**32**), quercitrina (**33**) y ácido gálico (**34**).

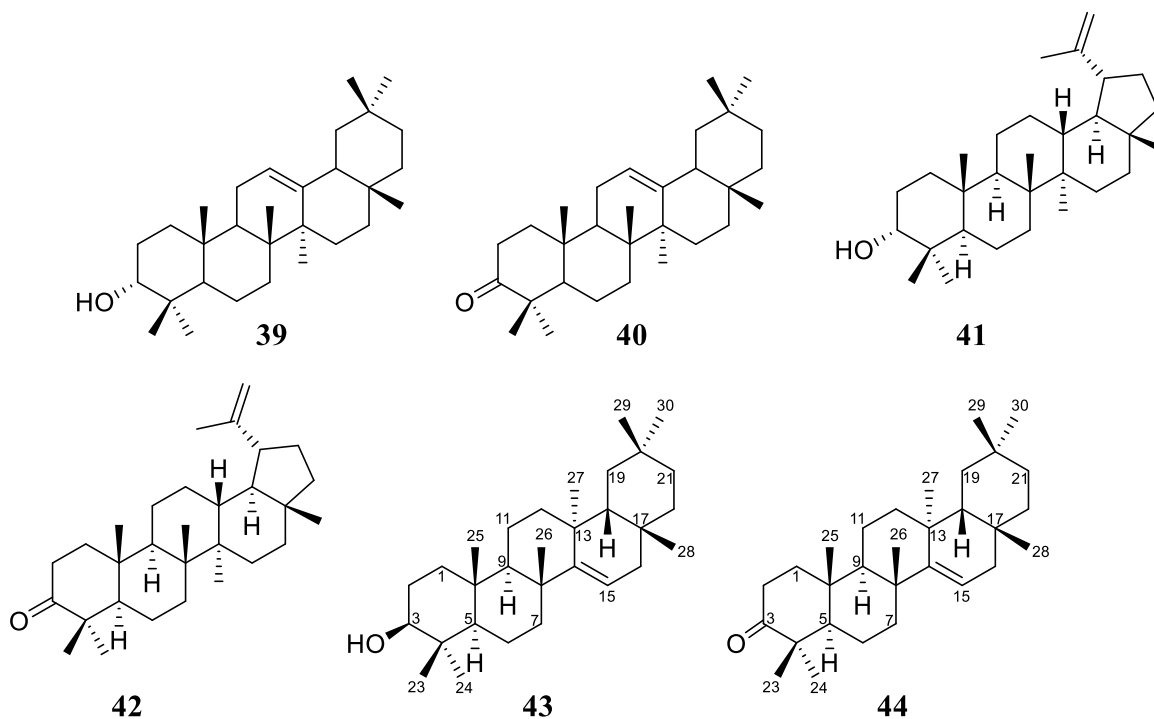


En otro estudio de *S. brasiliensis* se encontró que la fracción eluida con *n*-hexano-AcOEt (9:1) inhibe en 90% el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* de H37Rv (ATCC27294), a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$. El análisis de esta fracción, mediante cromatografía de capa fina preparativa, permitió identificar al terpeno fern-7-en-3 α -ol (**35**) [43].

La investigación química del extracto metanólico de las partes aéreas de *S. macrocarpa*, permitió el aislamiento de la mezcla de β -sitosterol (**27**), estigmasterol (**28**), ácido gálico (**34**), y escopoletina (**36**). Por otro lado, del extracto hexánico de las raíces se aisló lupeol (**37**) y el diterpeno macrocíclico del tipo flexibilano (+)-tonantzitlolona (**38**) [39].



A partir de las hojas de *Sebastiania adenophora* se aislaron los triterpenos pentacíclicos 3-*epi*- β -amirina (**39**), β -amirinona (**40**), 3-*epi*-lupeol (**41**), lupenona (**42**), 3 β -taraxerol (**43**) y taraxerona (**44**). Estos triterpenos estimularon el crecimiento de las raíces de amaranto [44].



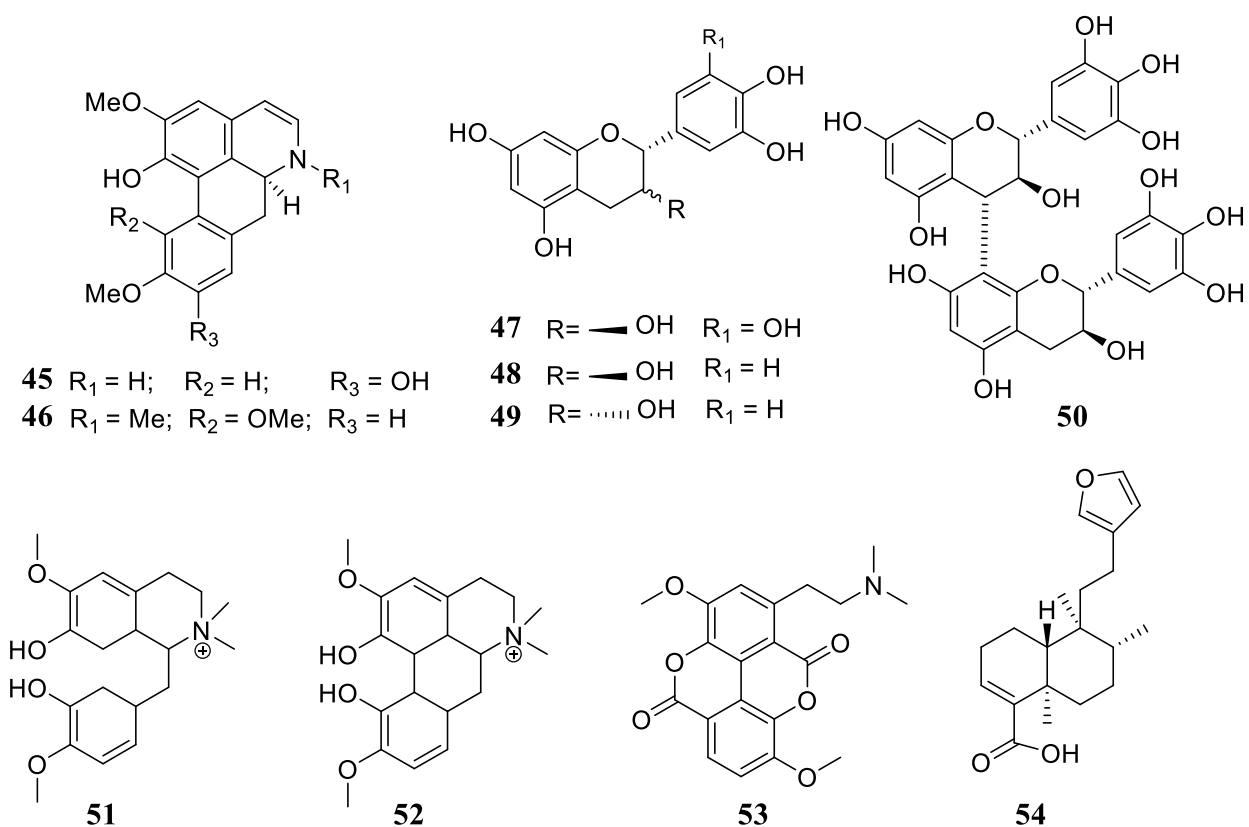
3.3.1 Generalidades de *Sebastiania longicuspis*

S. longicuspis es un sinónimo *Pleradenophora longicuspis* (Standl.) Esser [45]. Es un árbol laticífero con dimensiones de 2 a 4 m de altura y tronco de hasta 25 cm de diámetro, conocido como *chechem blanco* y temido por su exudado cáustico [45]. El hábitat de esta especie son los bosques húmedos subtropicales y se distribuye en el Sureste de México, Guatemala, Belice y Honduras, y aún no se han llevado a cabo estudios sobre su composición química.

3.4. Generalidades del género *Croton*

Croton es un género que incluye 2,696 nombres científicos, pero solo 1,205 nombres de especies han sido aceptados [47]. Este grupo de plantas se encuentra ampliamente distribuido en varias regiones del mundo y ciertas especies son empleadas tradicionalmente en África, Asia y América del Sur. Estos usos populares incluyen el tratamiento del cáncer, estreñimiento, diabetes, problemas digestivos, disentería, heridas externas, fiebre, hipercolesterolemia, hipertensión entre otros [48]. La presencia de terpenos, flavonoides y alcaloides es relativamente frecuente en este género.

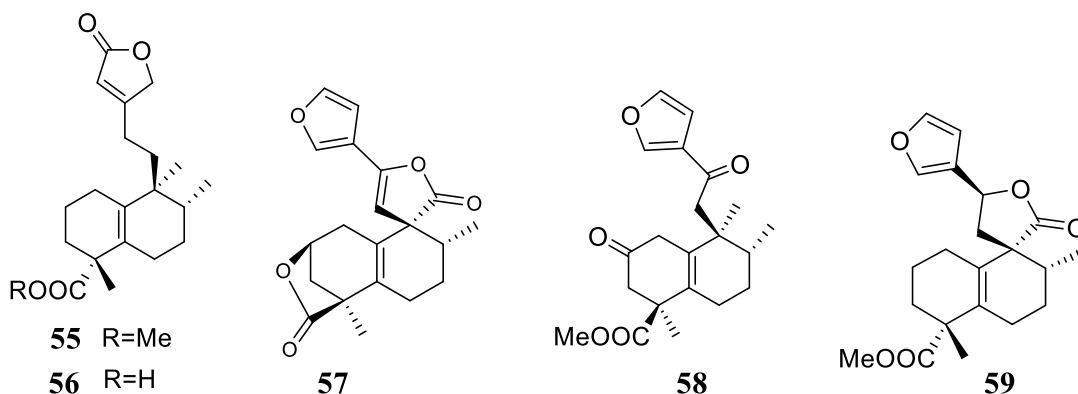
El análisis del extracto etanólico (70%) de las hojas de *C. echinocarpus* permitió el aislamiento de la norisoboldina (**45**) y coridina (**46**). Ambos alcaloides inhibieron el 40% de la actividad de la enzima transcriptasa inversa del VIH-1 a una concentración de 100 µg/mL de **45** y 450 µg/mL de **46** [49].



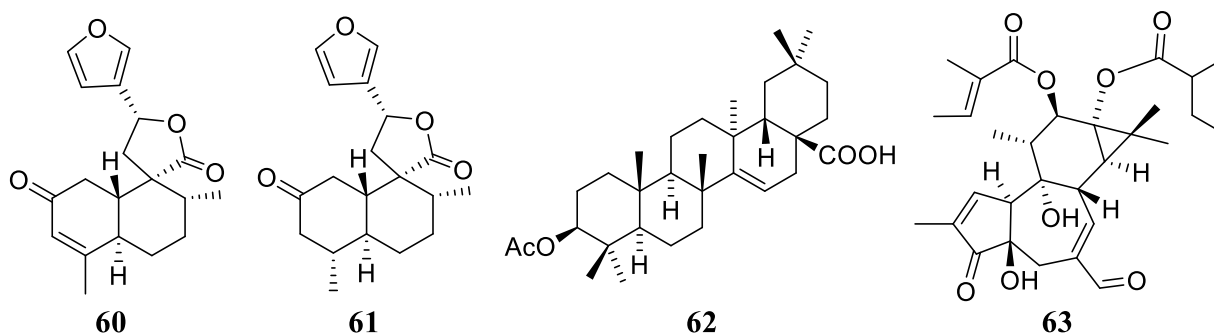
El extracto metanólico de la corteza de *C. urucurana* mostró propiedades antiinflamatorias y antinociceptivas, corroborando su uso en la medicina popular. Se aislaron los siguientes constituyentes químicos, (+)-galocatequina (**47**), (+)-catequina (**48**), (–)-epicatequina (**49**),

procianidina B3 (**50**), tembetarina (**51**), magnoflorina (**52**), taspina (**53**), ácido hardwickico (**54**) entre otros [50].

El extracto de las raíces de *Croton crassifolius*, preparado mediante fluidos supercríticos, se analizó a través de diferentes métodos espectroscópicos y se identificaron varios diterpenos, de los cuales se puede mencionar a la crassifolina A (**55**), crassifolina B (**56**), crassifolina J (**57**), crassifolina O (**58**) y la penduliflaworosina (**59**). Un total de 23 diterpenos aislados se evaluaron con respecto a su actividad antiangiogénica y el compuesto **59** fue el que presentó la mejor actividad [51].

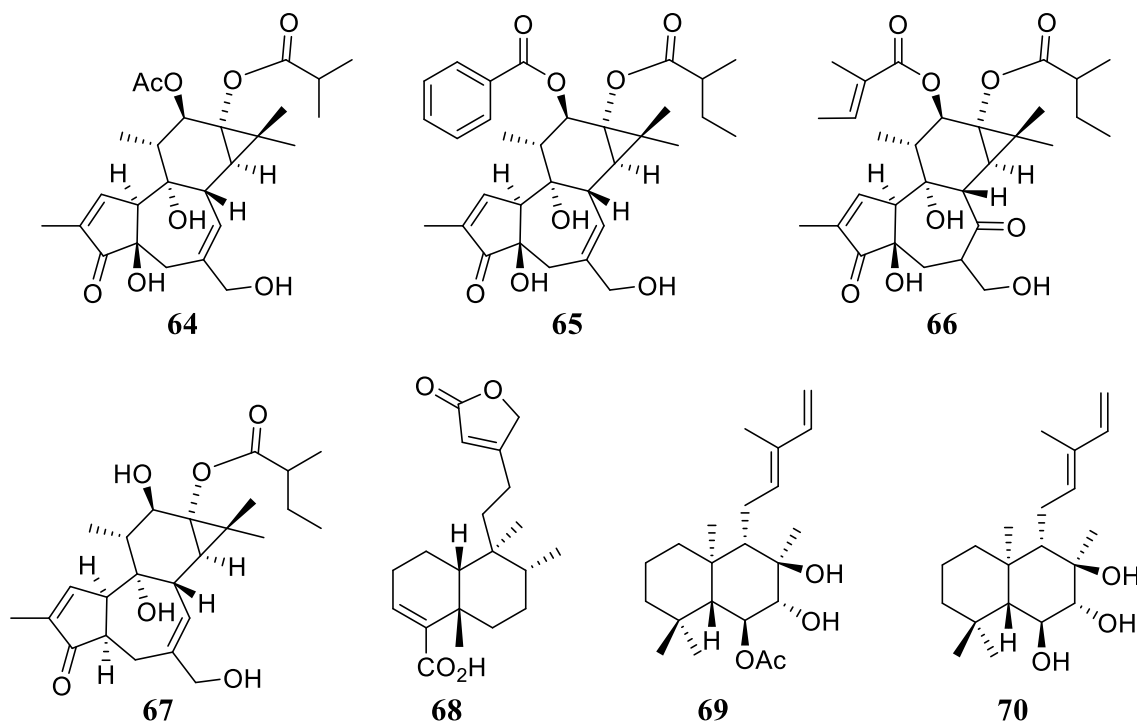


Los diterpenos del tipo clerodano, *trans*-dehidrocrotonina (**60**), *trans*-crotonina (**61**) y el triterpeno ácido acetilauritólico (**62**) fueron aislados del extracto hexánico de las ramas de *C. cajucara*. El compuesto **60** presentó la mejor actividad contra *Leishmania amazonensis*; además, este diterpeno no presentó toxicidad de macrófagos hasta la concentración ensayada [52].



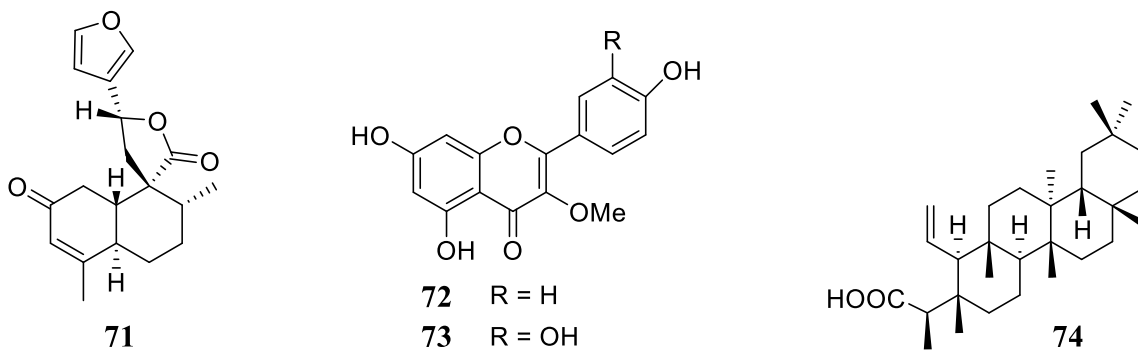
De las partes aéreas de *C. tiglium* se han aislado ésteres de forbol, como el 12-*O*-tigloil-13-*O*-(2-metil)butirato de 20-deoxi-20-oxoforbol (**63**), 13-*O*-isobutirato de 12-*O*-acetilforbol (**64**), 13-*O*-(2-metil)butirato de 12-*O*-benzoilforbol (**65**), **66** y **67**. Varios de estos compuestos presentaron potente actividad citotóxica frente a diferentes líneas celulares (K562, A549, DU145,

H1975, MCF-7, U937, SGC-7901, HL60, HeLa, MOLT-4), pero ninguno de ellos mostró efectos citotóxicos sobre las líneas celulares humanas normales 293T y LX-2 [53].



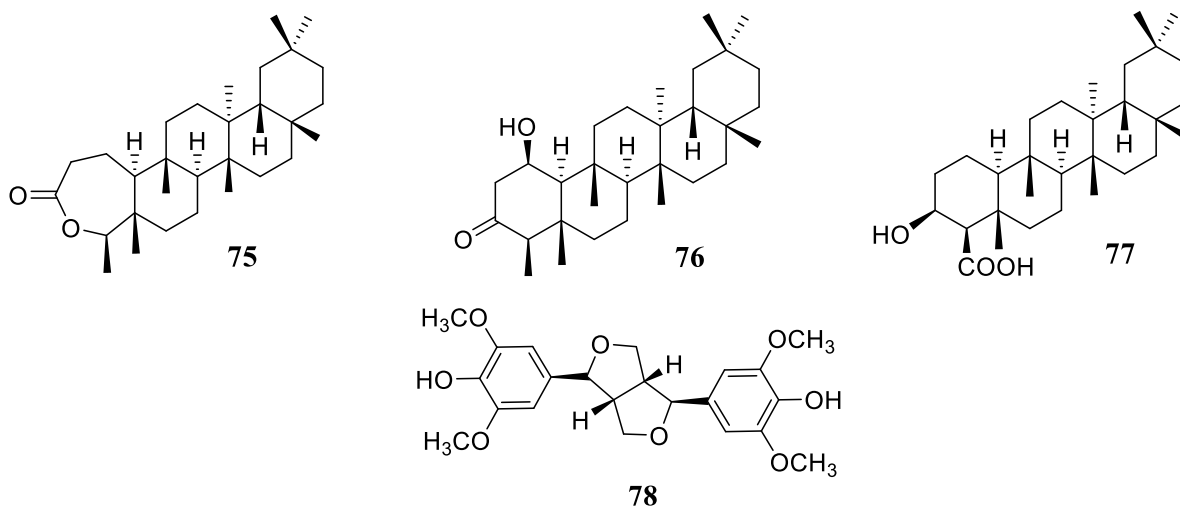
3.4.1. Generalidades de *Croton glabellus*

Es una planta ampliamente distribuida desde México hasta América del Sur, y las infusiones de las hojas y la corteza se utilizan principalmente contra el cáncer y las infecciones de heridas. El extracto de CH₂Cl₂-MeOH obtenido de las hojas de *C. glabellus* se estudió debido a sus propiedades citotóxicas moderadas exhibidas contra cinco líneas de células tumorales humanas. Las investigaciones químicas del extracto orgánico condujeron a la purificación y caracterización de una lactona diterpénica del *cis-ent*-clerodano denominada marrubiagenina (**68**), diterpenos de tipo *ent*-labdano la 6-*O*-acetilaustronulina (**69**) y la austronulina (**70**), terpenos de tipo clerodano como *trans*-dehidrocrotonina (**71**) y los flavonoides 3-*O*-metilkaempferol (**72**) y 5,7,3',4'-tetrahydroxi-3-metoxiflavona (**73**). El compuesto **72** presentó la mayor actividad citotóxica [54].



3.5. Generalidades de *Garcia parviflora*

Para el género *Garcia* se reportan tres especies, pero solo dos han sido aceptadas, estas son *Garcia nutans* Vahl ex Rohr y *Garcia parviflora* Lundell [55]. *G. parviflora* es un árbol endémico de México y se han informado los siguientes constituyentes químicos, el ácido 1,2-dehidro-2,3-secofriedelinoico (**74**), ácido acetilaleuritólico (**62**), 3,4-lactona de friedelina (**75**), 1 β -hidroxifriedelina (**76**), ácido 3 β -hidroxi-23-friedelinoico (**77**), (-)-siringaresinol (**78**), entre otras sustancias.



A partir de **76** se prepararon varios derivados, en particular, la reacción con ácido *m*-cloroperoxibenzoico produjo las sustancias **79-81**, mientras que la reducción química de **76** produjo **82**. La acetilación del diol **82** produjo **83** y **84**. La reacción con hidroxilamina de **76** produjo la oxima **85**, la cual generó **86** mediante la transposición de Beckmann. La oxidación mediante el reactivo de Jones de **76** originó **87** (Figura 1). Las sustancias naturales y semisintéticas fueron bioevaluadas como agentes citotóxicos. El compuesto **62** presentó buena actividad antiproliferativa contra la línea celular U251 (Sistema Nervioso Central) con un CI₅₀ 8.4

μM , la cual es comparable con la actividad de la adriamicina (CI_{50} 0.3 μM), que fue usada como referencia en el bioensayo [56].

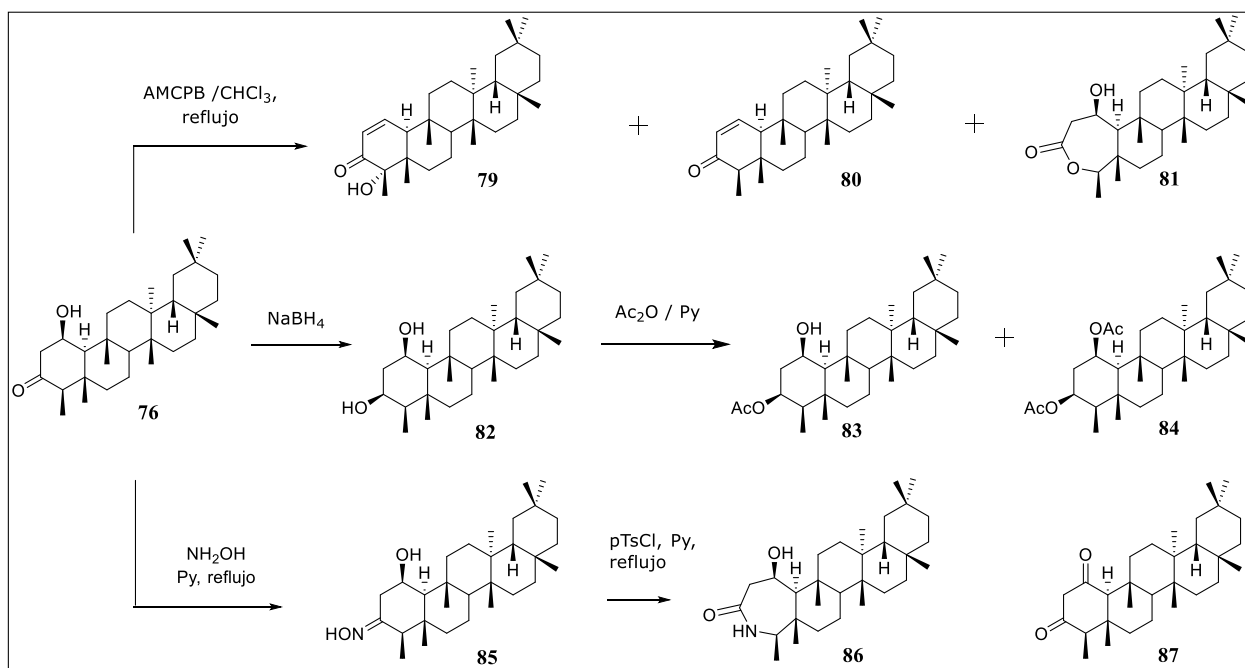


Figura 1. Derivados semisintéticos obtenidos a partir de **76**

4. JUSTIFICACIÓN

Considerando la diversidad estructural de los productos naturales bioactivos aislados de la familia Euphorbiaceae, y estimando que los tratamientos para los padecimientos inflamatorios y cancerígenos demandan una búsqueda continua de nuevas sustancias, en este proyecto se propone el aislamiento, caracterización estructural, derivatización y bioevaluación de productos naturales presentes en especies selectas de esta familia, con el fin de generar conocimientos originales que eventualmente coadyuven en la búsqueda y eventual desarrollo de agentes de utilidad terapéutica.

5. HIPÓTESIS

Algunas especies de la familia Euphorbiaceae se caracterizan por la biosíntesis de ciertos compuestos que presentan actividades biológicas relevantes (en particular relacionadas con procesos anti-inflamatorios y citotóxicos), por lo que es esperable aislar y caracterizar (o bien preparar, mediante semisíntesis) compuestos bioactivos a partir de especies selectas de este grupo de plantas.

6. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

Generar conocimiento científico referente a la estructura molecular, la reactividad química y la bioactividad de los metabolitos secundarios presentes en la naturaleza (en este caso, de especies pertenecientes a la familia Euphorbiaceae, específicamente *Sapium nitidum*, *Sebastiania longicuspis*, *Sapium macrocarpum*, *Croton glabellus* y *Garcia parviflora*), en búsqueda de sustancias con actividad anti-inflamatoria y citotóxica.

6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- (a) Colectar algunas especies vegetales de euforbiáceas de los géneros *Sapium*, *Sebastiania*, *Croton* y *Garcia* (esta actividad se llevó a cabo en la reserva ecológica de la UNAM de Los Tuxtlas, Veracruz, y en el Estado de Chiapas, con académicos calificados para tal actividad).
- (b) Realizar ensayos de extracción a escala analítica de las especies selectas, y a partir de los resultados obtenidos, establecer condiciones para la preparación de los extractos orgánicos correspondientes a escala preparativa.
- (c) Aislar, purificar y determinar las estructuras moleculares de los metabolitos secundarios.
- (d) Preparar algunos derivados semisintéticos a partir de los productos naturales obtenidos de las especies analizadas.
- (e) Evaluar los metabolitos secundarios obtenidos y los derivados semisintéticos, mediante el ensayo de inhibición de la inflamación en oreja de ratón inducido por ésteres de forbol y mediante el ensayo de citotoxicidad, empleando el método colorimétrico de la sulforrodamina B, frente a un conjunto de seis líneas celulares de tumores humanos.
- (f) Interpretar y contextualizar los resultados obtenidos en el ámbito de los productos naturales bioactivos.

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

7.1. Estudio químico del extracto de *Sapium nitidum*

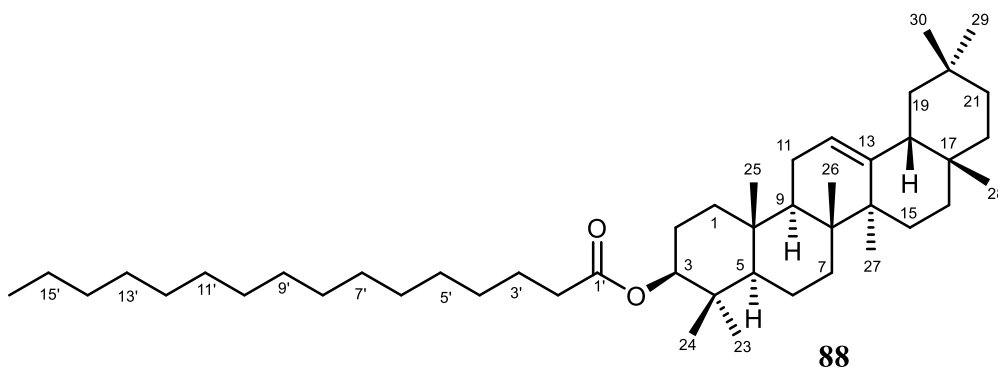
Se realizó el fraccionamiento primario del extracto CH₂Cl₂-metanol (1:1) de las hojas de *S. nitidum*, mediante cromatografía en columna, con el cual se aislaron y purificaron varios productos naturales. Mediante el análisis espectroscópico de los productos aislados se identificaron palmitato de β-amirilo (**88**), palmitato de lupeño (**89**), acetato de lupeño (**90**), palmitato de 11-oxo-β-amirilo (**91**), β-sitosterol (**27**), estigmasterol (**28**), cicloeucalenol (**92**), 3β-palmitoiloxi-1β,11α-dihidroxi-olean-12-eno (**93**), 6'-palmitoil-β-D-glucopiranosido de β-sitosterilo (**94**) y β-D-glucopiranosido de β-sitosterilo (**95**).

7.1.1. Palmitato de β-amirilo (**88**)

Al analizar el EMIE del compuesto **88** se observa la presencia del ion molecular a m/z 664 en concordancia con la fórmula molecular C₄₆H₈₀O₂, a m/z 649 se observa un pico de pequeña intensidad correspondiente a la pérdida de un grupo metilo a partir del ion molecular [M-CH₃]⁺, el pico base del espectro se observa a m/z 218 el cual se forma producto de la reacción de retro Diels-Alder a nivel del anillo C y a partir del cual se originan los iones con m/z 203, por la pérdida de un grupo metilo y m/z 189 debido a la pérdida del fragmento [C₂H₅][•] por la ruptura del enlace que une a los anillos D y E. Estos patrones de fragmentación son típicos de esqueletos tipo oleanano con insaturación en el carbono 12.

En el espectro de RMN ¹H (espectro 1) del compuesto **88** se observa el perfil característico de un triterpeno, ya que la mayor parte de las señales se observan a campo alto, precisamente en la zona donde aparecen los metilos y metilenos alifáticos. En el espectro de RMN ¹³C (espectro 2) se comprobó la presencia de 46 señales, y mediante la técnica DEPT se asignaron a 9 metilos, 24 metilenos, 5 metinos y 8 carbonos cuaternarios, lo cual afirma la suposición de que se trata de un triterpeno, pero presumiblemente esterificado con un ácido lipídico, debido al elevado número de metilenos. Efectivamente, la presencia de una señal triple correspondiente a un metino vinílico en δ_H 5.18 ($J = 3.9$ Hz), puede asignarse al hidrógeno H-12 de un triterpeno pentacíclico, lo que está en concordancia con (a) al menos ocho señales simples de metilos observables a campo alto en el espectro de RMN ¹H, como con (b) las señales a δ_C 121.64 (CH-12) y δ_C 145.20 (C-13) del espectro de RMN ¹³C, los cuales son olefínicos. En δ_H 4.50 ($J = 9.2, 6.8$ Hz) se observa una señal doble de dobles que se asigna al H-3α de un oximetino de un éster geminal, lo que se confirma por

la presencia del carbono carbinólico en δ_C 80.5. A campo alto (en δ_H 1.25) se observa una señal intensa correspondiente a los hidrógenos metilénicos asignables a 4'-13' de una cadena lipídica, y en δ_H 2.29 ($J = 7.5$ Hz) se observa una señal triple que integra para dos hidrógenos correspondiente al metileno de la posición α (2') del carbonilo del éster. La presencia del carbonilo del éster se confirma por la señal en δ_C 173.7. Así, la estructura de esta sustancia se define como palmitato de β -amirilo (**88**), y la comparación directa de las propiedades físicas y espectroscópicas obtenidas experimentalmente con las informadas en la literatura, permitieron la confirmación de la estructura [57, 58].

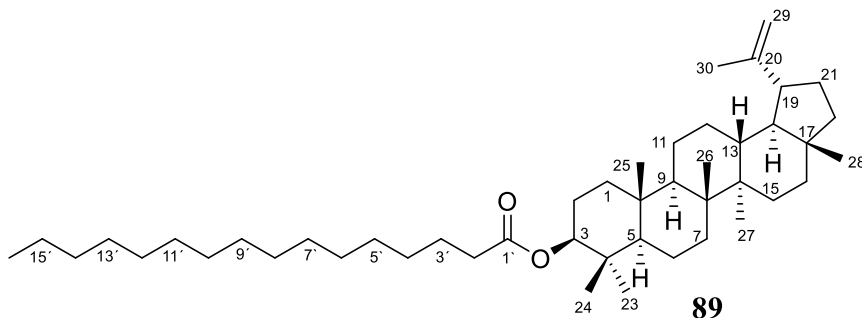


7.1.2. Palmitato de lupeólo (**89**)

En el EMIE se observa la presencia del ion molecular M^+ a m/z 664 que está en concordancia con la fórmula molecular $C_{46}H_{80}O_2$. El pico base a m/z 189 corresponde a la parte hidrocarbonada $[C_{14}H_{21}]^+$ que está conformada por la eliminación parcial del anillo C, del grupo isopropenilo y de los anillos D y E. El fragmento del ion correspondiente a m/z 409 $[M - C_{16}H_{32}O_2]^+$ corresponde a la pérdida completa de la cadena alifática.

En el espectro de RMN 1H (espectro 3) de la sustancia **89** es identificable también el perfil de un triterpeno (señales de metilos y metilenos a campo alto), como se mencionó para la sustancia **88**, y en el espectro de RMN ^{13}C (espectro 4) del compuesto **89** también se determinó la presencia de 46 señales. A través de la técnica DEPT se asignaron para 8 metilos, 24 metilenos, 6 metinos y 8 carbonos cuaternarios. En los espectros de RMN 1H y ^{13}C (espectros 3 y 4) se observan las señales características de un fragmento isopropenilo en la estructura (una señal doble en δ_H 4.67 ($J = 2.5$ Hz), un sistema doble de cuartetos en δ_H 4.55 ($J = 2.7, 1.5, 1.4, 1.4$ Hz), cada señal integra para un hidrógeno, los cuales están unidos a un carbono metilénico olefínico que aparece en δ_C 109.4, y el otro carbono olefínico es cuaternario y aparece en δ_C 150.9; la señal δ_H 1.66 corresponde al metilo vinílico unido al carbono vinílico cuaternario), lo cual es congruente

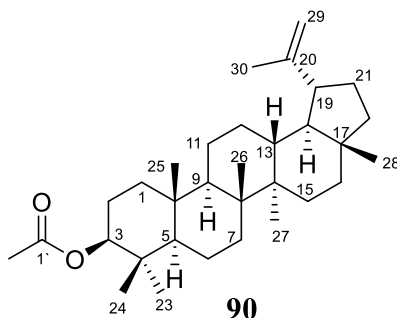
con los carbonos C-20, C-29 y C-30 del esqueleto del lupeol. Efectivamente, la señal en δ_H 4.45 (dd, $J = 9.2, 6.8$ Hz, 1H) corresponde al H-3 α , el cual integra para un metino carbinólico (δ_C 80.6). En δ_H 2.35 (ddd, $J = 11, 11, 5.7$ Hz) se observa la señal asignable a H-19. En δ_H 2.26 ($J = 7.5$ Hz) se observa una señal triple que integra para dos hidrógenos que corresponde a la posición 2' de la cadena alifática unida al grupo éster. La señal de δ_C 173.7 corresponde al carbonilo de un éster. A campo alto (en δ_H 1.25) se observa una señal intensa, típica de los metilenos de una cadena alifática de un ácido graso. Finalmente, en δ_H 1.66, 1.01, 0.92, 0.84, 0.82, 0.82, 0.77 se observan señales simples correspondientes a los metilos de la posición 30, 26, 27, 25, 23, 24 y 28, respectivamente. Este análisis permite concluir que esta estructura corresponde al palmitato de lupeólo (**89**), y la comparación directa de las características físicas y espectroscópicas obtenidas experimentalmente concuerdan con las informadas en la literatura [57, 59].



7.1.3. Acetato de lupeólo (**90**)

En el espectro de RMN 1H (espectro 5) de la sustancia **90** se observan las señales características del grupo isopropenilo descritas para la sustancia **89** (un doble a δ_H 4.69 ($J = 2.5$ Hz), un doble de dobles a δ_H 4.57 ($J = 2.7, 1.4$ Hz), una señal simple (3H) en δ_H 1.68), las cuales se asignan para H-29a, H-29b y H-30 del esqueleto de lupeol, respectivamente). En el espectro 6 se observan las señales δ_C 150.94 y δ_C 109.33 las cuales corresponden a carbonos olefínicos C-20 y C-29. En δ_H 4.47 se observa una señal múltiple que corresponde al hidrógeno del metino carbinólico de un éster, el cual está en correlación con la señal de carbono en δ_C 80.99. En δ_H 2.38 ($J = 11.0, 11.0, 5.7$ Hz) se observa un doble de doble de dobles correspondiente a H-19. En δ_H 2.04 se observa una señal intensa que integra para tres hidrógenos y se asigna para el metilo del grupo acetato (CH₃-2'). La presencia del carbonilo se confirma por la señal a δ_C 170.96. A campo alto del espectro de RMN 1H se observan señales simples en δ_H 1.68, 1.03, 0.94, 0.86, 0.85, 0.84 y

0.79, que corresponden a los metilos de las posiciones 30, 26, 27, 23, 24, 25 y 28, respectivamente. Por lo anterior, esta sustancia corresponde al acetato de lupeól (90), lo cual se confirma por comparación directa con muestras auténticas aisladas previamente en el laboratorio donde se desarrolló el trabajo de investigación, y con lo informado en la literatura [60, 61].

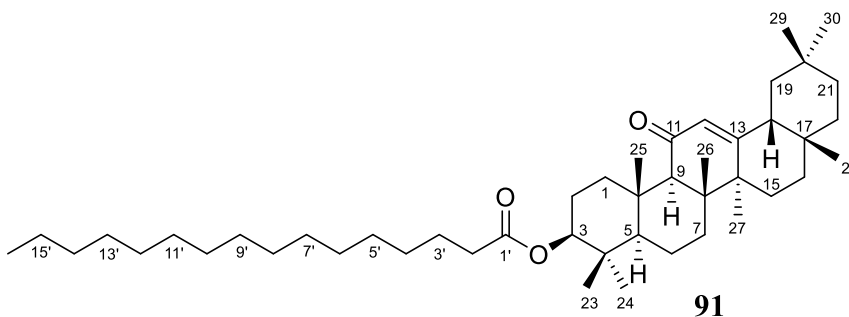


7.1.4. Palmitato de 11-oxo-β-amirilo (91)

En el EMIE se detectó la presencia del ion molecular M^+ a m/z 678 que pertenece para la fórmula molecular $C_{46}H_{78}O_3$. El pico base se observa a m/z 232 y corresponde a la estructura hidrocarbonada $[C_{16}H_{24}O]^+$, que está conformada por la pérdida parcial del anillo C y la pérdida completa de los anillos D y E. El fragmento del ion a m/z 273 $[C_{19}H_{29}O]^+$ corresponde a la pérdida completa de los anillos C, D y E de la estructura del triterpeno de la β-amirina. Por último, el fragmento del ion a m/z 423 corresponde a la pérdida completa de la cadena del ácido graso.

El perfil del espectro de RMN 1H de la sustancia **91** (espectro 7) mostró gran similitud con el espectro de la sustancia **88** (descrita con anterioridad), lo cual permite establecer la estructura básica del palmitato de β-amirilo. La diferencia más significativa es el desplazamiento a campo bajo del hidrógeno vinílico (H-12) en esta sustancia, el cual aparece en δ_H 5.58 (en el compuesto **88** se observó en δ_H 5.18). Esta observación, aunada al desplazamiento a campo bajo de los hidrógenos H-9 (δ_H 2.36) y H-18, permiten identificar la presencia de una cetona en C-11, lo cual se confirma por la presencia de la señal en δ_C 200.1 en el espectro de RMN ^{13}C (espectro 8). Efectivamente, las señales de RMN 1H en δ_H 4.52 ($J = 11.6, 4.8$ Hz) y δ_H 2.29 (2H) corresponden a H-3 α y a H-2'a, b, respectivamente, y la señal intensa en δ_H 1.25 corresponde a los hidrógenos metilénicos de la cadena alifática. Las señales de RMN 1H de los metilos se asignan como sigue: δ_H 1.36 (s, CH₃-26), δ_H 1.16 (s, CH₃-28), δ_H 1.13 (s, CH₃-25), δ_H 0.90 (s, CH₃-27), δ_H

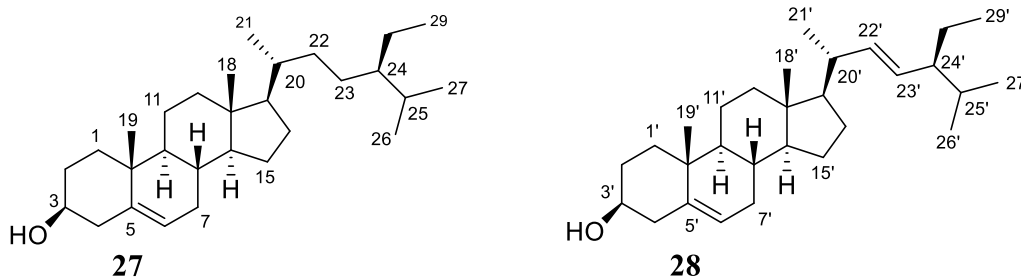
0.89 (s, CH₃-23), δ_{H} 0.88 (s, CH₃-24), δ_{H} 0.87 (s, CH₃-30), δ_{H} 0.86 (s, CH₃-29). La interpretación del espectro de RMN ¹³C (espectro 8) permite establecer la presencia de 46 carbonos, los cuales, mediante la técnica DEPT, se asignaron para 9 metilos, 23 metilenos, 5 metinos y 9 carbonos cuaternarios. La señal δ_{C} 61.7 (C-9) es de un metino que se encuentra en la posición alfa al carbonilo. La señal δ_{C} 80.3 (C-3) se asigna al carbono carbinólico y las señales a δ_{C} 200.1 (C-11), δ_{C} 128.1 (C-12) y δ_{C} 170.5 (C-13) son características de una cetona α,β -insaturada. Finalmente, en δ_{C} 173.6 (C-1') se observa una señal de carbonilo que pertenece a un grupo éster. Lo anteriormente descrito coincide con lo reportado en la literatura para el palmitato de 11-oxo- β -amirilo (**91**) [57, 58].



7.1.5. Mezcla de β -sitosterol (**27**) y estigmasterol (**28**)

El espectro de RMN ¹H de una de las muestras sólidas obtenidas del extracto de *Sapium nitidum* (espectro 9) (que se manifestó como una mancha homogénea por CCF), mostró las señales características de un esteroide, ya que a campo alto (δ_{H} 0.68 – 1.01) se observa la presencia de señales múltiples, no discernibles directamente a grupos metilo como el caso de los triterpenos pentacíclicos descritos. Se observa una señal múltiple en δ_{H} 3.53 correspondiente a un hidrógeno geminal a un grupo hidroxilo (H-3). En δ_{H} 5.35 (H-6) se distingue una señal doble ($J = 5.2$ Hz) característica del hidrógeno vinílico H-6. Estas asignaciones, así como las señales observadas en el espectro de RMN ¹³C (espectro 10) coinciden con las reportadas para la estructura del β -sitosterol (**27**). Sin embargo, en δ_{H} 5.16 ($J = 15.1, 8.4$ Hz) y en δ_{H} 5.02 ($J = 15.0, 8.4$ Hz) se observan dos dobles de dobles que corresponden a una olefina *trans*-disustituida, y los cuales corresponden al

H-22 y H-23 del estigmasterol (**28**). Por lo tanto, se concluyó que se trata de una mezcla de β -sitosterol (**27**) y estigmasterol (**28**) en una proporción de 4.3:1 [62, 63]. La comparación de los datos físicos y espectroscópicos obtenidos experimentalmente con los datos de muestras auténticas obtenidas en el laboratorio, permitió la confirmación de la estructura molecular de los constituyentes de esta muestra.



7.1.6. Cicloeucaleanol (**92**)

En el espectro de EMIE el ion molecular se observa a m/z 426 conforme a la fórmula molecular $C_{30}H_{50}O$. El pico a m/z 408 corresponde al fragmento del ion que se origina por la pérdida de una molécula de agua $[M-H_2O]$ y m/z 411 por la pérdida de un grupo metilo $[M-CH_3]^+$.

En el espectro de RMN 1H de la sustancia **92** (espectro 11) muestra una serie de señales a campo alto, donde se incluyen señales en δ_H 0.14 y δ_H 0.38 (un hidrógeno para cada señal, d, $J = 4$ Hz), estos valores de desplazamientos químicos, son característicos de hidrógenos geminales de ciclopropano. A campo bajo se observan dos señales en la zona de protones vinílicos (δ_H 4.71, s, y δ_H 4.66, d, $J = 1.4$ Hz) asignables a hidrógenos olefínicos geminales; además se observa la señal típica de un hidrógeno carbinólico en δ_H 3.21 (ddd, $J = 10.7, 9.1, 4.7$ Hz, H-3). Así, esta sustancia incluye en su estructura a un ciclopropano tetrasustituido (solo es observable un metileno), un doble enlace disustituido geminalmente, y un oxhidrilo consistente con un alcohol secundario. El análisis del espectro de RMN ^{13}C (espectro 12) establece la existencia de 30 carbonos, y mediante la técnica DEPT se determinó la presencia de 6 metilos, 12 metilenos, 7 metinos y 5 carbonos cuaternarios, lo cual permite establecer la fórmula molecular $C_{30}H_{50}O$. Esta fórmula permite considerar que la sustancia tiene 6 insaturaciones, de las cuales una corresponde al ciclopropano, y otra al doble enlace disustituido geminalmente, fragmentos deducidos anteriormente. Por lo tanto, se deduce la presencia de cuatro ciclos adicionales, presumiblemente de un esteroide. Son limitadas las estructuras de productos naturales que incluyen estas características y el análisis

Tabla 1. Desplazamientos químicos de RMN ^1H , RMN ^{13}C (CDCl_3) y algunas correlaciones del compuesto **93**

No	^{13}C	^1H	DEPT	HMBC	^{13}C [65]	^1H [65]
1	76.49	3.59(dd, 11.5, 4.6 Hz)	CH	C-25, C-9, C-2	76.5	3.60
2	32.15	1.86(ddd, 12.6, 4.5, 4.5 Hz) 1.77 (dd, 12.4, 12.0 Hz)	CH_2		32.2	1.91, 1.78
3	77.20	4.56(dd, 12.2, 4.5 Hz)	CH	C-23, C-24	77.4	4.57
4	37.83	-	C	C-23, C-24	44.1	-
5	52.26	0.74 (dd, 11.2, 2.4 Hz)	CH	C-23, C-24, C-25	52.3	0.90
6	17.65	1.62(ddd, 9.8, 5.3, 2.4 Hz) 1.54 (ddd, 13, 2.4, 2.4 Hz)	CH_2	-	17.7	1.71, 1.57
7	32.79	1.49, 1.45	CH_2	C-26	32.8	1.38
8	43.84	-	C	C-26, C-27	43.9	-
9	56.82	1.68(d, 7.7 Hz)	CH	C-8, C-11, C-25, C-26	56.9	2.00
10	44.05	-	C	C-25	37.9	-
11	66.99	4.31(dd, 7.9, 4.0 Hz)	CH	C-9, C-10, C-8	67.7	4.31
12	123.76	5.28 (d, 4.0 Hz)	CH	no	123.8	5.28
13	150.56	-	C	C-27	150.6	-
14	41.68	-	C	C-26, C-7	41.7	-
15	26.38	1.01, 0.98	CH_2	C-27	26.4	1.85, 1.03
16	36.91	1.46, 1.26	CH_2	C-28	26.7	1.99
17	32.18	-	C	C-28	32.2	-
18	46.34	2.01	CH	C-28	46.4	2.14
19	46.59	1.64; 1.05	CH_2	C-29, C-30	46.6	1.64, 1.10
20	31.09	-	C	C-19, C-29, C-30	31.2	-
21	34.60	1.34, 1.14	CH_2	C-29, C-30	34.7	1.11
22	26.65	0.90, 0.85	CH_2	C-28	37.0	1.47, 1.36
23	27.95	0.86, s	CH_3	C-5	28.0	0.84
24	16.24	0.87, s	CH_3	C-23, C-5	16.3	0.86
25	13.09	1.08, s	CH_3	C-1, C-5, C-9, C-10	13.2	1.21
26	18.04	0.99, s	CH_3	C-9	18.1	1.08
27	26.23	1.22, s	CH_3	-	26.3	0.99
28	28.46	0.84, s	CH_3	-	28.9	1.26
29	33.23	0.89, s	CH_3	C-30, C-19	33.3	0.83
30	23.61	0.89, s	CH_3	C-29	23.7	0.89
1'	173.50	-	C=O	C-2'	173.6	-
2'	34.79	2.30 (t, 7.5 Hz)	CH_2	C-1', C-3'	34.9	2.31
3'	25.18	1.63	CH_2	-	25.2	1.63

4'	29.69	1.27	CH ₂	-		
5'	29.69	1.27	CH ₂	-		
6'	29.67	1.27	CH ₂	-		
7'	29.66	1.27	CH ₂	-		
8'	29.64	1.27	CH ₂	-		
9'	29.60	1.27	CH ₂	-		
10'	29.46	1.27	CH ₂	-		
11'	29.36	1.27	CH ₂	-		
12'	29.27	1.27	CH ₂	-		
13'	29.17	1.27	CH ₂	-		
14'	31.92	1.26	CH ₂	C-15'	32.0	1.30
15'	22.69	1.29	CH ₂	C-16'	22.8	1.30
16'	14.11	0.88	CH ₃	C-15'	14.2	0.87

confirma la presencia del éster y las señales centradas en δ_C 150.56 y δ_C 123.76 se asignan al doble enlace C(12)-C(13) del triterpeno pentacíclico derivado de la β -amirina. Las señales que aparecen en δ_C 77.20, δ_C 76.49 y δ_C 66.99 confirman la presencia de tres oximetinos. A campo alto del espectro de RMN ^{13}C (espectro 14) se aprecian 40 señales, que corresponden a metilos, metilenos, metinos y carbonos no protonados. El análisis del experimento DEPT-135 (espectro 15) y DEPT-90 (espectro 16) da como resultado la asignación de 9 metilos, 22 metilenos y 7 metinos, por lo que se deduce que los 8 carbonos restantes son carbonos cuaternarios, lo cual confirma la presencia de un triterpeno esterificado con ácido palmítico. La tabla 1 muestra los desplazamientos químicos de RMN 1H y ^{13}C , algunas correlaciones HMBC y la comparación de los datos experimentales con los informados por Wang [65], los cuales se discutirán más adelante.

En el espectro del experimento COSY de la substancia **93** (Espectro 17) se observan correlaciones entre los protones H-12 (δ_H 5.28) con H-11 (δ_H 4.32); de H-3 (δ_H 4.56) con H-2 α (δ_H 1.86), y de H-11 (δ_H 4.32) con H-9 (δ_H 1.68), como se representan en la figura 2.

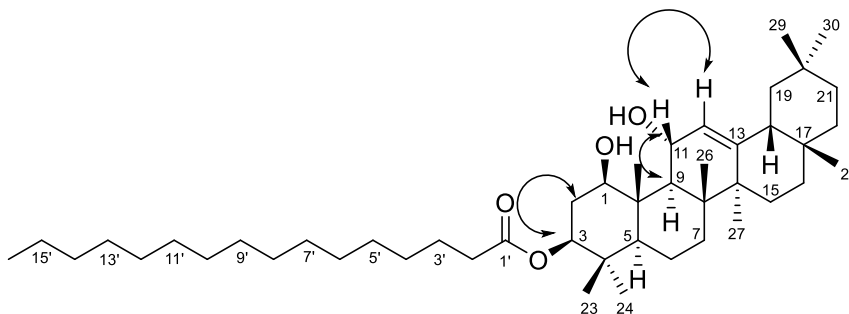


Figura 2. Representación de algunas correlaciones COSY de **93**

Al analizar el espectro NOESY de la sustancia **93** (espectro 18) se observa la correlación de la señal δ_H 5.28 (correspondiente a H-12) con las señales centradas en δ_H 2.01 (H-18) y con δ_H 4.31 (H-11), confirmando la presencia del alcohol secundario en C-11. Además, se observa la correlación entre la señal en δ_H 4.31 (H-11) con la señal en δ_H 1.08 (CH₃-25), lo que determina que H-11 debe estar en posición beta, por lo tanto, el grupo hidroxilo se encuentra en orientación alfa. Las correlaciones señaladas se representan en una estructura tridimensional de la parte triterpénica de **93**.

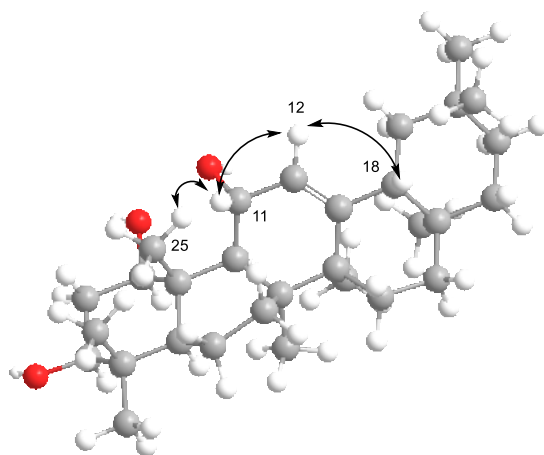


Figura 3. Representación de algunas correlaciones NOESY de **93**

El análisis del espectro HSQC (espectro 19) permite realizar las asignaciones de los carbonos e hidrógenos. Así, se observan las correlaciones entre δ_C 123.76 con δ_H 5.28, δ_C 77.20 con δ_H 4.56, δ_C 76.49 con δ_H 3.60, δ_C 66.99 con δ_H 4.32, δ_C 56.82 con δ_H 1.68 y δ_C 52.26 con δ_H 0.73. En el espectro 19 no se observa la correlación de carbono con la señal δ_H 0.843.

Al analizar el espectro HMBC (espectro 20) se establece la correlación entre δ_C 28.46 con δ_H 0.992 y δ_H 0.682, pero estas dos señales de protón no corresponden a señales asignables al compuesto. Al medir la distancia entre las dos señales de protón, el centro coincide con la señal δ_H 0.843, y se concluye que δ_C 28.46 (C-28) correlaciona con δ_H 0.843 (CH₃-28). Esta particularidad es observable en el espectro de HMBC debido a la presencia de bandas satélites. En el espectro 20 se confirmó la correlación δ_C 13.09 (C-25) con δ_H 1.084 (CH₃-25) y también se observa una correlación entre δ_C 13.09 con δ_H 1.685 (C-9). Adicionalmente, se identifican 6 bandas satélites para los carbonos δ_C 14.11 (CH₃-16), δ_C 18.04 (C-26), δ_C 23.61 (C-30), δ_C 26.23 (C-27), δ_C 27.95

(C-23) y δ_C 33.23 (C-29). En la figura 4 se representan las correlaciones HMBC más representativas del compuesto **93**.

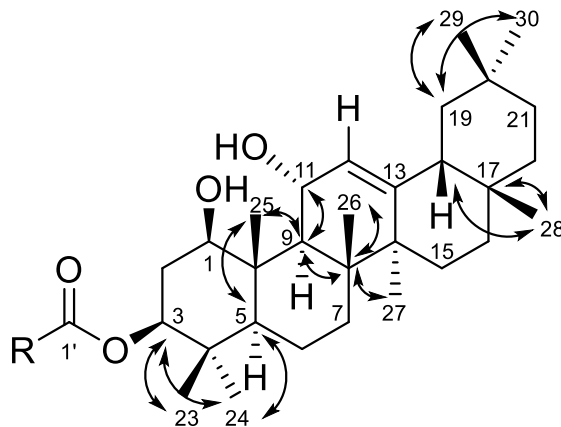
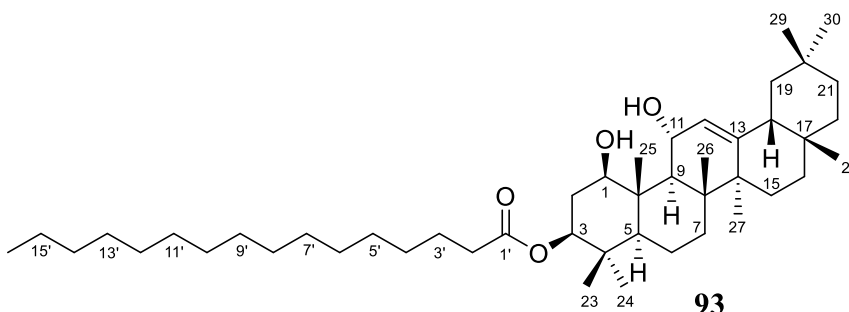


Figura 4. Representación de algunas correlaciones HMBC de **93**

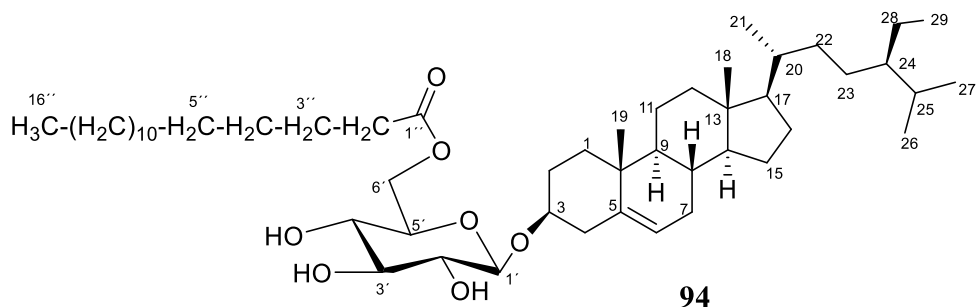
Wang (2008) [65] reportó el 3 β -palmitoiloxi-1 β ,11 β -dihidroxi-olean-12-eno, como un nuevo éster triterpénico, el cual fue aislado de *Celastrus rosthornianus*. Para este compuesto se reporta δ_C 67.7 (C-11), δ_H 4.31 (1H, dd, $J = 3.0, 8.0$ Hz, H-11) y la orientación del grupo hidroxilo en C-11 del esqueleto del oleanano como axial- β . En el caso del compuesto **93** se encontró δ_C 67.0 (C-11) y δ_H 4.31 (1H, dd, $J = 4.0, 7.9$ Hz, H-11), por lo tanto, estos valores son similares. La publicación de Wang no discute la elucidación estructural (solo enlista los datos espectroscópicos), sin embargo, afirma que la hidrólisis de su muestra proporciona un triol (indica que se trata del 1 β ,3 β ,11 β -trihidroxi-olean-12-eno), y remite a dos referencias [58, 66]. Sin embargo, ninguna de éstas corresponde a la sustancia mencionada por Wang, por lo que su propuesta carece de sustento. De acuerdo al análisis realizado por Cáceres-Castillo y col. (2008) [67] sobre las estructuras de oleananos y ursanos con un grupo hidroxilo alílico en C-11, aisladas de diferentes especies, se ha propuesto que la posición ecuatorial 11 α es la más accesible (menos impedida), y que el valor de la $J_{H9_{ax}-H11_{ax}}$ (*trans*-diaxial) es relativamente grande (su magnitud oscila entre 8 a 11 Hz). Para los compuestos que poseen en posición- β el grupo hidroxilo alílico se han reportado valores de δ_C 81.7 [57, 68]. Por lo mencionado anteriormente, y al no observarse una correlación NOESY entre H-11 y H-9 (figura 3), se concluye que el compuesto **93** representa un nuevo éster triterpénico (es decir, no informado en la literatura química). Por otro lado, el

análisis realizado, permite concluir que la estructura informada por Wang [65] puede corregirse a la estructura **93**. Ciertas asignaciones reportadas por este autor, particularmente C-4, C-10, C-16, C-22 y H-9 requieren ser corregidas.



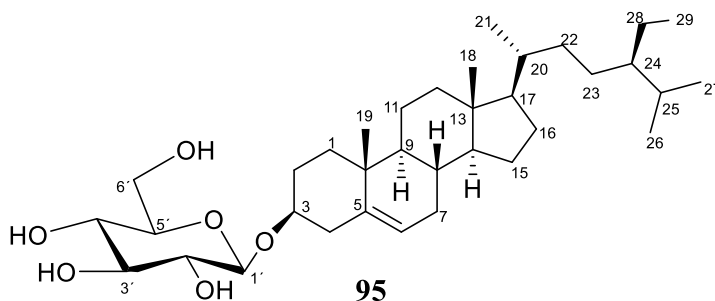
7.1.8. 6'-Palmitoil- β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo (**94**)

El espectro de RMN ^1H (espectro 21) de la sustancia **94** muestra señales que incluyen el perfil característico de un fitoesterol, de una cadena lipídica, y de señales adicionales de oximetinos (asignables a una glucosa). Efectivamente, se observa una señal doble de doble ($J = 3.6, 1.8 \text{ Hz}$) para un hidrógeno, centrada en $\delta_{\text{H}} 5.36$, característica del protón vinílico H-6 de un esterol. De acuerdo con esta asignación, se observan señales de multiplicidad variable entre $\delta_{\text{H}} 0.68$ a $\delta_{\text{H}} 1.00$, correspondientes a metilos. Otras señales localizables en $\delta_{\text{H}} 4.42$ (dd, $J = 12.0, 5.4 \text{ Hz}$, H-6'a), $\delta_{\text{H}} 4.38$ ($J = 7.7 \text{ Hz}$, H-1'), $\delta_{\text{H}} 4.29$ ($J = 12.0, 2.2 \text{ Hz}$, H-6'b) y entre $\delta_{\text{H}} 3.58$ y $\delta_{\text{H}} 3.34$, son atribuibles a hidrógenos geminales a un hidroximetileno y a varios hidroximetinos, los cual corresponden a un fragmento de β -D-glucopiranososa presente en la estructura. En el espectro de RMN ^{13}C de la sustancia **94** (espectro 22) se observa la señal centrada en $\delta_{\text{C}} 101.4$, la cual es característica de un carbono anomérico, las señales en $\delta_{\text{C}} 140.1$ y $\delta_{\text{C}} 122.3$ pertenecen a los carbonos olefínicos, y la señal centrada en $\delta_{\text{C}} 174.7$ corresponde al carbonilo del éster. Estas señales permiten establecer que esta sustancia corresponde al 6'-palmitoil- β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo (**94**), y la comparación directa de los datos físicos y espectroscópicos obtenidos experimentalmente con las informadas en la literatura permiten confirmar la identidad de esta sustancia [69].



7.1.9. β -D-Glucopiranósido de β -sitosterilo (**95**)

El espectro de RMN ^1H (espectro 23) de la sustancia **95** muestra señales de metilos entre δ_{H} 0.68 y δ_{H} 1.01, que, como se mencionó con anterioridad, son señales características de un fitoesterol. La señal doble en δ_{H} 5.37 corresponde al hidrógeno vinílico H-6. También se pueden observar una serie de señales de hidrógenos geminales a hidroxilo (δ_{H} 4.02 – 5.01), lo cual sugiere la presencia de un β -D-glucopiranósido. En δ_{H} 5.01 aparece el hidrógeno anomérico (H-1'), el cual tiene un desplazamiento característico a campo bajo. En δ_{H} 4.61 y 4.45 se identifican dos sistemas dobles de dobles que pertenecen a los hidrógenos metilénicos H-6'b y H-6'a, respectivamente. En el espectro de RMN ^{13}C de esta sustancia (espectro 24) se observa la señal en δ_{C} 103.1 del carbono anomérico, y las señales en δ_{C} 141.4 y δ_{C} 122.4 corresponden a los carbonos olefínicos. Los datos descritos coinciden con los informados en la literatura para β -D-glucopiranósido de β -sitosterilo **95** [70], y la comparación directa con una muestra auténtica disponible en el laboratorio donde se desarrolló el trabajo, confirmó la identidad de esta sustancia.

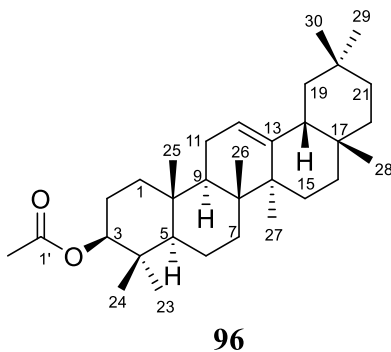


El fraccionamiento del extracto de CH_2Cl_2 -metanol (1:1) de las ramas de *S. nitidum*, permitió identificar la presencia de palmitato de β -amirilo (**88**), palmitato de lupeól (b) (**89**), acetato de lupeól (b) (**90**), palmitato de 11-oxo- β -amirilo (**91**), β -sitosterol (**27**), estigmasterol (**28**), cicloeucalenol (**92**), acetato de β -amirilo (**96**), 19 β H-lupeol (**37**), β -amirina (**97**). 6'-palmitoil- β -D-

glucopiranosido de β -sitosterilo (**94**) y β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo (**95**). A continuación, se describe sucintamente el análisis estructural de las sustancias **37**, **96** y **97**.

7.1.10. Acetato de β -amirilo (**96**)

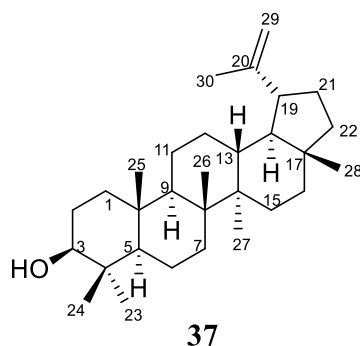
En el espectro de RMN ^1H (espectro 25) de la sustancia **96** se observa una señal doble de dobles correspondiente a un metino en δ_{H} 5.18 ($J = 3.6, 3.6$ Hz), el cual integra para un hidrógeno vinílico H-12, lo que está en concordancia con las señales a δ_{C} 121.6 (CH-12) y δ_{C} 145.2 (C-13) del espectro de RMN ^{13}C (espectro 26), los cuales son olefínicos. En δ_{H} 4.50 ($J = 8.3, 7.3$ Hz) se observa un doble de dobles que se asigna al H-3 α de un metino con un grupo éster geminal, el cual corresponde al carbono carbinólico en δ_{C} 80.9. Además, en la zona de δ_{H} 1.13 a 0.83, se observan las señales de ocho grupos metilo, lo que sugiere la presencia de un esqueleto de oleanano. En δ_{H} 2.05 se observa una señal simple e intensa, la cual integra para tres hidrógenos y se asigna a un grupo metilo de acetato, el cual se confirma con la señal en δ_{C} 171.0. La comparación directa de los datos físicos y espectroscópicos obtenidos experimentalmente con las informadas en la literatura permiten confirmar la identidad de esta sustancia para el acetato de β -amirilo (**96**) [60, 71-72].



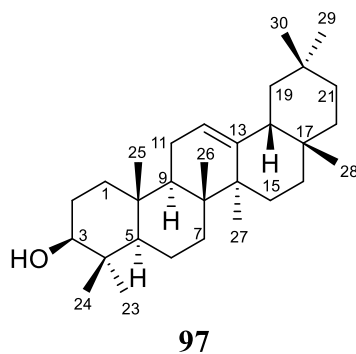
7.1.11. Mezcla de $19\beta\text{H}$ -lupeol (**37**) y β -amirina (**97**)

El espectro de RMN ^1H de la sustancia **37** (espectro 27) muestra señales características de un triterpeno pentacíclico, en particular, al del acetato de lupeño (**90**), que fue descrito con anterioridad. Así, se identifica directamente al fragmento de isopropenilo por las señales centradas en δ_{H} 4.69 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H) y en δ_{H} 4.57 (dd, $J = 2.6, 1.4$ Hz, 1H), que se les asigna para el grupo metileno vinílico (H-29) del lupeol. En δ_{H} 3.19 (dd, $J = 11.0$ y 5.2 Hz, 1H) se observa la señal del oximetino H-3 α . En δ_{H} 2.38 se identifica la señal de H-19 (ddd $J = 10.9, 10.8, 5.5$ Hz,

1H). A δ_H 1.68 se observa una señal simple que integra para 3H, el cual pertenece a CH₃-30. La comparación de los datos informados en la literatura permite llevar a cabo las asignaciones para los metilos, las cuales son las siguientes: δ_H 1.03 (3H, s, CH₃-26), δ_H 0.97 (3H, s, CH₃-23), δ_H 0.94 (3H, s, CH₃-27), δ_H 0.83 (3H, s, CH₃-25), δ_H 0.79 (3H, s, CH₃-28), δ_H 0.76 (3H, s, CH₃-24) y finalmente un doble a δ_H 0.68 (1H, $J = 8.6$ Hz, H-5). El análisis del espectro de RMN ¹³C (espectro 28) de la sustancia **37** confirma las asignaciones para las señales en δ_C 151.0 (C-20), δ_C 109.3 (C-29) y δ_C 79.0 (C-3). La comparación directa de los datos experimentales obtenidos con los informados en la literatura [73] corroboró que esta sustancia se trata de 19 β H-lupeol (**37**).



La conclusión del análisis estructural de **37**, permitió la identificación de una sustancia adicional minoritaria mediante la identificación de señales adicionales en el espectro de RMN ¹H. Efectivamente, en este espectro (espectro 27) se presenta una señal adicional en δ_H 5.18 (1H, t, $J = 3.6$ Hz) asignable a H-12 de la sustancia minoritaria (presumiblemente también un triterpeno pentacíclico). Lo anterior se comprueba mediante el análisis del espectro de RMN ¹³C (espectro 28), donde se observan señales en δ_C 145.2 y δ_C 121.7, asignables a C-13 y C-12, respectivamente. La comparación detallada de estas señales adicionales con las informadas en la literatura para β -amirina (**97**), así como la comparación mediante cromatografía en capa fina con una muestra auténtica disponible en el laboratorio, condujo a la conclusión de la identidad de esta sustancia. Así, la mezcla **37-97** se encuentra en proporción 9:1 [71, 72].



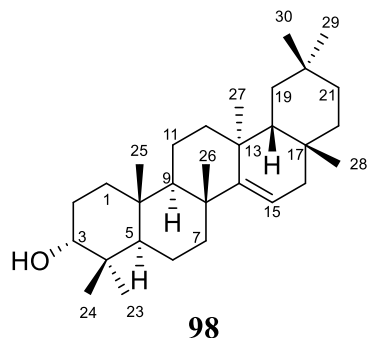
7.2. Estudio químico del extracto de *Sebastiania longicuspis*

Se separaron las diferentes partes aéreas de la planta, obteniéndose de material seco hojas (1290 g) y ramas gruesas (2460 g). Se prepararon los extractos de CH₂Cl₂-metanol (1:1) de los dos tipos del material vegetal, obteniéndose 200 y 40 g de extracto, respectivamente. Mediante cromatografía en columna se realizó el fraccionamiento primario del extracto de las hojas *S. longicuspis*. Mediante el análisis espectroscópico de los productos aislados y purificados se estableció la presencia de 3-*epi*-taraxerol (**98**), taraxerol (**43**), β-sitosterol (**27**) y ácido lignocérico (C₂₄H₄₈O₂), como se describe a continuación.

7.2.1. 3-*epi*-Taraxerol (**98**)

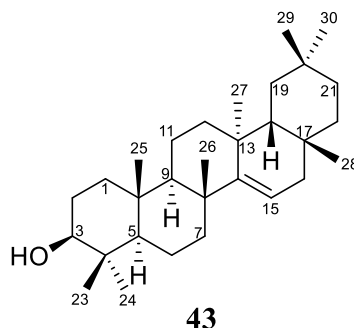
El análisis del espectro de RMN ¹H de la sustancia **98** (espectro 29) establece la presencia de un protón vinílico en δ_H 5.52 (dd, *J* = 8.1, 3.4 Hz), el cual es asignable a H-15 de un triterpeno pentacíclico (ver más adelante). En δ_H 3.40 se observa un doble de doble (*J* = 2.6, 2.6 Hz,) asignable al protón oximetino H-3 que se encuentra en posición-β ecuatorial. A campo alto aparecen señales simples características de los protones de metilos en δ_H 1.09, δ_H 0.95, δ_H 0.94, δ_H 0.91, δ_H 0.86 y δ_H 0.82. El análisis de los espectros de RMN ¹³C (espectro 30), DEPT 90 y DEPT 135, estableció la presencia de 10 metilenos, cinco metinos y siete carbonos cuaternarios, lo cual, aunado a los datos de RMN ¹H, definen la fórmula molecular C₃₀H₅₀O para el compuesto, correspondiente a un triterpeno pentacíclico que incorpora un doble enlace trisustituido en su estructura. En el espectro de RMN ¹³C (espectro 30) se evidencian las señales para los carbonos olefínicos (en δ_C 158.16 (C-14) y en δ_C 116.74 (C-15)), y en δ_C 76.24 es manifiesta la señal para el carbono unido al oxígeno, correspondiente a C-3. Las señales en δ_C 33.4 (C-29), δ_C 29.9 (C-30), δ_C 29.8 (C-28), δ_C 28.2 (C-23), δ_C 26.1 (C-26), δ_C 22.2 (C-24), δ_C 21.3 (C-27) y δ_C 15.2 (C-

25) fueron definidas para los metilos. La comparación de los datos experimentales con los informados en la literatura [74] confirma que la estructura de esta substancia corresponde al 3-*epi*-taraxerol (**98**).



7.2.2. Taraxerol (**43**)

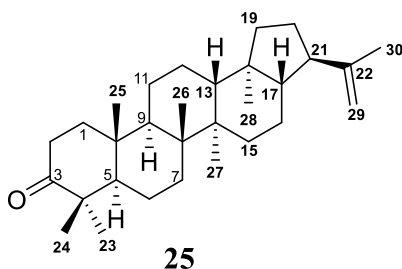
El perfil del espectro de RMN ^1H de la substancia **43** (espectro 31) indica señales características de un triterpeno pentacíclico, muy similares a las recién descritas para el 3-*epi*-taraxerol (**98**). En particular, la presencia del protón vinílico en δ_{H} 5.53 (dd, $J = 8.2, 3.2$ Hz, H-15) y otra para un protón oximetino a δ_{H} 3.20 (dd, $J = 10.7, 4.9$ Hz, H-3), el cual que difiere del compuesto **98** en las constantes de acoplamiento y en su desplazamiento químico, por lo tanto, se establece que H-3 se encuentra en posición- α axial (de acuerdo a la constante de acoplamiento trans-diaxial observada). También se establece la presencia de ocho señales simples a δ_{H} 1.09 (H-26), δ_{H} 0.98 (H-23), δ_{H} 0.95 (H-29), δ_{H} 0.93 (H-25), δ_{H} 0.91 (H-27), δ_{H} 0.90 (H-30), δ_{H} 0.82 (H-28) y δ_{H} 0.80 (H-24), los cuales corresponden a la presencia de grupos metilos de la estructura. Efectivamente, las señales en el espectro de RMN ^{13}C (espectro 32), aunado a la información derivada de los espectros en la modalidad DEPT, se identificaron los ocho carbonos de metilos, diez carbonos de metilenos, tres carbonos de metinos, y seis carbonos cuaternarios, por lo que se establece que la fórmula molecular es $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$. Mediante las señales del espectro RMN ^{13}C (espectro 32) se confirma la presencia de carbonos olefínicos en δ_{C} 158.1 (C-14) y δ_{C} 116.9 (C-15), y en δ_{C} 79.1 se observa la señal de C-3, la cual difiere claramente del desplazamiento químico del 3-*epi*-taraxerol (**98**) (donde este carbono resuena en δ_{C} 76.24). Por lo tanto, la substancia bajo discusión corresponde al taraxerol (**43**), lo cual se confirma mediante la comparación de los datos experimentales obtenidos con los informados en la literatura [75].



Mediante cromatografía en columna se realizó el fraccionamiento primario del extracto de CH₂Cl₂-metanol (1:1) de las ramas (gruesas) de *S. longicuspis*. El análisis espectroscópico de los productos aislados y purificados, permitió identificar la presencia de 3-oxo-21 α H-hop-22(29)-eno (moretenona, **25**), ácido 3-acetilaleuritólico (**62**), *ent*-kauran-3-oxo-16 α ,17-diol (**99**), y 19 β H-lupeol (**37**). A continuación, se describen las evidencias espectroscópicas que permitieron deducir las estructuras **25**, **62** y **99**.

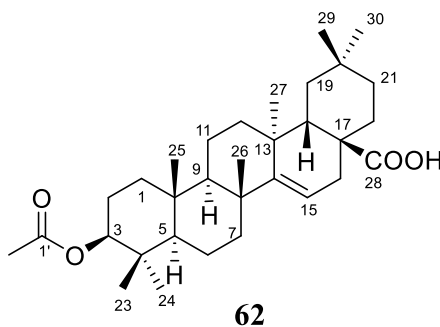
7.2.3. 3-Oxo-21 α H-hop-22(29)-eno (Moretenona, **25**)

El perfil del espectro RMN ¹H de la sustancia **25** (espectro 33) indica que se trata de una sustancia triterpénica pentacíclica análoga estructuralmente a las descritas, pero a la vez, con diferencias significativas. Puede identificarse la presencia de un isopropenilo como un fragmento estructural, por las señales en RMN ¹H en δ_H 4.70 (1H, dc, $J = 2.4, 1.4$ Hz), en δ_H 4.68 (1H, dd, $J = 2.4, 0.8$ Hz), y en δ_H 1.68 (dd, $J = 1.5, 0.8$ Hz), las cuales corresponden al metileno y metilo vinílicos, respectivamente. Por otra parte, las señales del espectro 33 centradas en δ_H 1.08 (s), δ_H 1.03 (s), δ_H 0.95 (d, $J = 0.9$ Hz), δ_H 0.94 (d, $J = 0.9$ Hz) y δ_H 0.69 (d, $J = 1.1$ Hz), se asignan a grupos metilos. De acuerdo a las deducciones anteriores, mediante el análisis del espectro de RMN ¹³C (espectro 34) se infiere la presencia de 30 carbonos. En δ_C 218.1 se observa una señal asignable al carbonilo de una cetona, presumiblemente ubicada en C-3. Las señales de los carbonos olefínicos aparecen a δ_H 148.11 (C-22) y δ_H 109.49 (C-29). Al comparar los desplazamientos químicos con los reportados en la literatura con el 3-oxo-21 β H-hop-22(29)-eno, se encontraron diferencias sustanciales en los carbonos de las posiciones 7, 16, 17, 19 y 21, por lo que se concluyó que el compuesto aislado corresponde al 3-oxo-21 α H-hop-22(29)-eno (moretenona, **25**), el cual ya ha sido informado en la literatura [76, 77], y la identidad de las propiedades físicas y espectroscópicas confirmó su estructura.



7.2.4. Ácido 3-acetilauritólico (**62**)

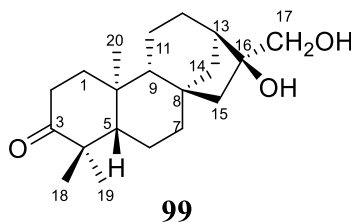
En el espectro de RMN ^1H de la sustancia **26** (espectro 35) se observaron señales características de un hidrógeno vinílico (δ_{H} 5.52, 1H, dd, $J = 8.0, 3.5$ Hz) y de un hidrógeno carbinólico (δ_{H} 4.46, 1H, dd, $J = 10.5, 5.5$ Hz). La señal simple en δ_{H} 2.04 proporciona evidencia de un grupo metilo de acetato, y la presencia de siete señales simples son consistentes con un esqueleto triterpénico de tipo taraxano, donde uno de los metilos se ha oxidado a ácido carboxílico. Esta presunción es consistente con los resultados del análisis del espectro de RMN ^{13}C (espectro 36) de esta sustancia. Este espectro mostró 32 señales, las cuales fueron asignadas (mediante el experimento DEPT) a ocho metilos, once metilenos sp^3 , cinco metinos (cuatro sp^3 y uno a δ_{C} 116.8 del carbono vinílico) y ocho carbonos cuaternarios (uno corresponde a δ_{C} 183.5 de un grupo carbonilo de ácido carboxílico, otro a δ_{C} 170.9 de un carbonilo de acetato, y otro a δ_{C} 160.6 de carbono olefínico). Al comparar las asignaciones con los datos reportados de la literatura [78] se establece que se trata del ácido 3-acetilauritólico (**62**). La comparación directa de esta sustancia con una muestra auténtica disponible en el laboratorio, confirmó la identidad de esta sustancia.



7.2.5. 16 β ,17-Dihidroxi-*ent*-kauran-3-ona (**99**)

El perfil del espectro de RMN ^1H de la sustancia **99** (espectro 37) contrasta significativamente con los descritos hasta el momento, ya que se observa un número menor de señales a campo alto con respecto a los espectros de los triterpenos pentacíclicos o los fitoesteroles reseñados. En el espectro 37 se observan dos señales dobles centradas en δ_{H} 3.49 (1H, d, $J = 10.8$ Hz) y en δ_{H} 3.41 (1H, d, $J = 10.8$ Hz), que de acuerdo a su constante de acoplamiento y a su desplazamiento químico, se establece que corresponden a los hidrógenos geminales de un hidroximetileno unido a un carbono cuaternario. En δ_{H} 2.48 se observa una señal doble de dobles que integra para dos protones ($J = 8.6, 6.3$ Hz), la cual es asignable (por su desplazamiento químico y por su multiplicidad) a un metileno alfa a un grupo carbonilo. A campo alto se observan tres señales simples que integran para tres hidrógenos en δ_{H} 1.09, δ_{H} 1.08, δ_{H} 1.03, correspondientes a tres metilos en la estructura de esta sustancia.

El análisis del espectro de RMN ^{13}C (espectro 38) permitió establecer la presencia de 20 carbonos, por lo que deduce que la estructura es un diterpeno. En el espectro 38 se observa una señal a δ_{C} 218.2 que se asigna a un carbonilo de cetona. Se observan señales de carbonos unidos a oxígeno (δ_{C} 79.7 y δ_{C} 69.8), correspondientes a un carbono cuaternario y a un metileno, que pueden asignarse, tentativamente, a C-16 y C-17, respectivamente, de un diterpeno con esqueleto de kaurano o de *ent*-kaurano. Esta presunción está de acuerdo al análisis del espectro DEPT, el cual establece la presencia tres metilos, nueve metilenos, tres metinos y cinco carbonos cuaternarios, lo cual define la fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_3$. Esta fórmula es correcta para un diterpeno tetracíclico que incorpora a un grupo carbonilo en su estructura. Así se explican los cinco grados de insaturación de la estructura. La revisión en la literatura confirma lo anterior, por lo que se establece que el carbonilo se encuentra en C-3 y el diol vecinal se ubica en C-16 y C-17, con la orientación indicada en la fórmula **99**. La comparación de las propiedades físicas y espectroscópicas de esta sustancia con las informadas por Ding y Jia [79], y comentadas por Agrawal [80], confirman la estructura de esta sustancia.

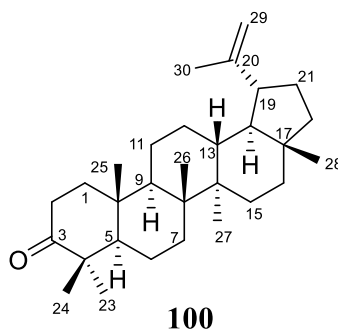


7.3. Estudio químico del extracto de *Sapium macrocarpum*

Del extracto de CH₂Cl₂-metanol (1:1) de las partes aéreas de *S. macrocarpum* se aislaron, purificaron y caracterizaron estructuralmente los siguientes compuestos: lupenona (**100**), sitostenona (**101**), tonantzitlolona A (**38**), 19 β H-lupeol (**37**), β -sitosterol (**27**), estigmasterol (**28**) y β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo (**95**). La discusión estructural de los compuestos **27**, **28**, **37** y **95** se realizó con anterioridad (ver páginas 34, 42, 43). A continuación, se describen las evidencias espectroscópicas que permitieron la determinación estructural de las sustancias **38**, **100** y **101**.

7.3.1. Lupenona (**100**)

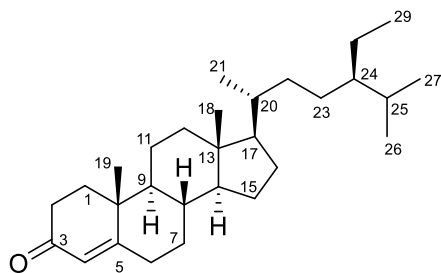
En las fracciones menos polares de la cromatografía del extracto de CH₂Cl₂-metanol permitió la obtención de un compuesto puro cuyo espectro de RMN ¹³C (espectro 39) muestra 30 señales. Entre estas se incluye una de un carbonilo de cetona (δ_C 217.9) y los desplazamientos químicos observados en RMN ¹H (espectro 40) y ¹³C son similares con respecto al lupeol (**37**, descrito con anterioridad, ver página 43), pero no muestran la señal del oximetino correspondiente en C-3 (δ_C 79.02). El espectro de masas adquirido por IE mostró un ion molecular m/z 408 que está en concordancia con la fórmula molecular C₃₀H₄₈O, y los datos de RMN ¹H (espectro 40) fueron idénticos con los reportados para lupenona (**100**), lo que confirma su estructura [81].



7.3.2. Sitostenona (**101**)

Los espectros de RMN de ¹H y ¹³C del producto natural **101** indicaron la presencia de dos metilos unidos a carbonos terciarios, tres metilos unidos a carbonos secundarios y un metilo unido a un carbono primario, característicos de los fitoesteroles. El análisis de datos de RMN ¹H (espectro 41) y de RMN ¹³C (espectro 42), así como el análisis del espectro DEPT establecieron la fórmula molecular de C₂₉H₄₈O, y se deduce la presencia de un grupo carbonilo cetónico

(evidenciado por la señal de RMN ^{13}C δ_{C} 199.85). La similitud de los espectros con los de β -sitosterol sugirió que esta sustancia correspondería a la sitostenona (**101**). Efectivamente, la comparación de los datos físicos y espectroscópicos con los informados en la literatura [82, 83] permitió confirmar su identidad.



101

7.3.3. Tonantzitlolona A (**38**)

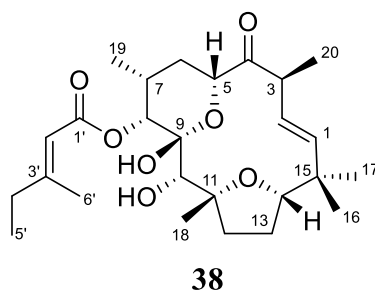
La fórmula molecular de **38**, $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{O}_7$, se estableció a partir del análisis de los datos espectroscópicos de RMN ^1H (espectro 43), ^{13}C (espectro 44), y la difracción de rayos X. El espectro de RMN ^{13}C (Tabla 2) mostró 26 carbonos, los cuales fueron asignados, mediante el análisis del espectro DEPT (espectros 45, 46), a siete grupos metilo (tres terciarios, dos secundarios, uno primario y uno vinílico), cuatro metilenos, nueve metinos (cuatro unidos al oxígeno, tres olefínicos y dos alifáticos), y seis carbonos no protonados (dos carbonilos, uno olefínico, uno alifático, uno ligado al oxígeno y uno unido a dos oxígenos). La presencia de un fragmento de metil-senecioato (*Z*-3-metil-2-pentenoato; $\text{C}_6\text{H}_9\text{O}_2$; (*Z*)-Et(Me)C=CH-COO-) se estableció mediante el análisis de las señales de RMN ^1H (espectro 43) y ^{13}C (espectro 44) asignadas (por análisis HMBC, espectro 50) a un carbonilo éster (δ_{C} 166.58) unido a un metino olefínico (δ_{C} 113.86, δ_{H} 5.69) de un doble enlace trisustituido (δ_{C} 162.97), siendo un etilo (δ_{C} 33.88, δ_{H} 2.17; δ_{C} 11.83, δ_{H} 1.07) y un grupo metilo (δ_{C} 18.99, δ_{H} 2.16) los otros sustituyentes. Por lo tanto, se deduce que este compuesto es un diterpeno con cinco grados de insaturación, unido a un fragmento senecioato. La presencia de un fragmento de una cetona- α -metil- β,γ -insaturada se dedujo por las señales de RMN ^1H y ^{13}C de una cetona (δ_{C} 211.30), unida a un metino (δ_{H} 3.34, de acuerdo con la correlación HMBC) y el metino enlazado a un grupo metilo (δ_{C} 16.00, δ_{H} 1.12) y a un doble enlace *trans*-disustituido (δ_{C} 126.81, δ_{H} 5.24; δ_{C} 140.07, δ_{H} 5.86). Además, las señales restantes de RMN ^1H y ^{13}C , particularmente la de dos metilenos alifáticos, tres oximetinos y un carbono hemicetálico, fueron consistentes con la presencia de un δ -lactol y

Tabla 2. Desplazamientos químicos de RMN ¹H, RMN ¹³C (CDCl₃) y algunas correlaciones del compuesto **38**

Posición	δ_H , m 400 MHz	J (Hz)	δ_C 100 MHz	NOESY	HMBC (H → C)
1	5.860, d	$J_{1,2}$ 15.2	140.07	13 α , 3, 17	C-2, C-3, C-14, C-15, C-17
2	5.240, dd	$J_{1,2}$ 15.2, $J_{2,3}$ 9.6	126.81	16, 3, 5	C-3, C-4, C-15
3	3.336, dq	$J_{2,3}$ 9.6, $J_{3,20}$ 6.8	49.53	20	C-1, C-2, C-4, C-20
4	-	-	211.30	-	-
5	4.625, dd	$J_{5,6\alpha}$ 12, $J_{5,6\beta}$ 2.9	74.14	6 β , 7	C-4, C-6
6 α		$J_{6\alpha,6\beta}$ 13.5, $J_{5,6\beta}$		19, 6 β	C-5, C-8, C-19
6 β	1.385, ddd 1.848, ddd	2.9, $J_{6\alpha,7}$ 13.0, $J_{6\beta,7}$	28.82	19, 6 α , 5, 7	
7	2.336, dddq	3.2, $J_{6\alpha,7}$ 13.0, $J_{7,8}$ 2.6, $J_{7,19}$ 6.9	29.05	5, 8, 6 β , 19	C-6, C-19
8	4.898, d	$J_{7,8}$ 2.6	73.17	10, 7, 19	C-6, C-19, C-9 (OH-9)
9	-	-	97.14	-	C-5, C-8, C-9 (OH-9)
10	3.433, s	-	78.20	12 α , 8, 18	C-9 (OH-9), C-12, C-18
11	-	-	87.65	-	C-12, C-13, C-18
12 α	2.446, dd	$J_{12\alpha,12\beta}$ 12.5, $J_{12\alpha}$, _{13α} 7.5, $J_{12\alpha,13\beta}$ 0.0	37.35	12 β , 13 α , 10	C-13, C-18
12 β	1.537, ddd	$J_{12\alpha,12\beta}$ 12.5, $J_{12\alpha}$, _{13α} 12.5, $J_{12\beta,13\beta}$ 7.5	-	18, 13 β , 12 α	
13 α	2.047, dddd	$J_{13\alpha,13\beta}$ 12.5, $J_{12\beta}$, _{13α} 12.5, $J_{12\alpha,13\alpha}$ 7.5, $J_{13\alpha,14}$ 12.5	28.06	13 β , 12 α , 1	C-12
13 β	1.767, ddd	$J_{13\alpha,13\beta}$ 12.5, $J_{13\beta}$, _{12β} 12.5, $J_{12\alpha,13\beta}$ 0.0, $J_{13\beta,14}$ 5.0		17,12 β , 13 α , 14	
14	3.770, dd	$J_{13\beta,14}$ 5.0, $J_{13\alpha,14}$ 12.5	88.89	13 β , 16, 17, 12 β , 18	C-1, C-12, C-13, C-16,C-17
15	-	-	38.73	-	C-1, C-2, C-13, C-16, C-17

16	1.142, s	-	25.09	17, 14, 2, OH-9	C-1, C-14, C-15, C-17
17	0.912, s	-	25.44	16, 13 β , 14	C-1, C-14, C-15, C-16
18	1.378, s	-	28.11	12 β , 10, OH-9	C-10, C-11, C-12
19	0.849, d	$J_{7,19}$ 6.9	17.01	7, 6 β , 6 α	C-6, C-7, C-8
20	1.123, d	$J_{3,20}$ 6.8	16.00	3	C-2, C-3, C-4
1'	-	-	166.58	-	C-6', C-8
2'	5.697, q	$J_{2',6'}$ 1.2	113.86	5', 4'	C-4', C-6'
3'	-	-	162.97	-	-
4'	2.174, q	$J_{4',5'}$ 7.2	33.88	5'	C-2', C-5', C-6'
5'	1.074, t	$J_{4',5'}$ 7.2	11.83	4'	C-4', C-6'
6'	2.158, d	$J_{2',6'}$ 1.2	18.99	5'	C-2', C-4'
OH-9	5.659, s	-	-	5, 10, 18	C-8, C-9, C-10
OH-10	3.095, s	-	-	-	-

un tetrahidrofurano, formando parte del esqueleto diterpénico. Los datos de RMN descritos son casi idénticos a los reportados para la tonantzitlolona A (**38**), aunque se detectaron algunas inconsistencias en las asignaciones de RMN ^1H . En particular, las asignaciones de RMN ^1H para H-12a y H-12b, deben invertirse, y lo mismo para H-13a y H-13b [39, 84, 85]. Las asignaciones correctas se muestran en la Tabla 2 y se realizaron mediante el análisis de las constantes de acoplamiento entre los hidrógenos del tetrahidrofurano, que permitió definir que la $J_{12\alpha,13\beta} = 0$, y, por lo tanto, el anillo de oxolano se encuentra en la conformación E2 (del itinerario conformacional de un anillo de oxolano, informado en la literatura) [86]. En consecuencia, algunas correlaciones NOESY se deben corregir de acuerdo con las nuevas asignaciones. Por ejemplo, no se detectó la correlación NOESY entre H-14 y la señal a δ_{H} 2.45 (informado por Lima [39]), en cambio, se observó claramente una correlación entre H-14 y H-13 β (δ_{H} 1.537).



Algunas discrepancias menores en las asignaciones pueden atribuirse presumiblemente al uso de diferentes sistemas de numeración, además del hecho de que una de las primeras

estructuras publicadas fue posteriormente corregida [87]. Ciertas correlaciones NOESY relevantes se ilustran en la estructura de rayos X representada en la figura 5, ya que la conformación determinada por análisis de rayos X (*vide infra*) es muy similar a la conformación en solución, y esta observación deriva de la similitud de los ángulos diedros entre los hidrógenos vecinales deducidos a partir de las constantes de acoplamiento J_{H-H} de RMN 1H . Algunos fragmentos de este compuesto han sido sintetizados [88], se ha completado la síntesis total [89, 90], y se ha establecido la configuración absoluta [91], como se representa en la fórmula **38**.

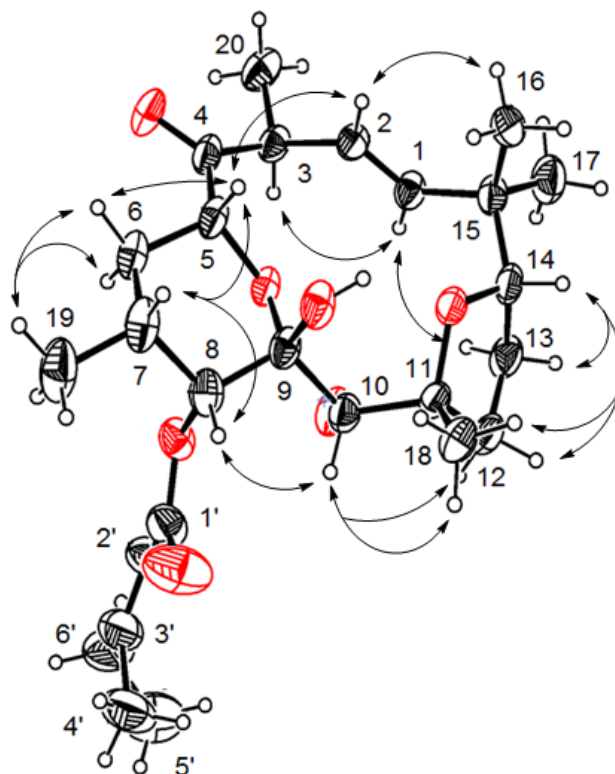


Figura 5. Correlaciones NOESY relevantes para **38**

El análisis de rayos X de este compuesto (figura 6) confirmó la conectividad molecular y la estereoquímica absoluta. Además, permitió identificar dos enlaces de hidrógeno intramoleculares: uno entre OH-9 con el oxígeno de tetrahydrofurano (1.97 Å), y el segundo entre OH-10 con el oxígeno δ -piranilo (1.90 Å). Por lo tanto, la estructura se puede considerar con cierta rigidez, y como se mencionó anteriormente, las constantes de acoplamiento observadas están de acuerdo con la conformación encontrada en el estado sólido. La configuración absoluta de este compuesto es la misma que la obtenida para un compuesto aislado de *Stillingia lineata* (una euforbiácea colectada

en la Isla de La Reunion, Océano Índico) en la búsqueda de agentes antichikungunya, y el compuesto **38** fue renombrado como tonantzitlolona A [85].

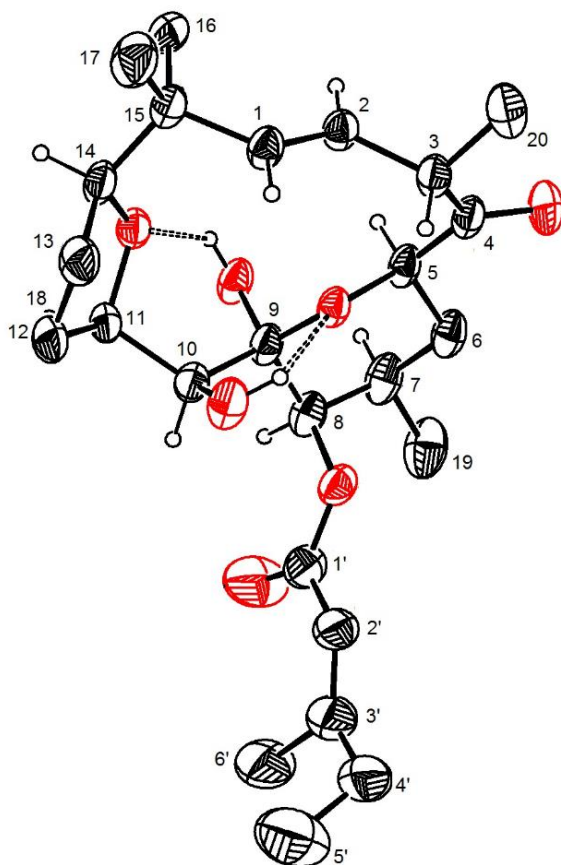


Figura 6. Estructura de rayos X de **38**

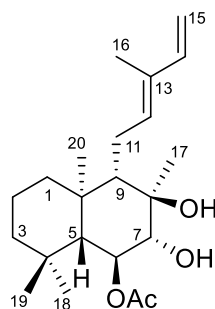
7.4. Estudio químico del extracto de *Croton glabellus*

La cromatografía preparativa en columna del extracto hexánico de las partes aéreas de *C. glabellus* permitió el aislamiento de alcohol carnafílico ($C_{34}H_{70}O$, 1-tetratriacontanol), 6-*O*-acetilaustronulina (**69**), austronulina (**70**), β -sitosterol (**27**) y β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo (**95**). A continuación, se describe la elucidación estructural de **69** y **70**.

7.4.1. 6-*O*-Acetilaustroinulina (**69**)

En el espectro de RMN ^{13}C (espectro 51) de la sustancia **69** se observaron 22 señales, de las cuales, mediante el análisis de la modalidad DEPT, se estableció la presencia de 6 metilos, 5 metilenos, 6 metinos y 5 carbonos secundarios. El número total de carbonos es de 22, lo cual sugiere que se trata de un diterpeno presumiblemente esterificado con un grupo acetato. Esta suposición es correcta, ya que se observa un carbonilo de éster en δ_{C} 171.8 y la señal del metilo de acetato en δ_{H} 2.13 del espectro de RMN ^1H (espectro 52). Por otro lado, en el espectro de RMN ^1H se observan señales intercambiables con D_2O , lo cual permite inferir la presencia de al menos dos hidroxilos (además de que son observables en RMN ^{13}C tres carbonos sp^3 directamente unidos a oxígeno, *vide infra*). Por lo anterior, esta sustancia posee la fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{O}_4$, por lo que tiene cinco grados de insaturación, uno de los cuales es el grupo carbonilo de acetato.

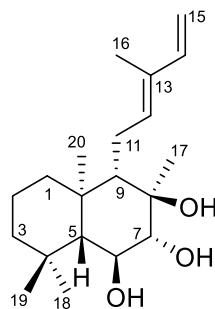
El espectro de RMN ^1H presenta un perfil característico en la zona de los hidrógenos vinílicos para una olefina monosustituida. Específicamente, se observa una señal doble de doble de doble centrada en δ_{H} 6.87 (1H), que por sus constantes de acoplamiento ($J = 17.2, 10.8, 0.8$ Hz) se deduce que se trata de un hidrógeno olefínico con acoplamientos *trans*-, *cis*- y un acoplamiento adicional de menor magnitud. Las señales centradas en δ_{H} 5.20 (1H, $J = 17.2, 0.8$ Hz) y en δ_{H} 5.11 (1H, $J = 10.8, 0.8$ Hz) dan evidencia de la presencia de una olefina monosustituida. Este fragmento estructural puede conectarse con la señal triple centrada en δ_{H} 5.45 (1H, $J = 7.2$ Hz), por lo que se deduce que se trata de un dieno conjugado, el cual es característico de los diterpenos de tipo labdano con las olefinas ubicadas en C-12, C-13, C-14 y C-15. Las señales observables en RMN ^{13}C en δ_{C} 133.6 (C-12), δ_{C} 133.2 (C-14), δ_{C} 131.0 (C-13) y δ_{C} 113.8 (C-15), confirman la presencia de este fragmento estructural y del esqueleto del labdano. Adicionalmente, son observables señales de carbonos de oximetinos centradas en δ_{C} 83.7, 76.9 y 73.2, las cuales, mediante la revisión de los datos en la literatura, corresponden a C-7, C-8 y C-6, respectivamente, de la 6-*O*-acetilaustroinulina. La comparación de las propiedades físicas y espectroscópicas obtenidas experimentalmente con las informadas en la literatura, así como la comparación cromatográfica con una muestra auténtica del producto natural disponible en el laboratorio, permitieron confirmar la identidad de esta sustancia [54].



69

7.4.2. Austroinulina (**70**)

Los espectros de RMN ^1H (espectro 53) y de RMN ^{13}C (espectro 54) de la sustancia **70** muestra una notable similitud con los espectros de la 6-*O*-acetil-austroinulina (**69**) descrito líneas arriba. En el espectro 53 no se observa la señal de δ_{H} 2.13 (3H, s) y en el espectro 54 las señales en δ_{C} 171.8 y δ_{C} 21.8. Por lo tanto, no existe el grupo acetilo del compuesto **69**, por lo que al comparar con la literatura [54], se establece que se trata de la austroinulina (**70**). La comparación de las propiedades físicas y espectroscópicas de esta sustancia con las informadas en la literatura, así como la comparación mediante cromatografía en placa analítica con una muestra auténtica disponible en el laboratorio, permitieron confirmar su identidad.



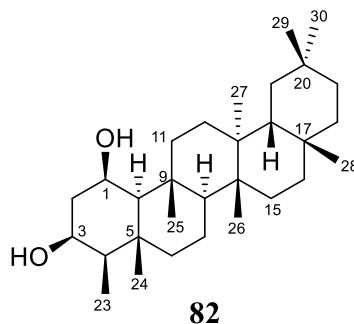
70

7.5. Derivatizaciones químicas

7.5.1. Preparación de 1 β ,3 β -dibenzoiloxifriedelano (**102**)

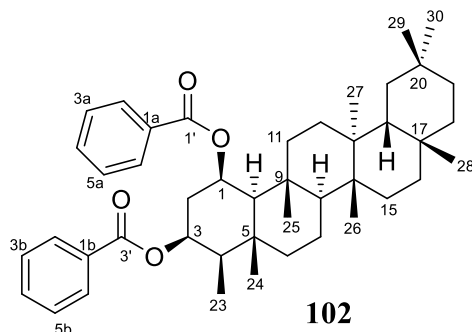
La reducción del grupo cetona de 1 β -hidroxifriedelina (**76**) aislada de las partes aéreas de *Garcia parviflora* [56] con NaBH_4 (borohidruro de sodio), en una mezcla de THF- H_2O (3:0.1 mL), generó el producto 1 β ,3 β -dihidroxifriedelano (**82**) en buenos rendimientos. La estructura de este compuesto fue confirmada de acuerdo a la siguiente evidencia espectroscópica. El análisis del

espectro de RMN ^{13}C (espectro 55), junto con el experimento DEPT, indicaron la presencia de dos metinos unidos a oxígeno en δ_{C} 74.1 (C-3) y 68.4 (C-1), los cuales concuerdan con las dos señales simples anchas que se observaron a campo bajo en el espectro de RMN ^1H (Espectro 56) que pertenecen a los dos protones carbinólicos localizados en δ_{H} 4.48 (H-1) y 3.87 (1H, d, $J = 2.8$ Hz, H-3). Además, se observaron dos señales dobles en δ_{H} 2.64 (d, $J = 7.0$ Hz, OH-1) y 2.32 (d, $J = 6.0$ Hz, OH-3) que fueron asignados a los protones de dos hidroxilos. La asignación de cada una de las señales restantes de carbono y protón concuerdan con las reportadas en la literatura [56] para el compuesto **82**.



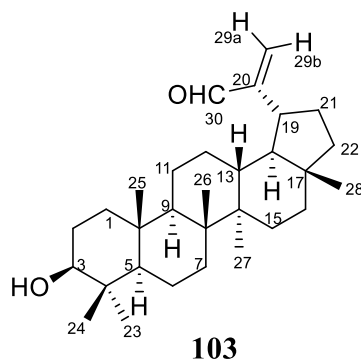
La esterificación del compuesto **82** con cloruro de benzoílo en presencia de piridina, generó el compuesto **102**. El análisis del espectro de RMN ^{13}C (espectro 57) junto con el experimento DEPT, indicaron la presencia de dos carbonos cuaternarios que corresponden a los dos carbonilos de los ésteres (δ_{C} 166.5, 166.1) y las 12 señales esperables de los carbonos aromáticos. También se establece la presencia de dos metinos unidos a oxígeno (δ_{C} 73.4, 68.8). Las demás señales de carbono fueron asignadas de acuerdo al esqueleto de friedelano. Las asignaciones más detalladas de las señales se describen a continuación. En el espectro de RMN ^1H (espectro 58) se observaron dos señales simples anchas (δ_{H} 5.83 y 5.28) que fueron desplazadas a campo bajo con respecto a la materia prima y son asignables de los hidrógenos base de los ésteres. A campo más bajo se observan dos señales doble de dobles que corresponden a hidrógenos en posición *orto* respecto al sustituyente en el anillo aromático (δ_{H} 7.92 (2H, dd, $J = 8.3, 1.2$ Hz, H-2a, H-6a) y δ_{H} 7.86 (dd, $J = 8.3, 1.2$ Hz, H-2b, H-6b)). También se observan dos señales múltiples que integran para un hidrógeno cada una (centradas en δ_{H} 7.44 y 7.40) que se asignan al hidrógeno en *para* de los dos anillos aromáticos. Las señales de los hidrógenos en posición *meta* se determinan como dobles de dobles a δ_{H} 7.26 (2H, dd, $J = 7.6, 7.6$ Hz, H-3a, H-5b) y δ_{H} 7.20 (2H, dd, $J = 7.8, 7.8$ Hz, H-3b, H-5b). Adicionalmente en el espectro 58 se observaron señales simples

de metilos (δ_H 1.62, 1.17, 1.14, 1.03, 1.01, 0.98, 0.95, 0.91) que están en concordancia con los presentes en el esqueleto de un friedelano. De acuerdo a las asignaciones realizadas en los espectros de RMN 1H y ^{13}C se concluye que se trata del compuesto **102**.



7.5.2. Preparación del aldehído derivado de $19\beta H$ -lupeol (**103**)

A partir del compuesto **37** mediante una oxidación alílica con SeO_2 [92], se obtuvo el aldehído de lupeol, esta modificación genera el aldehído en C(30), lo cual se pudo verificar mediante el análisis de sus espectros de RMN 1H y ^{13}C . En el espectro de RMN 1H (espectro 59) se observa una señal simple a δ_H 9.51 (1H, s, H-30), la cual es característica del protón del aldehído. La presencia de este grupo, desplaza a campo más bajo a los protones olefínicos, de δ_H 4.69 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-29b) y δ_H 4.57 (1H, dd, $J = 2.6, 1.4$ Hz, H-29a) en el $19\beta H$ -lupeol (**37**) a δ_H 6.28 (1H, s, H-29b) y δ_H 5.90 (1H, s, H-29a) en el aldehído de lupeol (**103**). Las asignaciones espectroscópicas para los hidrógenos y carbonos se llevaron a cabo por comparación directa con los datos informados en la literatura [73], y se confirma la estructura **103** como el aldehído derivado de $19\beta H$ -lupeol.



7.6. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los metabolitos secundarios aislados y de derivados semisintéticos

Para evaluar la actividad anti-inflamatoria del extracto total de las hojas y de las sustancias puras obtenidas de *Sapium nitidum*, se utilizó el método de edema auricular inducido por ATF de las sustancias que se obtuvieron en cantidades suficientes. Como se puede observar en el ensayo preliminar del porcentaje de inhibición (Tabla 3) los compuestos **88**, **93** y **94** mostraron diferencias significativas con respecto al control.

Tabla 3. Actividad antiinflamatoria de los productos aislados de *S. nitidum*

Muestra ^a	Edema (mg)	Inhibición (%)
88^b	8.18±2.43	48.26*
89^b	12.28±1.74	22.31
91^b	10.83±1.62	31.49
93^c	4.80±1.24	68.76**
94^c	12.28±1.74	48.43**
ET^b	10.30±1.29	34.81

^aDosis: 1 µmol/oreja. Control: ^b acetona-CH₂Cl₂ 1:1 (15.80±1.45), ^c cloroformo (15.37±0.52). ET = Extracto total.

Los datos representan el promedio de seis animales ± el error estándar de la media ($\bar{x} \pm EEM$). Los resultados se analizaron mediante una prueba de *Dunnnett*, los valores de $p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.01$ (**) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control.

Considerando que el compuesto **93** presentó un porcentaje de inhibición de la inflamación mayor al 50 % comparado con los otros compuestos, se procedió a realizar la dosis inhibitoria cincuenta (DI₅₀) de **93** por el método de edema auricular de ratón inducido por ATF. Como se puede observar en la Tabla 4, la DI₅₀ del compuesto **93** es casi tres veces mayor que la indometacina, lo que indica que es necesaria una mayor dosis del compuesto para obtener el mismo efecto a la DI₅₀ de la referencia. Sin embargo, puede afirmarse que el compuesto **93** muestra actividad antiinflamatoria relevante.

Tabla 4. DI₅₀ del compuesto **93**

Muestra	Dosis (μmol/oreja)	Edema (mg)	Inhibición (%)	DI ₅₀
Indometacina	0.031	12.78±1.21	13.36	0.236 μmol/oreja
	0.1	10.74±1.13	27.19*	r = 0.983
	0.31	5.62±0.89	61.90**	
	1	2.88±0.73	78.76**	
93	0.1	12.63±0.54	14.06	0.60 μmol/oreja
	0.31	10.98±0.90**	25.28**	r = 0.99
	1	4.18±0.89**	71.54**	
	1.78	1.72±0.79**	88.32**	

Tomado en cuenta que los compuestos aislados de *C. glabellus* así como de los derivados del 1β-hidroxifriedelina (**76**), metabolito secundario aislado de *G. parviflora* ya han sido reportadas sus actividades citotóxicas [54, 56], se procedió a evaluar la actividad antiinflamatoria de los Productos Naturales aislados de *C. glabellus* (Tabla 5) y de *G. parviflora* (Tabla 6).

Tabla 5. Actividad antiinflamatoria de los productos aislados de *C. glabellus*

Muestra	Dosis	Edema (mg)	Inhibición (%)
Control (CHCl ₃)	-	14.50±0.46	
69	1 μmol/oreja	8.03±1.83	44.60**
70	1 μmol/oreja	7.27±0.79	49.89**

Los resultados se analizaron mediante una prueba de *Dunnett*, los valores de $p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.01$ (**) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control.

Al comparar la relación estructura-actividad, se puede establecer que el compuesto **70** tiene un porcentaje de inhibición ligeramente mayor que **69**, lo que podría sugerir que la presencia del grupo hidroxilo en C-6, mejora la actividad antiinflamatoria.

Para el caso de la 1β-hidroxifriedelina (**76**), no fue posible bioevaluarlo, según el modelo utilizado, debido a problemas de solubilidad. Considerando la similitud de estructuras se evaluó el

friedelanol (**104**), friedelina (**105**), los compuestos derivados así como el compuesto **102**. Los resultados se describen en la Tabla 6.

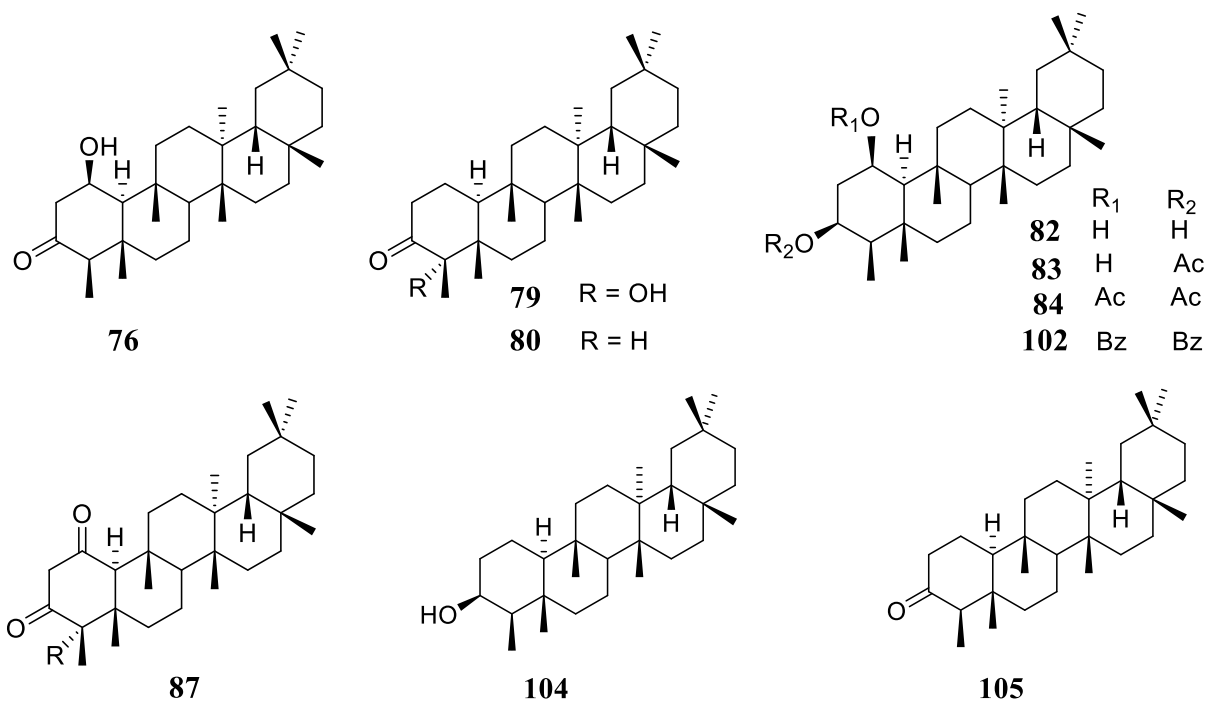


Tabla 6. Bioensayo de los productos aislados y semisintéticos de *G. parviflora*

Muestra	Dosis	Edema (mg)	Inhibición (%)
Control (CHCl ₃)	-	14.50±0.46	
79	0.31 µmol/oreja	13.37±1.25	7.82
80	1 µmol/oreja	5.90±1.68	59.31**
82	1 µmol/oreja	6.20±0.38	57.24**
83	1 µmol/oreja	4.87±1.13	66.44**
84	1 µmol/oreja	10.77±0.84	25.75
87	1 µmol/oreja	10.90±1.40	24.83
102	1 µmol/oreja	12.90±1.14	17.48
104	1 µmol/oreja	14.30±0.83	8.53
105	1 µmol/oreja	13.03±0.34	16.63

Los resultados se analizaron mediante una prueba de *Dunnnett*, los valores de $p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.01$ (**) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control.

De acuerdo a los valores del porcentaje de inhibición, todos los compuestos que tienen la presencia de un grupo OH en la posición 1, en el anillo A del friedelano, presentan mayor actividad respecto a los que tienen la presencia del éster o la ausencia del grupo hidroxilo.

Finalmente del compuesto **103**, se observó una actividad antiinflamatoria totalmente nula.

7.7. Evaluación de la actividad citotóxica de los metabolitos secundarios aislados y de los derivados semisintéticos.

Considerando que las actividades citotóxicas de los compuestos aislados de *C. glabellus* y *G. parviflora* ya fueron reportadas [54, 56], se procedió a evaluar las actividades de los compuestos aislados de las otras especies.

La actividad citotóxica del extracto total y de los metabolitos secundarios que fueron obtenidos en cantidades suficientes, se evaluaron utilizando el método de tinción de la Sulforodamina B.

Como se puede observar en el ensayo preliminar (Tabla 7) todas las sustancias puras evaluadas tuvieron un porcentaje de inhibición menor al 50% en cada una de las líneas celulares por lo que ya no fue necesario realizar la DI_{50} de los compuestos. Sin embargo, el extracto total tuvo un porcentaje de inhibición del 100% en la línea celular K562 (leucemia). Esta diferencia con los compuestos aislados, podría deberse a un mecanismo de sinergismo entre los compuestos que integran el extracto total o probablemente por la presencia de un metabolito secundario que no fue aislado.

Tabla 7. Porcentajes de inhibición de la actividad citotóxica de los productos aislados de *S. nitidum* a 50 µg/mL extractos, 50 µM compuestos puros, vehículo DMSO

Muestra	U251	PC3	K562	HCT15	MCF7	SKLU1
	glías	próstata	Leucemia	colon	pecho	pulmón
88	sa	1.81	6.88	10.46	3.24	21.95
89	sa	3.05	3.46	10.24	13.43	19.59
91	sa	0.08	Sa	18.69	5.15	20.06
93	29.56	20.72	9.86	7.24	11.53	12.89
94	sa	sa	11.92	sa	4.47	9.30
Extracto total	39.14	30.91	100	28.17	23.18	41.73

Las actividades inhibitoras del extracto de *S. macrocarpum* así como de los compuestos **37**, **38**, **95**, **100**, y **101**, también se evaluaron por el método de sulforodamina B. Los resultados (Tabla 8) revelaron que el extracto y los compuestos ensayados mostraron actividad diferencial. El lupeol (**37**) mostró una clara actividad contra PC-3, y todos los compuestos naturales (**37**, **38**, **95**, **100**, **101**) fueron activos contra la línea celular de leucemia (K562). El β-D-glucopiranosido de β-sitosterilo (**95**) fue el más activo en esta línea celular, y este resultado está de acuerdo con los resultados observados para otras células de leucemia (CEM / ADR5000) [93]. La bioevaluación de los compuestos puros frente a otras líneas celulares tumorales indicó que la actividad inhibitora es inferior al 40%. Se ha informado que la sitostenona (**101**) posee actividades anti-proliferación y anti-tirosinasa en células de melanoma [94]. La actividad mostrada por la tonantzitlolona A (**38**) es similar a la descrita por Olivon y col. [95] para las tonantzitlolonas B-F, que son variantes estructurales de la tonantzitlolona A (**38**) en la cadena lateral del éster. Recientemente, la tonantzitlolona A (**38**) se identificó como un agente antitumoral muy potente en las células renales de cáncer, que establece que este compuesto es un activador de PKC y la citotoxicidad es dependiente de PKCθ [96].

Tabla 8. Porcentajes de inhibición de la actividad citotóxica de extractos y productos aislados de *S. macrocarpum* (50 µg/mL extractos, 50 µM compuestos puros, vehículo DMSO)

Muestra	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1
Extracto CH ₂ Cl ₂ -MeOH (1:1)	17.5	59.8	96.5	45.3	39.5	44.6
37	27.3	50.7	48.8	10.4	22.3	13.0
100	8.3	12.1	53.2	9.1	8.2	28.9
101	1.5	18.4	66.1	2.8	11.6	25.9
95	11.9	32.6	77.0	12.6	2.6	27.7
38	29.2	36.8	64.5	32.1	38.1	27.6
Etopósido (control positivo)	91.1 ^a	51.4 ^b	60.2 ^b	80.8 ^b	56.8 ^b	81.7 ^b

^a Concentración 10 µM. ^b Concentración 31 µM

8. PARTE EXPERIMENTAL

8.1 Material y Equipo

El aislamiento de los constituyentes químicos presentes en los extractos orgánicos de *S. nitidum* (Monach.) Lundell, *S. longicuspis* Standl., *S. macrocarpum* Müll. Arg., *C. glabellus* L. y *G. parviflora* Lundell, así como de los derivados, se llevó a cabo mediante la aplicación de técnicas cromatográficas, tales como: cromatografía en columna por gravedad (CCG), cromatografía de capa fina (CCF), cromatografía de capa fina preparativa (CCFP) y cromatografía en capa fina analítica (CCFA). Los procesos cromatográficos tuvieron como fase estacionaria sílica gel (SiO_2) de 60 a 40 Å (0.04-0.063 mm) marca Macherey-Nagel, y malla 230/400 ASTM. Se utilizaron como fase móvil los disolventes *n*-hexano, acetato de etilo, acetona, diclorometano, cloroformo, tolueno y metanol en distintas proporciones. El seguimiento del proceso cromatográfico de las columnas y la pureza de los constituyentes químicos aislados se efectuó en cromatofolios de sílica gel marca Merck 60 F₂₅₄. Como reveladores se utilizaron una lámpara de rayos UV Spectroline ENF-240C (λ de 254 y 365 nm) y una solución de sulfato cérico amoniacal $(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4$ al 1% en ácido sulfúrico 2N. La cromatografía en capa fina preparativa y analítica se realizó en placas preparativas Merck (2 mm y 0.20 mm de grosor, respectivamente, y una superficie de 20 x 20 cm).

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y no fueron corregidos. Los espectros de infrarrojo se obtuvieron en solución con CHCl_3 y pastilla de KBr, en un espectrofotómetro FT-IR Bruker Tensor 750.

Los espectros de masas por impacto electrónico se obtuvieron en un espectrómetro JEOL JMS-AX505HA con un potencial de ionización de 70 eV y una corriente de ionización de 100 μA . Los espectros de RMN ^1H y ^{13}C , fueron llevados a cabo en los espectrómetros: Varian Unity 300 (a 300/75 MHz), Bruker Avance III (400/100 MHz) y Varian Inova 500 (a 500/125 MHz). Los espectros fueron obtenidos en cloroformo deuterado (CDCl_3), piridina deuterada ($\text{C}_6\text{D}_5\text{N}$) y metanol deuterado (CD_3OD); y como estándar interno se empleó tetrametilsilano (TMS). Los valores de desplazamiento químico de los núcleos observados están registrados en ppm. Se realizaron experimentos bidimensionales de RMN como COSY, NOESY, DEPT, HMQC y HMBC para la asignación de cada señal de los productos naturales y de los derivados obtenidos. El análisis por difracción de rayos X fue realizado mediante un difractor automático a Bruker

D8 Venture con un detector de área CCD a 173(2) K, usando radiación espejo multicapa helios Cu $K\alpha$ ($\lambda = 1.54178 \text{ \AA}$).

8.2 Actividades Biológicas

8.2.1 Actividad Antiinflamatoria

Para la realización de la actividad anti-inflamatoria se utilizaron ratones machos con pesos entre 25-30 g. Los experimentos se realizaron de acuerdo a los lineamientos éticos internacionales para el cuidado y uso de animales de experimentación. Los animales se mantuvieron en un ambiente controlado (temperatura $22 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$, humedad $70 \pm 5\%$, ciclos de luz de 12 h), con agua y alimento *ad libitum*. Para la realización de la actividad anti-inflamatoria se formaron 3 grupos de 4 ratones cada uno: control (ATF + vehículo), sustancias en estudio (ATF + sustancia en estudio) y sustancia de referencia (ATF + indometacina). A cada ratón se les aplicó una solución de ATF (2.5 μg) disuelto en etanol (10 μL), sobre la superficie interna y externa de la oreja derecha (5 $\mu\text{L}/\text{lado}$) para provocar la inflamación. Diez minutos después de la administración del ATF las sustancias en estudio (1 $\mu\text{mol}/\text{oreja}$), el extracto total (1 mg/oreja) y la indometacina (1 $\mu\text{mol}/\text{oreja}$) disueltas en 20 μL de vehículo, se aplicaron tópicamente sobre la superficie interna y externa de la oreja derecha (10 $\mu\text{L}/\text{lado}$). En la oreja izquierda de cada ratón se administró 10 μL de etanol y 20 μL del vehículo de las sustancias en estudio (control negativo). Transcurridas cuatro horas desde la administración del ATF, los animales se sacrificaron en cámaras de CO_2 y se tomaron secciones circulares (7 mm de diámetro) de ambas orejas del ratón (tratada y no tratada), los cuales se pesaron para determinar por diferencia de peso entre la oreja tratada y no tratada el edema producido.

La inhibición del edema se calcula con la fórmula:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \frac{(P_t - P_{nt})_{\text{control}} - (P_t - P_{nt})_{\text{tratamientos}}}{(P_t - P_{nt})_{\text{control}}} \times 100$$

Donde:

P_t es el peso de la sección de la oreja tratada

P_{nt} es el peso de la sección de la oreja no tratada.

Los resultados se expresaron como la media \pm error estándar de la media (EEM) y se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de una prueba de *Dunnnett* para comparaciones múltiples, los valores de $p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.01$ (**) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control.

8.2.1.1 Ensayo del Edema Plantar de Carragenina en Ratón

Las sustancias puras que presentaron un porcentaje de inhibición de la inflamación por el método de edema auricular de ratón por ATF mayor al 50% se les realizó el ensayo del edema plantar de carragenina. Para la realización de la prueba se utilizaron ratones hembras con pesos entre 25-30 g, divididos en 3 grupos de 4 ratones cada uno, control (carragenina al 1%), sustancias en estudio (carragenina al 1% + sustancia en estudio), referencia (carragenina al 1% + indometacina).

Para inducir el edema a cada uno de los ratones se les administró 50 μ L de carragenina al 1% (10 mg/1 mL SSI) en la pata derecha y media hora después de la administración de carragenina se administraron por vía intraperitoneal la sustancia en estudio (31.6 mg/kg) y la indometacina (7.5 mg/kg).

La inflamación se cuantificó midiendo el volumen de las patas utilizando un pletismómetro a las 1.5, 3, 4.5 y 6 h después de la inyección de la sustancia en estudio y la indometacina. La diferencia de volumen entre la pata derecha inflamada y la misma pata derecha normal antes de la inyección de carragenina es indicativa del grado de inflamación.

Los resultados se determinaron como porcentaje de inflamación utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de inflamación} = \frac{V_t - V_o}{V_o} \times 100$$

Donde

V_t = volumen de la pata inflamada a un tiempo x

V_o = volumen normal (antes de la aplicación de la carragenina)

8.2.2 Ensayo de Citotoxicidad

Para la determinación de la actividad citotóxica del extracto total y de los compuestos puros se utilizó el método colorimétrico de la sulforrodamina B (SRB) frente a seis líneas celulares de tumores humanos de cáncer de mama (MCF-7), cáncer de pulmón (SKLU-1), cáncer de Sistema Nervioso Central (U-251), cáncer de colon (HCT-15), cáncer de leucemia (K-562) y cáncer de próstata (PC-3). Cada una de las líneas celulares fueron cultivadas en el medio RPMI-1640, suplementado con suero fetal bovino al 10%, 2µM de L-glutamina, 100 IU/mL de penicilina G, 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina y 0.25 µg/mL de anfotericina B, conservados a una temperatura de 37 °C, en un ambiente húmedo con 95% de aire y 5% de CO₂.

Para la realización del ensayo se tomaron suspensiones celulares de 5 x 10⁴ células/mL (K-562 y MCF-7); 7.5 x 10⁴ células/mL (U-251, PC-3 y SKLU-1) y 10 x 10⁴ células/mL (HCT-15). Se sembraron 100 µL de cada suspensión celular en pozos de un microplato (96 pozos) y se incubaron por 24 h para fijar las células a las paredes del pozo. Transcurrido el tiempo de incubación se adicionaron 100 µL de cada muestra (50 µg/mL para extracto total y 50 µM para sustancias puras) fueron incubadas por 48 h adicionales. Al término de las 48 horas, las células adheridas fueron fijadas in situ utilizando 50 µL de ácido tricloroacético (ATCA) frío al 50% (P/V) y se incubaron a 4 °C por 60 min. Al término de este tiempo se desechó el sobrenadante y los platos fueron lavados tres veces con agua destilada y posteriormente se secaron con aire. Los cultivos fijados con ATCA fueron coloreados con 100 µL de una solución de SRB (sulforrodamina B) al 0.4% y se dejó en tinción por 30 min. Concluido el tiempo de tinción fueron lavados 4 veces con ácido acético al 1% y luego secados en cámara de flujo de aire. Después del secado de las placas el colorante unido a proteínas fue solubilizado con 10 µM de una base sin búfer. Finalmente, la absorbancia fue leída a una longitud de onda de 515 nm. Los resultados fueron expresados como porcentaje de inhibición de la proliferación celular.

8.3 Colecta del Material vegetal

La colecta de las especies vegetales se realizó en los estados de Chiapas y Veracruz (México). Una muestra del material vegetal fue depositada en el Herbario Nacional del Instituto de Biología de la UNAM. En la Tabla 9 se muestran los sitios de colecta y la clave de registro de la planta.

Tabla 9. Sitios de colecta de especies de la familia Euphorbiaceae

Espece vegetal	Sitio colecta	Clave de registro
<i>S. nitidum</i> (Monach.) Lundell	Nueva Palestina, Chiapas	EM39268
<i>S. longicuspis</i> Standl.	Paso del Tigre, Chiapas	EM39260
<i>S. macrocarpum</i> Müll. Arg.	Arriaga, Chiapas	EM39273
<i>C. glabellus</i> L.	Los Tuxtlas, Veracruz	1104456 MEXU
<i>G. parviflora</i> Lundell	Laguna El Zacatal, Veracruz	1104455 MEXU

8.4. Preparación de los extractos

El material vegetal se secó a la sombra, las hojas se trituraron y las ramas se molieron. Cada material se maceró a pequeña escala (ca. 10 g) con *n*-hexano, acetato de etilo, acetona, CH₂Cl₂-metanol (1:1) y metanol. Se comparó el perfil químico de cada extracto mediante cromatografía en capa delgada y en base a esta comparación se eligió el sistema de extracción para cada especie vegetal. Los extractos de cada una de las partes aéreas se maceraron durante 24 h, y se realizaron por 3 veces consecutivas.

Se separaron las diferentes partes aéreas de *S. nitidum*, obteniéndose de material seco: hojas (1460 g) y ramas (1930 g). Se prepararon los extractos de CH₂Cl₂-metanol (1:1) de los dos tipos de material vegetal, obteniéndose 160 y 81 g de extracto, respectivamente.

Del material de *S. longicuspis* se separaron las diferentes partes aéreas de la planta, obteniéndose de material seco: hojas (1290 g) y ramas gruesas (2460 g). Se prepararon los extractos de CH₂Cl₂-metanol (1:1) de los dos tipos del material vegetal, obteniéndose 200 y 40 g de extracto, respectivamente.

De las partes aéreas de *S. macrocarpum* se obtuvo 44 g de extracto de CH₂Cl₂-metanol (1:1).

Las hojas de *C. glabellus* (5.5 kg) se maceraron con *n*-hexano obteniéndose 201 g de extracto.

8.5. Extracción y aislamiento

8.5.1. *Sapium nitidum*

Para la separación de los compuestos se realizó un fraccionamiento primario utilizando una columna cromatográfica con el extracto de CH₂Cl₂ - metanol (1:1) de las hojas de *S. nitidum* (160 g). Como fase estacionaria se utilizaron 750 g de sílica gel de malla 230-400 y como fase móvil *n*-hexano, mezclas de *n*-hexano-acetato de etilo en orden creciente de polaridad, acetato de etilo, acetona, acetona-metanol 1:1, obteniéndose 313 eluatos (de 450 mL cada uno y concentrados en un rotavapor), los mismos que se analizaron mediante CCF y se reunieron de acuerdo a su similitud cromatográfica, obteniéndose 8 fracciones principales y se identificaron de la siguiente manera: 1-13 (A), 14-23 (B), 24-40 (C), 41-51 (D), 52-107 (E), 108-149 (F), 150-264 (G) y 265-313 (H).

En la fracción A se determinó la existencia de una mezcla de grasas, por medio del análisis del espectro en el IR. Esta mezcla no fue separada.

En la fracción B al evaporarse el disolvente se obtuvo por precipitación un sólido blanco (23.9 g) el cual resultó una mezcla de dos sustancias, de acuerdo al análisis por CCF (ΔR_f 0.05). Debido a la similitud de los valores de R_f , se realizó una cromatografía en columna y el empaquetamiento de la sílica gel se lo hizo vía húmeda. Se utilizaron 400 mg de la mezcla y como fase móvil *n*-hexano-tolueno (90:10). Como resultado de la cromatografía se separaron dos compuestos, los cuales fueron identificados como palmitato de β -amirilo (210.7 mg) (**88**) y palmitato de lupeílo (52.5 mg) (**89**). Además, se recuperó parte de la mezcla original (136.8 mg).

De las aguas madres de la fracción B (6.0648 g) se realizó una columna cromatográfica, la cual se eluyó con *n*-hexano, mezclas de *n*-hexano-acetato de etilo en orden creciente de polaridad y acetona. Se recolectaron 121 fracciones, cada una de 250 mL. De la fracción 25-55 se realizó una columna húmeda eluida con *n*-hexano-tolueno 90:10, obteniéndose 111 fracciones de 10 mL cada una y de la fracción 65-111 se obtuvo por recristalización en *n*-hexano-acetona, 26.5 mg de cristales en forma de agujas finas identificándose como acetato de lupeílo (**90**). De la fracción 55-67 se obtuvo por precipitación un sólido anaranjado que fue lavado con acetona y recristalizado con CH₂Cl₂-acetona. Los cristales blancos (80.9 mg) en forma de agujas finas se identificaron por técnicas espectroscópicas como el palmitato de 11-oxo- β -amirilo (**91**).

Al concentrar el disolvente de la fracción C, se obtuvo un sólido blanco amorfo (2.91 g) y posteriormente el residuo se lavó con acetona. Por análisis de su espectro de RMN ^1H se determinó que se trata de un alcohol graso.

Al evaporarse el disolvente de la fracción D, se obtuvo un sólido blanco (100.2 mg), el cual al ser lavado con acetona y recristalizado en hexano-acetona, se identificó como una mezcla de β -sitosterol (**27**) y estigmasterol (**28**).

De las aguas madres (3 g) se realizó una columna cromatográfica eluida con hexano, mezclas de *n*-hexano-acetato de etilo en orden creciente de polaridad y acetona, obteniéndose 197 fracciones de 100 mL cada una. De la fracción 25-61 (1.01 g) se realizó un fraccionamiento terciario recolectándose 137 fracciones de 100 mL cada una. De la fracción 16-25 se observó un compuesto en CCF, por lo que se procedió a su separación mediante CCFA eluida con hexano-acetato de etilo (70:30) por 7 veces. Este procedimiento permitió la obtención de una muestra que resultó, de acuerdo al análisis de RMN ^1H , una mezcla de ácido palmítico, ácido esteárico y cicloeucalenol (**92**).

El residuo de la fracción E se aplicó a una columna cromatográfica empacada con 5.45 g y se obtuvieron 126 eluatos de 110 mL cada uno. Al evaporarse el disolvente de las fracciones 3-7 se obtuvo un sólido amarillo el cual se lavó con acetona y metanol, obteniéndose 19.62 mg de un sólido blanco amorfo que corresponde al ácido mirístico. Por otro lado, en la fracción 62-85 precipitó un sólido, mismo que una vez filtrado se recristalizó de acetona-*n*-hexano, obteniéndose cristales blancos (36.2 mg) en forma de agujas finas. Las aguas madres fueron concentradas obteniéndose un residuo (1.15 g) el cual fue aplicado en una columna cromatográfica obteniéndose en total 52.2 mg del mismo compuesto, el cual se identificó como 3β -palmitoiloxi- $1\beta,11\alpha$ -dihidroxi-olean-12-eno (**93**).

Se realizó la separación de los componentes de la fracción G (13.45 g) mediante una columna cromatográfica, utilizando mezclas de hexano-acetato de etilo en orden creciente de polaridad y acetona como fase móvil, recolectándose 221 eluatos de 400 mL cada uno. De la fracción 182-195, se obtuvo un sólido amorfo (29.7 mg) que una vez lavado con acetona se determinó como $6'$ -palmitoil- β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo (**94**). De la fracción 195-214 se aisló un sólido blanco amorfo, el cual se recristalizó de una mezcla de acetona, acetato de etilo y hexano, y finalmente se lavó con hexano frío. Al comparar directamente por CCF esta substancia

con una referencia auténtica obtenida en el laboratorio, así como la comparación de las propiedades de RMN ^1H , se confirmó que esta muestra es β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo (**95**).

El fraccionamiento primario del extracto CH_2Cl_2 - metanol (1:1) de las ramas de *S. nitidum* (81 g) se realizó en una columna cromatográfica, utilizando como fase estacionaria sílica gel (550 g) de malla 230-400 y como fase móvil hexano, mezclas de hexano-acetato de etilo en orden creciente de polaridad, acetato de etilo y acetona. Se obtuvieron 389 eluatos (de 350 mL cada uno y concentrados en un rotavapor), los cuales se analizaron mediante CCF y se reunieron de acuerdo a su similitud cromatográfica, obteniéndose 9 fracciones principales y se identificaron de la siguiente manera: 1-15 (A), 16-23 (B), 24-61 (C), 62-86 (D), 87-108 (E), 109-181 (F), 182-252 (G), 253-313 (H) y 314-389 (I).

Como resultado de este proceso cromatográfico, a partir de la fracción B se aisló e identificó la mezcla de palmitato de β -amirilo (**88**) y palmitato de lupeól (**89**). Mediante una cromatografía preparativa flash (SEPCORE) se separó la mezcla, para lo cual se pesó 310 mg y se disolvió en 5 mL de hexano. La solución se inyecta en la columna y se procede a coleccionar fracciones de 8 mL con un flujo de 2.5 mL /min. Del análisis realizado de las fracciones obtenidas, se confirmó la presencia de los compuestos **88** y **89**, pero adicionalmente se aisló e identificó el acetato de β -amirilo (**96**).

Una vez que se reunieron las fracciones que corresponde a la fracción C, esta se lavó con acetona varias veces, con lo que se obtuvo un sólido blanco pulverulento, el mismo que corresponde al palmitato de 11-oxo- β -amirilo (**91**).

La fracción D (2,72 g) se adsorbió en 3 g de sílica gel y se colocó en una columna de vidrio empacada con 100 g de sílica gel 230-400. Esta se eluyó con *n*-hexano y con mezclas de *n*-hexano-acetato de etilo (98:2, 96:4, 94:6, 92:8, 90:10) en orden creciente de polaridad. Se obtuvieron 40 eluatos de 50 mL cada uno y de la fracción 8-30 se aisló una mezcla (9:1) de 19 β H-lupeol (**37**) y β - amirina (**97**)

El residuo vegetal de la fracción E (200 mg) se aplicó a una placa preparativa, la cual se eluyó con una mezcla *n*-hexano-AcOEt (90:10). Se observan tres bandas cuyos R_f son 0.40, 0.53 y 0.57. La banda más polar ($R_f = 0.40$) se identificó como una mezcla de β -sitosterol (**27**),

estigmasterol (**28**) y un ácido graso., la banda de polaridad media ($R_f = 0.53$) se identificó como cicloeucalenol (**92**) y la banda menos polar ($R_f = 0.57$) se identificó el $19\beta H$ - lupeol (**37**). Adicionalmente, la fracción E (1.76 g) se procesó por CCG, la columna empacada con 80 g de sílica gel 230-400 fue eluida con *n*-hexano y con mezclas de *n*-hexano-AcOEt de polaridad creciente desde 99:1 hasta 80:20 y se obtuvieron 107 fracciones. De la subfracción 65 a 74 se obtuvo β -sitosterol (**27**) (44.5 mg).

Durante la cromatografía de la fracción I, se observó un residuo sólido, el cual en CCF eluye con una mezcla *n*-hexano-AcOEt (3:7), Este sólido se identificó como el β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo (**95**), mediante comparación cromatográfica con una muestra auténtica disponible en el laboratorio, y por la identidad de sus características espectroscópicas en RMN 1H .

8.5.2. *Sebastiania longicuspis*

El extracto CH_2Cl_2 -metanol (1:1) de las hojas de *S. longicuspis* (200 g) fue adsorbido en sílica gel 230-400 y colocado en una columna empacada con 800 g de sílica de las mismas características. A continuación, se eluyó con *n*-hexano, mezclas de *n*-hexano-acetato de etilo de polaridad creciente y acetona. Como resultado de este procedimiento se obtuvieron 265 fracciones de 500 mL cada una.

De la fracción 18 se obtuvo un sólido blanco, el cual se recrystaliza de una mezcla de metanol, acetato de etilo y *n*-hexano, se lava con *n*-hexano y en CCF se determina que tiene un R_f 0.62 en *n*-hexano-AcOEt (85:15). Esta sustancia se identificó como *epi*-taraxerol (**98**) (4.2 mg). Adicionalmente 1.9 g de la fracción 15-23 se adsorbió en sílica gel y se colocó en una columna cromatográfica, la cual se empaca con 110 g de sílica gel 230-400. Esta se eluye con *n*-hexano, mezclas de *n*-hexano-acetato de etilo en orden creciente de polaridad (98:2, 94:6, 92:8 y 90:10) y acetona. Se obtuvieron un total de 128 fracciones, de la cual, la subfracción 37-53, se aisló un sólido blanco (14 mg) que se identificó como taraxerol (**43**) por lo procedimientos usuales.

La fracción 34-47 (6 g) se adsorbió en sílica gel 230-400 y se colocó en una columna cromatográfica empacada con 250 g de sílica gel 230-400, la cual se eluyó con *n*-hexano y mezclas *n*-hexano-acetato de etilo (hasta 7:3), obteniéndose 108 fracciones. Al procesar la

subfracción 31-57 se aisló un sólido (26 mg) que se identificó como una mezcla de β -sitosterol (**27**) y estigmasterol (**28**).

El extracto CH₂Cl₂-metanol (1:1) de las ramas de *S. longicuspis* (40 g) fue adsorbido en sílica gel 230-400 y colocado en una columna empacada con 200 g de sílica de las mismas características. A continuación, se eluyó con *n*-hexano, mezclas de *n*-hexano-acetato de etilo de polaridad creciente y acetona. Como resultado de este procedimiento se obtuvieron 392 fracciones. Los eluatos colectados (350 mL) se analizaron CCF y se reunieron de acuerdo a su similitud cromatográfica. El residuo que resultó al reunir las fracciones 3-15, se recristalizó de acetato de etilo- *n*-hexano y se lavó con acetona (en frío), obteniéndose un sólido (200 mg) que fue identificado como 3-oxo-21 α *H*-hop-22(29)-eno (**25**). Al analizar la fracción 16-31 se obtiene un sólido, mismo que al ser lavado con acetona en frío se logró purificar y fue identificado como 19 β *H*- lupeol (**37**).

La fracción 62-88 (0,49 g) se adsorbió con sílica gel (1:1) y se colocó en una columna empacada con 50 g de sílica gel 230-400 y se eluyó con *n*-hexano, mezclas de *n*-hexano-AcOEt en orden creciente de polaridad (hasta 8:2) y acetona. Este fraccionamiento secundario generó 118 fracciones de 50 mL cada una. El análisis de cada una de las fracciones, mediante CCF, permitió la identificación de una sustancia en las subfracciones 50-61 (0.19 g); este residuo fue adsorbido en sílica gel 230-400 y colocada en una columna cromatográfica empacada con 12 g de la misma fase estacionaria y como fase móvil se utilizó *n*-hexano y mezclas de *n*-hexano-AcOEt de polaridad creciente (hasta 9:1). Como resultado de este fraccionamiento terciario se obtuvieron 69 fracciones, y en la subfracción 44 se observó un compuesto con R_f 0.42 (eluido con *n*-hexano-AcOEt (8.5:1.5)). Este compuesto fue identificado como el ácido 3-acetilauritólico (**62**), mediante comparación de sus propiedades físicas y espectroscópicas.

Por otro lado 0.6 g de residuo obtenido de la reunión de las fracciones 226-257, fue adsorbido en sílica gel, y se aplicó en una columna empacada con 30 g de sílica gel 230-400, la cual fue eluida con mezclas de *n*-hexano-AcOEt de polaridad creciente hasta (1:1). Se obtuvieron 123 fracciones de 40 mL cada una. Del residuo de las subfracciones 68-84, se obtuvo un sólido que se identificó como 16 β ,17-dihidroxi-*ent*-kauran-3-ona (**99**) (R_f de 0.44 en *n*-hexano-AcOEt (1:1), eluido dos veces), mediante la comparación directa de sus propiedades espectroscópicas.

8.5.3. *Sapium macrocarpum*

Las partes aéreas de *S. macrocarpum* (hojas y ramas, 1.1 kg) se secaron, se molieron y finalmente se maceraron durante 24 h (por triplicado) con una mezcla de CH₂Cl₂-metanol (1:1). Se obtuvo un filtrado, el cual fue concentrado a presión reducida, obteniéndose el extracto total (41 g). Parte de este residuo (40 g) se adsorbió en una mezcla de celita y sílica gel (1:1) (30 g). La mezcla se empacó en una columna cromatográfica (CC) que contiene sílica gel (malla 230-400, 280 g), y se procedió a su desarrollo con disolventes y mezcla de disolventes de polaridad creciente (*n*-hexano, *n*-hexano-acetato de etilo, acetato de etilo y acetato de etilo-metanol). Se obtuvieron 8 fracciones principales (A-H).

La fracción D (124 mg) fue resuelta en sus componentes mediante una cromatografía en columna empacada con sílica gel y se eluyó con un sistema de *n*-hexano-AcOEt de polaridad creciente. Este procedimiento permitió la obtención de una fracción que se purificó por CCF preparativa utilizando una mezcla de *n*-hexano-EtOAc (85:15), produciendo un sólido que se identificó como lupenona (**100**, 15 mg) (Rf 0.69 *n*-hexano-AcOEt, 85:15), mediante los procedimientos usuales.

La fracción E (170 mg) fue separada mediante CC empacada con sílica gel, y eluida utilizando una mezcla *n*-hexano-AcOEt de polaridad creciente, obteniéndose 92 fracciones. La subfracción E₂₇-E₃₀ (20 mg) fue purificada mediante CCF preparativa obteniéndose tonantzitlolona (**38**, 8 mg) Rf 0.59 (*n*-hexano-AcOEt, 85:15), que al ser recrystalizados de acetona-éter isopropílico se obtuvieron cristales incoloros con pf. 172-173 °C. La subfracción E₃₈-E₄₇ (29 mg) se aplicó a una CCF preparativa, obteniéndose sitostenona (**101**, 9 mg) (Rf 0.42, *n*-hexano-AcOEt, 85:15). Las sustancias fueron identificadas mediante comparación directa de sus características físicas y espectroscópicas.

La Fracción F (440 mg) se separó mediante CC, empacada con sílica gel y eluida con un gradiente de *n*-hexano-AcOEt, obteniéndose 35 eluatos. La subfracción F₁₂-F₁₈ (64 mg) se aplicó a una CC empacada con sílica gel y se eluyó con una mezcla de *n*-hexano- AcOEt de polaridad creciente. Este procedimiento permitió la obtención de un residuo que fue purificado mediante cromatografía en placa preparativa, obteniéndose 19 β H-lupeol (**37**, 19 mg) (Rf 0.40, *n*-hexano-AcOEt, 85:15). En la subfracción F₂₄-F₂₉ se observó un sólido que fue filtrado y recrystalizado de

acetona-éter isopropílico, obteniéndose una mezcla de β -sitosterol (**27**) y estigmasterol (**28**, 72 mg) (Rf 0.26, *n*-hexano-AcOEt, 85:15).

De la fracción H se obtuvo un sólido el cual fue purificado mediante recristalización con una mezcla de metanol-CH₂Cl₂-eterdiisopropílico, obteniéndose un sólido blanco amorfo que fue caracterizado mediante RMN ¹H y por comparación con una muestra auténtica como el β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo (**95**, 38 mg) (Rf 0.31 (CH₂Cl₂-MeOH, 9:1)).

8.5.4. *Croton glabellus*

El extracto hexánico de las hojas de *C. glabellus* (201 g) se disolvió en hexano y se adsorbió en sílica gel 230-400 en una proporción 1:1. Posteriormente, este sistema se sometió a CC (650 g de sílica gel, *n*-hexano, *n*-hexano-AcOEt y MeOH). Como consecuencia de la elución se obtuvieron 265 fracciones de 500 mL cada una, las mismas que fueron agrupadas de acuerdo a su similitud cromatográfica en CCF.

Cuando se unificaron las fracciones 24-36 se aisló un sólido que es insoluble en hexano, este sólido se lavó con *n*-hexano frío y se lo identificó como alcohol carnafílico (1-tetatriacontanol, C₃₄H₇₀O).

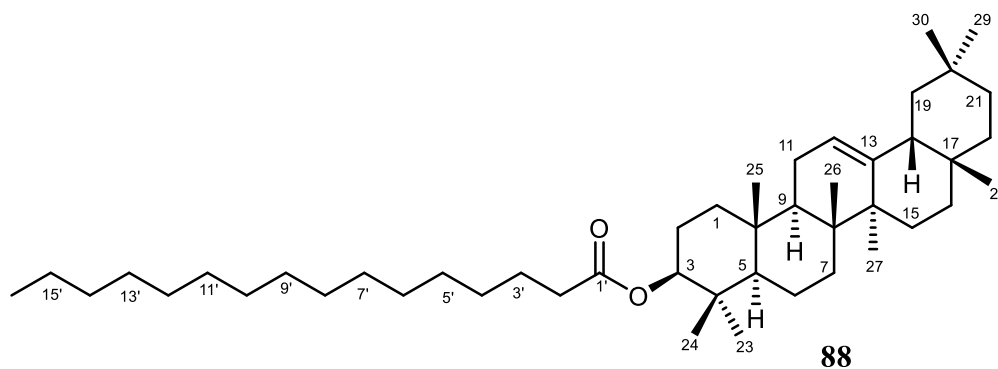
El residuo obtenido de las fracciones 37-55 (3.4 g) se adsorbió con la misma cantidad de sílice 230-400 y se aplicó a una columna con 100 g de sílice de las mismas características. Se utilizó como fase móvil *n*-hexano y mezclas de *n*-hexano-AcOEt de polaridad creciente hasta 8:2. Como resultado de este fraccionamiento secundario se obtuvieron 77 fracciones de 50 mL cada una. De la subfracción 32-52, se aisló una mezcla de β -sitosterol (**27**) y estigmasterol (**28**) en una proporción de 3.2:1.

La fracción 101-118 (6.4 g) del fraccionamiento primario se sometió a una CC empacada con 180 g de sílica gel 230-400 y se eluyó con *n*-hexano y mezcla de *n*-hexano-acetato de etilo de polaridad creciente hasta (1:1). Como resultado de este fraccionamiento secundario se obtuvieron 85 fracciones de 100 mL cada una. De la subfracción 39-50 se obtuvo un sólido que se recristalizó de acetona y posteriormente se lavó con *n*-hexano (frío). Este compuesto se identificó como 6-*O*-acetilaustronulina (**69**). De la subfracción 56-65 se aisló otro sólido que se hizo el mismo tratamiento, el cual se identificó como austronulina (**70**).

Finalmente, de la fracción 181-214, del fraccionamiento primario del extracto hexánico de *C. glabellus*, se obtuvo un sólido que fue identificado como β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo (**95**).

8.6. Características físicas y espectroscópicas de los productos naturales

8.6.1. Palmitato de β -amirilo (**88**)



Sólido blanco que forma cristales en forma de agujas finas.

Pf. 71-73 °C

IR (CHCl_3) ν_{max} cm^{-1} : 4214.95, 3680.47, 3020.14, 2927.20, 2856.80, 2400.60, 1719.17, 1598.82, 1523.92, 1471.38, 1424.38, 1215.32, 1015.92, 928.99, 850.73, 758.70, 669.35, 626.75, 454.0

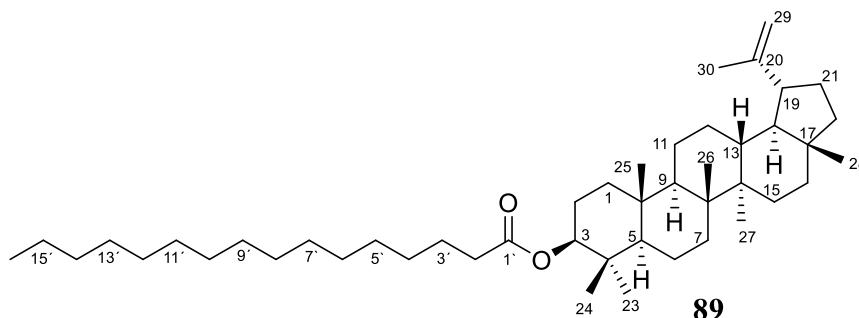
EMIE (70 eV) m/z (% ar) [Asig]: 664 (1) $[\text{M}]^+$, 649 (1) $[\text{M} - \text{CH}_3]^+$, 409 (6) $[\text{M} - \text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{O}_2]$, 218 (100) $[\text{C}_{16}\text{H}_{26}]^+$, 203 (38) $[\text{C}_{16}\text{H}_{26} - \text{CH}_3]^+$, 189 (19) $[\text{C}_{16}\text{H}_{26} - \text{C}_2\text{H}_5]^+$.

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): δ 5.18 (t, $J = 3.9$ Hz, H-12), 4.50 (dd, $J = 9.2, 6.8$ Hz, H-3), 2.29 (t, $J = 7.5$ Hz, H-2'), 1.25 (s, H4'-13'), 1.13 (s, CH_3 -27), 0.97 (s, CH_3 -26), 0.96 (s, CH_3 -25), 0.88 (m, CH_3 -23, CH_3 -24, CH_3 -29, CH_3 -30, CH_3 -16'), 0.83 (s, CH_3 -28).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz): δ 173.7 (C-1'), 145.2 (C-13), 121.6 (C-12), 80.5 (C-3), 55.2 (C-5), 47.5 (C-9), 47.2 (C-18), 46.7 (C-19), 41.7 (C-14), 39.8 (C-8), 38.2 (C-1), 37.7 (C-4), 37.1 (C-22), 36.8 (C-10), 34.9 (C-21), 34.7 (C-2'), 33.3 (C-29), 32.5 (C-7), 32.5 (C-17), 31.9 (C-14'), 31.1 (C-20), 29.7, 29.6, 29.4, 29.3, 29.2, 29.2, 28.4 (5'-13'), 28.0 (C-28), 26.9, 26.1 (C-12), 25.9 (C-27),

25.2 (C-3'), 23.7 (C-30), 23.6 (C-15'), 23.5 (C-11), 22.7 (C-2), 18.2 (C-6), 16.8 (C-26), 15.5 (C-25), 14.1(C-16') [57, 58].

8.6.2. Palmitato de lupeól (89)



Sólido blanco que forma cristales en forma de agujas finas.

Pf. 74-76 ° C

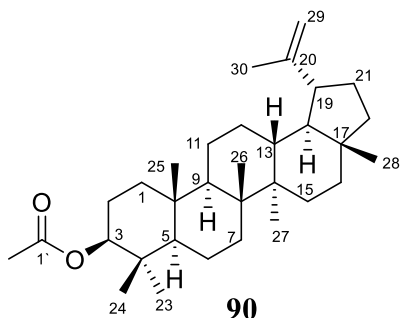
IR (CHCl₃) ν_{\max} cm⁻¹: 4214.62, 3675.73, 3019.98, 2928.61, 2861.53, 2400.46, 1716.81, 1601.17, 1522.04, 1473.74, 1423.99, 1215.43, 1018.28, 928.95, 850.73, 757.36, 669.40, 624.18, 454.28, 442.02.

EMIE (70 eV) m/z (% ar) [Asig]: 664 (19) [M]⁺, 649 (4) [M-CH₃]⁺, 623 (1) [M-C₃H₅]⁺, 608 (3) [M-C₄H₈]⁺, 593 (1) [M-C₅H₁₁]⁺, 409 (27) [M⁺-C₁₆H₃₂O₂]⁺, 218 (47) [C₁₆H₂₆]⁺, 189 (100) [C₁₄H₂₁]⁺, 161 (35) [C₁₂H₁₇]⁺, 135 (57) [C₁₀H₁₅]⁺.

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ 4.67 (d, $J = 2.5$ Hz, H-29b), 4.55 (dc, $J = 2.7, 1.5, 1.4, 1.4$ Hz, H-29a), 4.45 (dd, $J = 9.2, 6.8$ Hz, H-3), 2.35 (td, $J = 11, 11, 5.7$ Hz, H-19), 2.26 (t, $J = 7.5$ Hz, H-2'), 1.66 (s, CH₃-30), 1.61 (H-4'), 1.25 (s, H-5'- H-13'), 1.01 (s, CH₃-26), 0.92 (s, CH₃-27), 0.86 (m, CH₃-16'), 0.84 (s, CH₃-25), 0.82 (s, CH₃-23, CH₃-24), 0.77 (s, CH₃-28).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz): δ 173.7 (C-1'), 150.9 (C-20), 109.4 (C-29), 80.6 (C-3), 55.4 (C-5), 50.34 (C-9), 48.3 (C-18), 48.0 (C-19), 43.0 (C-17), 42.8 (C-14), 40.9 (C-8), 40.0 (C-22), 38.4 (C-1), 38.1 (C-13), 37.8(C-4), 37.1 (C-10), 35.6 (C-16), 34.9 (C-2'), 34.2 (C-7), 34.9 (C-2'), 34.2 (C-7), 31.9 (C-14'), 29.8-29.2 (C-4'- C-13'), 29.7 (C-21), 27.4 (C-15), 25.2 (C-3'), 25.1 (C-12), 23.7 (C-2), 22.7 (C-15'), 20.9 (C-11), 19.3 (C-30), 18.0 (C-28), 16.6 (C-24), 16.2 (C-25), 16.0 (C-26), 14.5 (C-27), 14.1 (C-16') [57, 59].

8.6.3. Acetato de lupeólo (**90**)



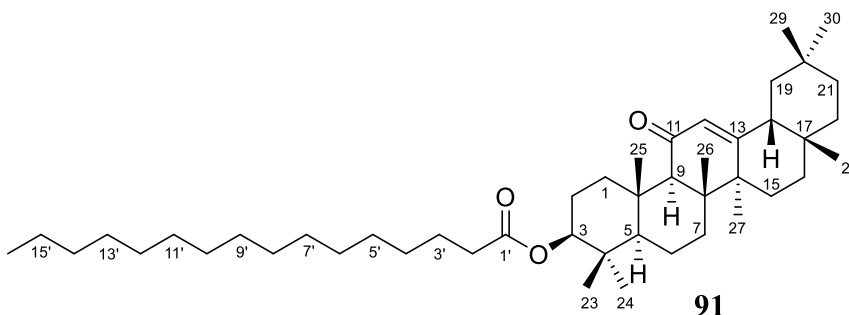
Sólido blanco que forma cristales en forma de agujas finas.

Pf. 216 - 218 ° C

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ 4.67 (d, *J* = 2.5 Hz, H-29b), 4.55 (dc, *J* = 2.7, 1.5, 1.4, 1.4 Hz, H-29a), 4.47 (dd, *J* = 9.2, 6.8 Hz, H-3), 2.37 (ddd, *J* = 11.0, 11.0, 5.7 Hz, H-19), 2.04 (s, *J* = 7.5 Hz, CH₃-2'), 1.69 (s, CH₃-30), 1.03 (s, CH₃-26), 0.94 (s, CH₃-27), 0.86 (s, CH₃-23), 0.85 (s, CH₃-24), 0.84 (s, CH₃-25), 0.79 (s, CH₃-28).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz): δ 171.0 (C-1'), 150.9 (C-20), 109.3 (C-29), 81.0 (C-3), 55.4 (C-5), 50.4 (C-9), 48.3 (C-18), 48.0 (C-19), 43.0 (C-17), 42.8 (C-14), 40.9 (C-8), 40.0 (C-22), 38.4 (C-1), 38.1 (C-13), 37.8 (C-4), 37.1 (C-10), 35.6 (C-16), 34.2 (C-7), 29.9 (C-21), 27.9 (C-23), 27.5 (C-15), 25.1 (C-12), 23.7 (C-2), 21.3 (C-2'), 21.0 (C-11), 19.3 (C-30), 18.2 (C-6), 18.0 (C-28), 16.5 (C-24), 16.2 (C-25), 16.0 (C-26), 14.5 (C-27) [60, 61].

8.6.4. Palmitato de 11-oxo-β-amirilo (**91**)



Sólido blanco que forma cristales en forma de agujas finas.

Pf. 148 - 150 ° C

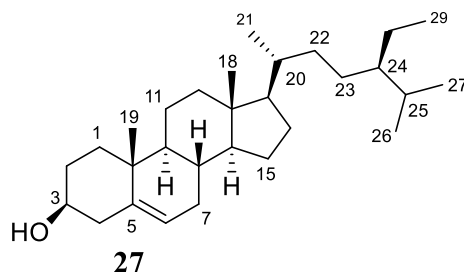
IR (CHCl₃) ν_{\max} cm⁻¹: 4214.64, 3684.20, 3019.87, 2927.64, 2855.97, 2400.46, 1718.04, 1653.84, 1522.00, 1423.95, 1215.55, 1020.07, 928.95, 753.98, 669.30, 626.69, 450.29.

EMIE (70 eV) m/z (% ar) [Asig]: 678 (15) [M]⁺, 663 (3) [M - CH₃]⁺, 651, 557, 551, 523, 495, 464, 440, 423 (31) [M - C₁₆H₃₁O₂]⁺, 407 (21) [M - C₁₆H₃₁O₂ - CH₃ - H]⁺, 273 (87) [C₁₉H₂₉O]⁺, 232 (100) [C₁₆H₂₄O]⁺, 217 (20) [C₁₆H₂₄O⁺ - CH₃]⁺, 175 (54) [C₁₃H₁₉]⁺.

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ 5.58 (s, H-12), 4.52 (dd, $J = 11.4, 5.1$ Hz, H-3), 2.36 (s, H-9), 2.29 (t, $J = 7.5$ Hz, H-2'), 1.62 (m, H-3'), 1.36 (s, CH₃), 1.25 (s, H-4'-H-13'), 1.16 (s, CH₃-28), 1.13 (s, CH₃-25), 0.90 (s, CH₃-27), 0.89 (s, CH₃-23), 0.88 (s, CH₃-24), 0.87 (s, CH₃-30), 0.86 (s, CH₃-29).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz): δ 200.1 (C-11), 173.6 (C-1'), 170.5 (C-13), 128.1 (C-12), 80.3 (C-3), 61.7 (C-9), 55.1 (C-5), 47.7 (C-18), 45.5 (C-14), 45.2 (C-19), 43.4 (C-8), 38.8 (C-1), 38.1 (C-4), 37.0 (C-10), 36.6 (C-22), 34.9 (C-2'), 34.5 (C-21), 33.1 (C-29), 32.8 (C-7), 32.4 (C-17), 31.9 (C-14'), 31.1 (C-20), 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2 (C-4' - C-13'), 28.8 (C-28), 28.1 (C-23), 26.5 (C-16), 26.4 (C-15), 25.2 (C-3'), 23.6 (C-2), 23.5 (C-30), 23.4 (C-27), 22.7 (C-15'), 18.8 (C-26), 17.4 (C-6), 16.8 (C-25), 16.4 (C-24), 14.1 (C-16') [57, 58].

8.6.5. β -sitosterol (27)



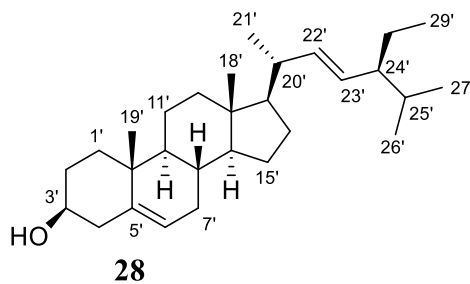
Sólido blanco que forma cristales en forma de agujas finas.

Pf. 131 - 133 ° C

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ 5.35 (1H, d, $J = 5.2$ Hz, H-6), 3.53 (1H, m, H-3), 1.01 (3H, s, H-19), 0.92 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-21), 0.85 (3H, t, $J = 6$ Hz, H-29), 0.84, 0.82 (2 CH₃, d, $J = 7.6$ Hz, H-26, H-27), 0.68 (3H, s, H-18).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz): δ 140.9 (C-5), 121.9 (C-6), 72.0 (C-3), 56.9 (C-14), 56.2 (C-17), 50.3 (C-9), 46.0 (C-24), 42.5 (C-4), 42.4 (C-13), 39.9 (C-12), 37.4 (C-1), 36.7 (C-10), 36.3 (C-20), 34.1 (C-22), 32.1 (C-7), 31.8 (C-2), 31.8 (C-8), 29.3 (C-25), 28.4 (C-16), 26.2 (C-23), 24.5 (C-15), 23.2 (C-28), 21.2 (C-11), 19.6 (C-26), 19.2 (C-19), 19.1 (C-27), 18.9 (C-21), 12.1 (C-29), 12.0 (C-18) [62].

8.6.6. Estigmasterol (28)



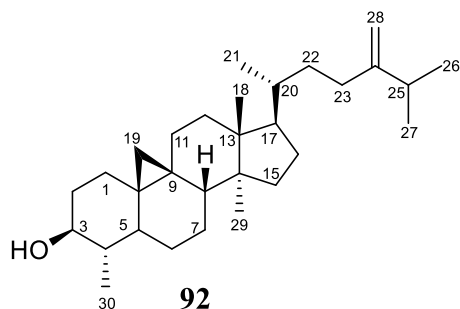
Sólido blanco que forma cristales en forma de agujas finas.

Pf. 131 - 133 ° C

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ 5.35 (1H, d, *J* = 5.2 Hz, H-6'), 5.16 (1H, dd, *J* = 15.1, 8.4 Hz, H-23'), 5.02 (1H, dd, *J* = 15.0, 8.4 Hz, H-22'), 3.53 (1H, dddd, *J* = 10.6, 10.6, 4.6, 4.6 Hz, H-3), 1.03 (3H, s, CH₃-21), 1.01 (3H, s, CH₃-19), 0.85 (3H, s, CH₃-26), 0.83 (3H, t, *J* = 6.8 Hz, CH₃-29), 0.80 (6H, s, CH₃-27, CH₃-28), 0.70 (3H, s, CH₃-18).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz): δ 140.9 (C-5), 138.5 (C-22), 129.4(C-23), 121.9 (C-6), 72.0 (C-3), 57.0 (C-14), 56.2 (C-17), 51.4 (C-24), 50.3 (C-9), 42.5 (C-4), 42.4 (C-13), 40.6 (C-20), 39.9 (C-12), 37.4 (C-1), 36.7 (C-10), 32.1 (C-7, C-8, C-25), 31.8 (C-2), 29.1 (C-16), 25.6 (C-28), 24.5(C-15), 21.4 (C-26), 21.3 (C-11, C-21), 19.6 (C-19), 19.1 (C-27), 12.4 (C-29), 12.2 (C-18) [63].

8.6.7. Cicloeucalenol (92)



Sólido blanco amorfo

Pf. 105-110 °C

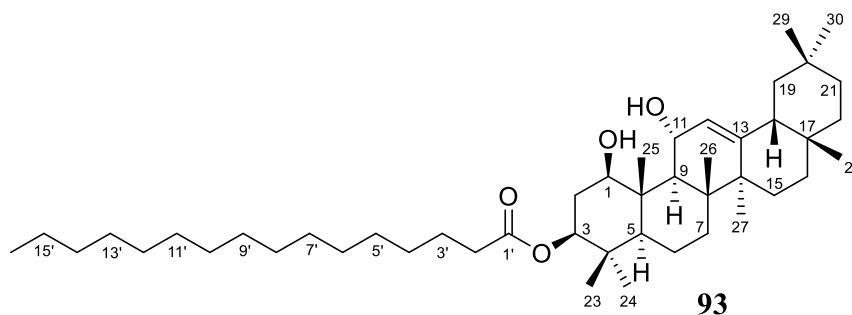
IR (CHCl₃) ν_{\max} cm⁻¹: 4214.78, 3020.13, 2923.07, 2852.07, 2397.63, 1520.94, 1421.82, 1215.61, 1027.72, 928.61, 850.73, 757.40, 669.55, 470.79, 461.35, 442.47.

EMIE (70 eV) m/z (% ar) [Asig]: 426 (3) [M]⁺, 411 (4) [M-CH₃]⁺, 408 (6) [M-H₂O]⁺, 393 (5) [M-CH₃-H₂O]⁺, 340 (2) [C₂₅H₄₀]⁺.

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ 4.71 (1H, s, H-28a), 4.66 (1H, d, J = 1.4 Hz, H-28a), 3.21 (1H, ddd, J = 10.7, 9.1, 4.7, H-3), 2.23 (1H, dt, J = 13.2, 7.0, 7.0, H-25), 2.13 (1H, ddd, J = 15.4, 9.5, 3.8, H-23), 1.03 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-27), 1.01 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-26), 0.98 (1H, s, H-30), 0.97 (1H, s, H-18), 0.89 (1H, s, H-29), 0.38 (1H, d, J = 3.9 Hz, H-19b), 0.14 (1H, d, J = 4.1 Hz, H-19a).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz): δ 156.9 (C-24), 105.91 (C-28), 76.6 (C-3), 52.2 (C-17), 48.9 (C-14), 46.9 (C-8), 45.3 (C-13), 44.6 (C-4), 43.3 (C-5), 36.1 (C-20), 35.3 (C-15), 35.0 (C-22), 34.8 (C-2), 33.80 (C-25), 32.9 (C-12), 31.3 (C-23), 30.8 (C-1), 29.7 (C-10), 28.1 (C-16), 27.2 (C-19), 27.0 (C-11), 25.2 (C-7), 24.7 (C-6), 23.5 (C-9), 22.0 (C-26), 21.9 (C-27), 19.1 (C-29), 18.33 (C-21), 17.8 (C-18), 14.4 (C-30) [64].

8.6.8. 3 β -palmitoiloxi-1 β ,11 α -dihidroxi-olean-12-eno (**93**)



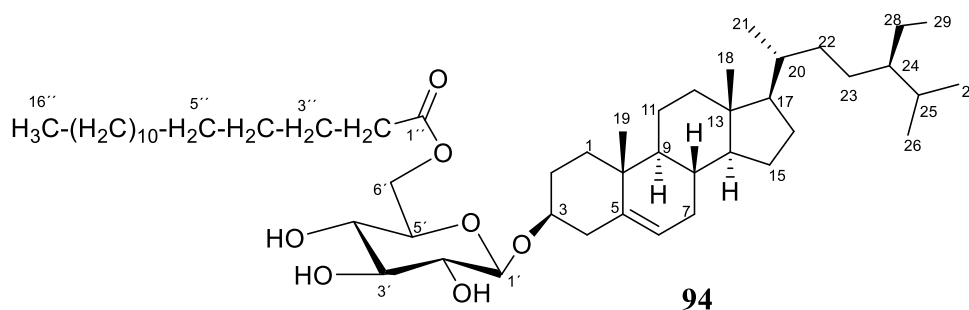
Sólido blanco que forma cristales en forma de agujas finas.

Pf. 222 – 224 °C

EMIE (70 eV) m/z (% ar) [Asig]: 678 (65) $[M-H_2O]^+$, 663 (4) $[M-H_2O-CH_3]^+$, 423 (42) $[M-H_2O-C_{16}H_{31}O_2]^+$, 422 (63) $[M-H_2O-C_{16}H_{31}O_2-H]^+$, 407 (29) $[M-H_2O-C_{16}H_{31}O_2-CH_3-H]^+$, 255 (28) $[C_{16}H_{31}O_2]^+$, 217 (100) $[C_{16}H_{25}]^+$.

RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz): **RMN ^{13}C** ($CDCl_3$, 100 MHz): Ver datos en la tabla N° 1 [65, 67].

8.6.9. 6'-Palmitoil- β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo (**94**)

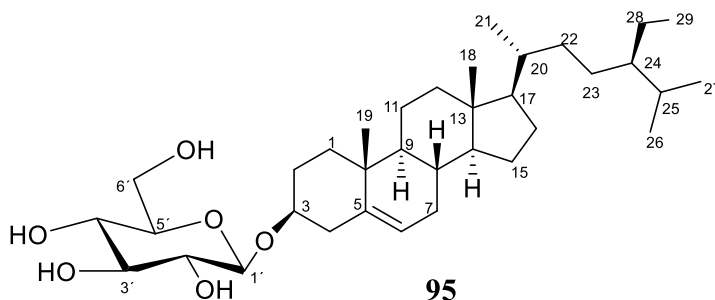


RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 5.36 (1H, d, $J = 4.2$ Hz, H-6), 4.42 (1H, dd, $J = 12.1, 5.4$ Hz, H6'b), 4.38 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-1'), 4.28 (1H, dd, $J = 12.1, 1.7$, H-6'a), 3.58 (1H, dd, $J = 8.7, 9.9$ Hz, H-3'), 3.54 (1H, m, H-3), 3.39 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-4'), 3.35 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-2'), 2.36 (1H, m, H-4b), 2.34 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, H-2''), 1.86 (1H, d, $J = 3.6$ Hz, H-16b), 1.84 (1H, d, $J = 3.2$ Hz, H-16a), 1.26 (bs, H-5''-14''), 1.00 (1H, s, H-22a), 1.00 (3H, s, H-19), 0.93 (m, H-9), 0.91 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-21), 0.88 (3H, t, $J = 7.1$ Hz, H-16''), 0.84 (3H, t, $J = 7.6$ Hz, H-29), 0.83 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-27), 0.81 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-26), 0.68 (3H, s, H-18)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 174.72 (C-1''), 140.45 (C-5), 122.29 (C-6), 101.37 (C-1'), 79.78 (C-3), 76.19 (C-3'), 74.03 (C-5'), 73.67 (C-2'), 70.34 (C-4'), 63.48 (C-6'), 56.91 (C-14), 56.26

(C-17), 50.30 (C-9), 45.97 (C-24), 42.48 (C-13), 39.76 (C-12), 37,42 (C-1), 36,86 (C-10), 36,31(C-20), 32.09 (C-7), 32.01(C-14''), 29.90, 29.83, 29.75 (C-5'''- 12''), 29.39 (C-13''), 29.29 (C-4''), 28.40 (C-16), 26.27 (C-23), 24.45 (C-15), 23.21 (C-28), 22.85 (C-15''), 21.22 (C-11), 19.96 (C-27), 19.50 (C-19), 19.17 (C-26), 18.93 (C-21), 14.27 (C-16''), 12.12 (C-29), 12.00 (C-18) [69].

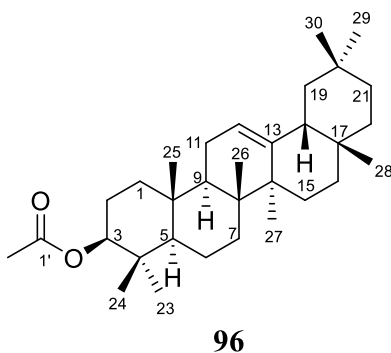
8.6.10. β -D-Glucopiranosido de β -sitosterilo (**95**)



RMN ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 300 MHz): δ 5.37 (1H, d, $J = 4.2$ Hz, H-6), 5.01 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1'), 4.61 (1H, dd, $J = 11.7, 2.4$ Hz, H-6'b), 4.45 (1H, dd, $J = 11.7, 5.2$ Hz, H6'a), 4.33 (1H, dd, $J = 5.2, 3.6$ Hz, H-3'), 4.10 (1H, m, H-4'), 4.02 (1H, m, H-2'), 1.05 (1H, d, $J = 7$ Hz), 1.01(3H, d, $J = 6.5$ Hz, CH_3 -21), 0.95-0.87 (9H, CH_3 -26, CH_3 -27, CH_3 -29), 0.68 (3H, s, CH_3 -18).

RMN ^{13}C ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 75 MHz): δ 141.4 (C-5), 122.4 (C-6), 79.1 (C-3), 57.3 (C-14), 56.7 (C-17), 50.8 (C-9), 46.5 (C-24), 43.0 (C-13), 40.4 (C-12), 39.8 (C-1), 38.0 (C-10), 37.4 (C-20), 36.9 (C-22), 34.7 (C-7), 32.7 (C-8), 32.5 (C-2), 30.7 (C-25), 29.9 (C-16), 29.0 (C-23), 26.8 (C-15), 25.0 (C-28), 23.9 (C-11), 21.8 (C-26), 19.9 (C-19), 19.7 (C-27), 19.5 (C-21), 12.6 (C-29), 12.5 (C-18), 103.1 (C-1'), 79.0 (C-3'), 78.5 (C-5'), 75.8 (C-2'), 72.2 (C-4'), 63.3 (C-6') [70].

8.6.11. Acetato de β -amirilo (**96**)

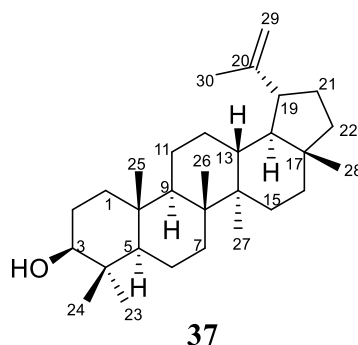


Sólido blanco que forma cristales en forma de agujas finas.

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): δ 5.18 (1H, dd, $J = 3.6, 3.6$ Hz, H-12), 4.50 (1H, dd, $J = 8.3, 7.3$ Hz, H-3 α), 2.05 (3H, s, CH_3 -2'), 1.13 (3H, s, H-27), 0.969 (3H, s, H-26), 0.964 (3H, s, H-25), 0.875 (6H, s, H-29, H-30), 0.870 (3H, s, H-24), 0.866 (3H, s, H-23), 0.83 (3H, s, H-28), 0.79 (1H, m, H-5).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz): δ 171.0 (C-1'), 21.3 (C-2'), 145.2 (C-13), 121.6 (C-12), 80.9 (C-3), 55.2 (C-5), 47.5 (C-9), 47.2 (C-18), 46.7 (C-19), 41.7 (C-14), 39.8 (C-8), 38.8 (C-4), 38.6 (C-1), 37.1 (C-10), 36.9 (C-22), 34.7 (C-21), 33.3 (C-29), 32.6 (C-7), 32.5 (C-17), 31.1 (C-20), 28.4 (C-28), 28.0 (C-23), 27.2 (C-2), 26.9 (C-16), 26.1 (C-15), 25.9 (C-27), 23.7 (C-30), 23.5 (C-11), 18.3 (C-6), 16.8 (C-26), 16.7 (C-25), 15.5 (C-24) [60, 71, 72].

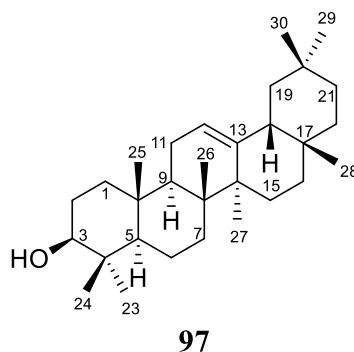
8.6.12. 19 β H- lupeol (37)



RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): δ 4.69 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-29b), 4.57 (1H, dd, $J = 2.6, 1.4$ Hz, H-29a), 3.19 (1H, dd, $J = 11.0, 5.2$ Hz, H-3), 2.38 (1H, ddd, $J = 10.9, 10.8, 5.5$ Hz, H-19), 1.92 (1H, m, H-21b), 1.68-1.66 (7H, m, H-1b, H-12b, H-13a, H-15b, CH_3 -30), 1.58 (1H, m, H-2b), 1.40 (1H, dd, $J = 9.3, 1.6$ Hz, H-22b), 1.25 (1H, s, H-9), 1.03 (3H, s, CH_3 -26), 0.97 (3H, s, CH_3 -23), 0.94 (3H, s, CH_3 -27), 0.83 (3H, s, CH_3 -25), 0.79 (3H, s, CH_3 -28), 0.76 (3H, s, CH_3 -24), 0.68 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-5).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz): δ 151.0 (C-20), 109.3 (C-29), 79.0 (C-3), 55.3 (C-5), 50.4 (C-9), 48.3 (C-18), 48.0 (C-19), 43.0 (C-17), 42.8 (C-14), 40.8 (C-8), 40.0 (C-22), 38.8 (C-4), 38.7 (C-1), 38.0 (C-13), 37.1 (C-10), 35.6 (C-16), 34.2 (C-7), 29.8 (C-21), 29.7 (C-23), 28.0 (C-15), 27.4 (C-2), 25.1 (C-12), 20.9 (C-11), 19.3 (C-30), 18.3 (C-6), 18.0 (C-28), 16.1 (C-25), 16.0 (C-26), 15.4 (C-24), 14.5 (C-27) [73].

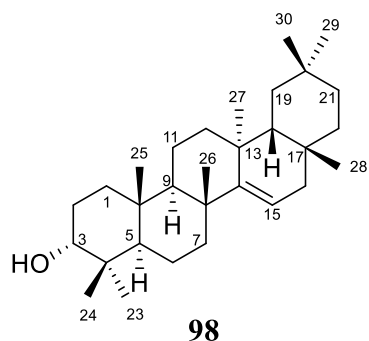
8.6.13. β - amirina (97)



RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): δ 5.18 (1H, t, $J = 3.6$ Hz, H-12), 3.22 (1H, dd, $J = 10, 6$ Hz, H-3 α), 1.13 (s, H-27), 0.998 (s, H-23), 0.966 (3H, m, H-26), 0.936 (3H, m, H-25), 0.87 (6H, s, H-29, H-30), 0.866 (3H, s, H-23), 0.83 (3H, s, H-28), 0.79 (3H, s, H-24), 0.68 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, H-5).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz): δ 145.2 (C-13), 121.7 (C-12), 79.0 (C-3), 55.3 (C-5), 47.6 (C-9), 47.2 (C-18), 46.8 (C-19), 41.7 (C-14), 39.8 (C-8), 38.8 (C-4), 38.6 (C-1), 37.1 (C-10), 36.9 (C-22), 34.7 (C-21), 33.3 (C-29), 32.6 (C-7), 32.5 (C-17), 31.1 (C-20), 28.4 (C-28), 28.1 (C-23), 27.2 (C-2), 26.9 (C-16), 26.1 (C-15), 26.0 (C-27), 23.7 (C-30), 23.5 (C-11), 18.3 (C-6), 16.8 (C-26), 15.6 (C-25), 15.5 (C-24) [71, 72].

8.6.14. *epi*-Taraxerol (98)

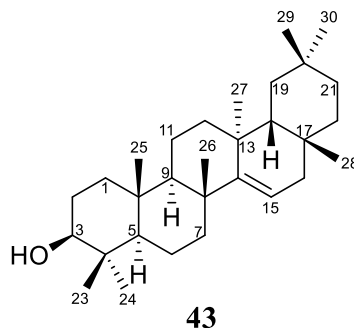


Pf. 268-270 °C

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): δ 5.52 (1H, dd, $J = 8.1, 3.4$ Hz, H-15), 3.40 (1H, dd, $J = 2.6, 2.6$ Hz, H-3), 1.09 (3H, s, H-26), 0.95 (6H, s, H-25, H-29), 0.94 (3H, s, H-24), 0.91 (6H, s, H-27, H-30), 0.86 (3H, s, H-23), 0.82 (3H, s, H-28).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz): δ 158.16 (C-14), 116.74 (C-15), 76.24 (C-3), 49.25 (C-9), 49.25 (C-5), 48.93 (C-18), 41.23 (C-7), 39.16 (C-8), 38.04 (C-10), 37.71 (C-4), 37.71 (C-16), 37.52 (C-13), 36.67 (C-19), 35.11 (C-17), 35.11 (C-22), 33.75 (C-12), 33.35 (C-29), 33.10 (C-21), 32.24 (C-1), 29.94 (C-30), 29.82 (C-28), 28.82 (C-20), 28.21 (C-23), 26.07 (C-26), 25.06 (C-2), 22.19 (C-24), 21.25 (C-27), 18.75 (C-6), 17.45 (C-11), 15.24 (C-25) [74].

8.6.15. Taraxerol (43)

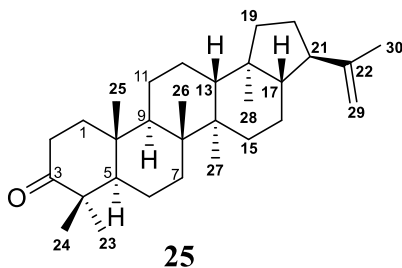


Pf. 273-275 °C

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): δ 5.53 (1H, dd, $J = 8.2, 3.2$ Hz, H-15), 3.20 (1H, dd, $J = 10.7, 4.9$ Hz, H-3), 2.03 (1H, dt, $J = 12.5, 2.8$ Hz, H-7a), 1.92 (1H, dd, $J = 14.7, 2.9$ Hz, H-16a), 1.09 (3H, s, H-26), 0.98 (3H, s, H-23), 0.95 (3H, s, H-29), 0.93 (3H, s, H-25), 0.91 (3H, s, H-27), 0.90 (3H, s, H-30), 0.82 (3H, s, H-28), 0.80 (3H, s, H-24).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz): δ 158.08 (C-14), 116.9 (C-15), 79.08 (C-3), 55.51 (C-5), 49.27 (C-9), 48.73 (C-18), 41.31 (C-19), 38.95 (C-8), 38.75 (C-17), 37.98 (C-4), 37.71 (C-12), 37.55 (C-10), 36.77 (C-13), 36.66 (C-1), 35.10 (C-16), 33.34 (C-21), 33.34 (C-29), 33.08 (C-22), 29.91 (C-28), 29.81 (C-27), 29.69 (C-7), 28.79 (C-20), 27.98 (C-23), 27.12 (C-2), 25.90 (C-26), 21.30 (C-30), 18.78 (C-6), 17.49 (C-11), 15.42 (C-24), 15.42 (C-25) [75].

8.6.16. 3-Oxo-21 α H-hop-22(29)-eno (25, moretenona)



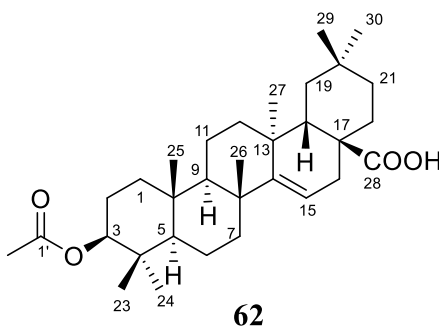
Sólido blanco que forma cristales en forma de aguja.

Pf. 218 °C

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 4.70 (1H, dc, *J* = 2.8, 1.4 Hz, H-29b), 4.68 (1H, d, *J* = 2.4, 0.8 Hz, H-29a), 2.51 (1H, ddd, *J* = 15.6, 10.1, 7.4 Hz, H-2a), 2.40 (1H, ddd, *J* = 15.6, 7.4, 4.4 Hz, H-2b), 2.25 (1H, ddd, *J* = 11.9, 10.2, 7.1 Hz, H-21), 1.93 (1H, ddd, *J* = 13.1, 7.4, 4.3 Hz, H-1a), 1.85 (1H, m, H-20a), 1.68 (3H, dd, *J* = 1.5, 0.8 Hz, H-30), 1.32 (1H, m, H-5), 1.08 (3H, s, H-23), 1.04 (1H, m, H-17), 1.03 (3H, s, H-24), 1.02 (3H, s, H-26), 0.95 (3H, d, *J* = 0.9 Hz, H-27), 0.94 (3H, d, *J* = 0.9 Hz, H-25), 0.69 (3H, d, *J* = 1.1 Hz, H-28).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 218.09 (C-3), 148.11 (C-22), 109.49 (C-29), 54.87 (C-5), 53.87 (C-17), 49.74 (C-9), 48.83 (C-13), 47.87 (C-21), 47.37 (C-4), 44.20 (C-18), 42.33 (C-14), 41.67 (C-8), 40.20 (C-19), 39.59 (C-1), 36.85 (C-10), 34.19 (C-2), 32.67 (C-7), 27.35 (C-20), 26.59 (C-23), 23.93 (C-12), 21.60 (C-11), 21.12 (C-24), 20.84 (C-16), 19.77 (C-6), 19.67 (C-30), 16.50 (C-26), 15.77 (C-25), 15.17 (C-28) [76, 77].

8.6.17. Ácido 3-acetilaleuritólico (62)



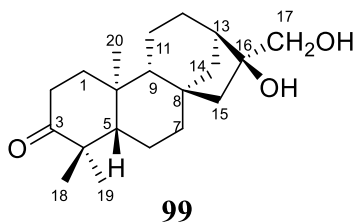
Sólido blanco

Pf: > 300 °C

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ 5.52 (1H, dd, *J* = 8.0, 3.5 Hz, H-15), 4.46 (1H, dd, *J* = 10.5, 5.5 Hz, H-3 α), 2.37 (1H, dd, *J* = 14.5, 8.0 Hz, H-16 α), 2.28 (1H, dd, *J* = 14.0, 2.5 Hz, H-18), 2.04 (3H, s, OCO-CH₃), 1.97 (1H, ddd, *J* = 12.5, 3.5, 3.0 Hz, H-7 α), 1.93 (1H, dd, *J* = 14.5, 3.5 Hz, H-16 β), 0.957 (3H, s, H-26), 0.953 (3H, s, H-25), 0.939 (3H, s, H-29), 0.922 (3H, s, H-30), 0.915 (3H, s, H-27), 0.88 (3H, s, H-24), 0.85 (3H, s, H-23).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz): δ 183.5 (-COOH), 170.9 (-OCO-CH₃), 160.6 (C-14), 116.8 (C-15), 80.9 (C-3), 55.6 (C-5), 51.4 (C-17), 49.1 (C-9), 41.5 (C-18), 40.8 (C-7), 39.0 (C-8), 37.9 (C-10), 37.7 (C-4), 37.4 (C-13), 37.3 (C-1), 35.4 (C-19), 33.7 (C-21), 33.3 (C-12), 31.9 (C-29), 31.4 (C-16), 30.7 (C-22), 29.7 (C-15), 29.3 (C-20), 28.6 (C-30), 27.9 (C-23), 26.1 (C-26), 23.5 (C-2), 22.4 (C-27), 21.3 (OCO-CH₃), 18.7 (C-6), 17.3 (C-11), 16.6 (C-24), 15.6 (C-25) [78].

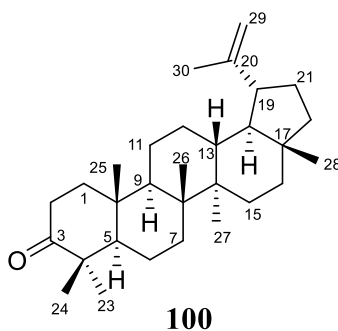
8.6.18. 16β,17-dihidroxi-*ent*-kauran-3-ona (99)



RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 3.49 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-17a), 3.41 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-17b), 2.48 (2H, dd, $J = 8.6, 6.3$ Hz, H-2), 2.11 (1H, ddd, $J = 3.2, 3.2, 2.8$ Hz, H-13), 2.05 (1H, m, H-1a), 2.04 (1H, m, H-11a), 1.94 (1H, dd, $J = 12.3, 1.9$ Hz, H-7a), 1.82 (1H, m, H-12a), 1.59 (1H, m, H-11b), 1.55 (1H, m, H-12b), 1.48 (2H, m, H-14), 1.45 (2H, m, H-15), 1.45 (2H, m, H-6), 1.44 (1H, m, H-1b), 1.43 (2H, m, H-9), 1.22 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-5), 1.09 (3H, s, H-20), 1.08 (3H, s, H-18), 1.07 (1H, m, H-7b), 1.03 (3H, s, H-19).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 218.2 (C-3), 79.7 (C-16), 69.8 (C-17), 55.6 (C-5), 54.3 (C-9), 52.2 (C-15), 47.1 (C-4), 43.3 (C-8), 40.8 (C-6), 40.6 (C-13), 39.3 (C-1), 38.5 (C-10), 37.8 (C-7), 34.0 (C-2), 27.3 (C-18), 26.6 (C-12), 21.2 (C-14), 20.9 (C-19), 19.3 (C-11), 17.6 (C-20) [79, 80].

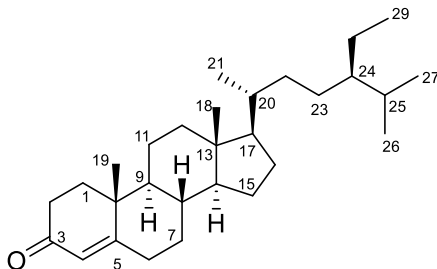
8.6.19. Lupenona (100)



RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 4.63 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-29b), 4.50 (1H, dd, *J* = 2.6, 1.4 Hz, H-29a), 2.35 (1H, m, H-19), 1.62 (3H, s, H-30), 1.50 (1H, s, H-2b), 1.37 (1H, s, H-11), 1.00 (3H, s, CH₃-26), 0.96 (6H, s, CH₃-23, CH₃-27), 0.81 (3H, s, CH₃-25), 0.79 (3H, s, CH₃-24), 0.73 (3H, s, CH₃-28).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 218.4 (C-3), 151.1 (C-20), 109.6 (C-29), 55.1 (C-5), 49.9 (C-9), 48.4 (C-18), 48.1 (C-19), 47.5 (C-4), 43.2 (C-17), 43.1 (C-14), 40.9 (C-8), 40.1 (C-22), 39.8 (C-1), 38.3 (C-13), 37.0 (C-10), 35.7 (C-16), 34.3 (C-2), 33.7 (C-7), 29.9 (C-21), 27.6 (C-15), 26.8 (C-23), 25.3 (C-12), 21.6 (C-11), 21.2 (C-24), 19.8 (C-6), 19.5 (C-30), 18.2 (C-28), 16.1 (C-25), 15.9 (C-26), 14.6 (C-27) [81].

8.6.20. Sitostenona (101)

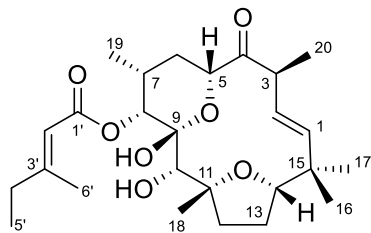


101

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 5.72 (1H, s, H-4), 1.18 (3H, s, H - 19), 0.92 (3H, d, *J* = 8 Hz, H-21), 0.85 (3H, s, H-29), 0.83 (3H, d, *J* = 4 Hz, H-26), 0.81 (3H, s, H-27), 0.71 (3H, s, H-18).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 199.9 (C-3), 171.9 (C-5), 123.9 (C-4), 56.7 (C-1), 56.2 (C-14), 56.0 (C-17), 54.0 (C-9), 45.97 (C-24), 42.5 (C-13), 39.8 (C-12), 38.8 (C-10), 36.3 (C-20), 35.8 (C-8), 34.1 (C-22), 34.0(C-7), 33.1 (C-6), 32.2 (C-2), 29.3 (C-23), 28.4 (C-16), 26.2 (C-25), 24.3 (C-15), 23.21 (C-28), 21.2 (C-11), 19.97 (C-27), 19.2 (C-19), 18.9 (C-21), 17.54 (C-26), 12.1 (C-18, C-29) [82, 83].

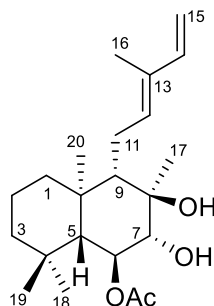
8.6.21. Tonantzitlolona (38)



38

Ver los datos de RMN ^1H y ^{13}C en la tabla N $^{\circ}$ 2.

8.6.22. 6-O-Acetilaustroulinina (69)



31

Sólido blanco.

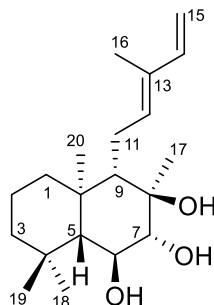
IR (CHCl_3 , cm^{-1}) ν_{max} : 3580 (O-H), 3031, 3008 (C=C-H), 2932, 2875(C-H), 1726 (C=O), 1253 (C-O), 1641, 1592, 975 y 909 (C=C).

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ 6.87 (1H, ddd, $J = 17.2, 10.8, 0.8$ Hz, H-14), 5.45 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, H-12), 5.20 (1H, dd, $J = 17.2, 0.8$ Hz, H-15a), 5.14 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-6a), 5.11 (1H, dd, $J = 10.8, 0.8$ Hz, H-15b), 3.47 (1H, d, $J = 10$ Hz, H-7b), 2.48 (1H, ddd, $J = 15.6, 5.6, 1.2$ Hz, H-11a), 2.23 (1H, dt, $J = 16.0, 6.4$, Hz, H-11b), 2.13 (3H, s, H-2'), 1.79 (3H, d, $J = 1.2$ Hz, H-16), 1.62 (1H, dtd, $J = 12.8, 3.6, 1.6$ Hz, H-1a), 1.53 (1H, ddt, $J = 13.2, 7.2, 3.6$ Hz, H-2a), 1.405 (1H, d, $J = 11.6$ Hz, H-5b), 1.402 (1H, dt, $J = 14.8, 4.0$ Hz, H-2b), 1.39 (1H, t, $J = 4.4$, H-9b), 1.34 (1H, dddt, $J = 13.6, 8.4, 3.2, 1.6$ Hz, H-3a), 1.233 (1H, dd, $J = 12.8, 4.4$ Hz, H-3b), 1.232 (3H, s, H-17), 1.02 (3H, s, H-18), 0.97 (3H, s, H-20), 0.88 (3H, s, H-19).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ 171.8 (C-1'), 133.6 (C-12), 133.2 (C-14), 131.0 (C-13), 113.8 (C-15), 83.7 (C-7), 76.9 (C-8), 73.2 (C-6), 59.2 (C-9), 56.5 (C-5), 43.4 (C-3), 39.8 (C-1), 39.4 (C-10),

36.0 (C-18), 33.3 (C-4), 22.8 (C-11), 22.2 (C-19), 21.8 (C-2'), 19.9 (C-16), 19.5 (C-17), 18.0 (C-2), 16.8 (C-20) [54].

8.6.23. Austroinulina (70)



70

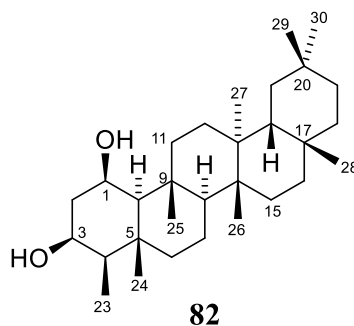
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 6.87 (1H, ddd, *J* = 17.2, 10.8, 0.8 Hz, H-14), 5.45 (1H, t, *J* = 7.2, H-12), 5.20 (1 H, dd, *J* = 17.2, 0.8, H-15a), 5.11 (1H, dd, *J* = 10.0, 2.4, H-15b), 3.64 (1H, *J* = 10.9, 9.5 Hz, H-6), 3.38 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-7), 2.49 (1H, dtd, *J* = 15.6, 5.6, 1.2, H-11a), 2.23 (1H, dt, *J* = 16,6.4, H-11b), 1.80 (3H, d, *J* = 1.6, H-16), 1.63 (1H, dtd, *J* = 12.8, 3.6, 1.6, H-1a), 1.53 (1H, dtd, *J* = 13.2, 7.2, 3.6, H-2a), 1.41 (1H, d, *J* = 11.6, H-5b), 1.40 (1H, dt, *J* = 14.8, 4.0, H-2b), 1.39 (1H, *J* = 4.4, H-9b), 1.35 (1H, dddd, *J* = 13.6, 8.5, 3.2, 1.6, H-3a), 1.19 (3H, s, H-17), 1.17 (3H, s, H-18), 1.01 (3H, s, H-20), 0.94 (1H, td, *J* = 13.4, 4.4, H-1b), 0.91 (3H, s, H-18).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 133.7 (C-12), 133.4 (C-14), 131.0 (C-13), 113.7 (C-15), 85.0 (C-7), 77.1 (C-8), 71.7 (C-6), 59.6 (C-9), 57.3 (C-5), 43.4 (C-3), 39.9 (C-1), 39.1 (C-10), 36.4 (18), 33.8 (C-4), 22.8 (C-11), 22.1 (C-19), 19.9 (C-16), 19.4 (C-17), 18.2 (C-2), 16.9 (C-20) [54].

8.7. Preparación, propiedades físicas y espectroscópicas de los derivados semisintéticos

8.7.1. Preparación de derivados de la 1β-hidroxifriedelina (76)

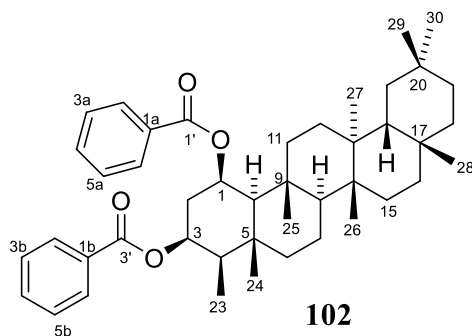
A una solución de **76** (50 mg, 0.11 mmol) en THF-H₂O (3:0.1 mL) se adicionó NaBH₄ (9.41 mg, 0.25 mmol) y se mantuvo en agitación constante a reflujo. Después de completada la reacción (3 h), se agregó agua destilada (3 mL) y la mezcla se agitó durante 5 min a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se extrajo con CH₂Cl₂ (3 × 10 mL), las fases orgánicas se reunieron, se secaron con Na₂SO₄ anhidro y se concentraron a presión reducida en rotavapor. El material crudo fue purificado por CCG (*n*-hexano/AcOEt, 8:2) obteniéndose **82** (47.8 mg, 95.2 %) [54].



RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ 4.48 (1H, sa, H-1), 3.87 (1H, d, *J* = 2.8 Hz, H-3), 2.64 (1H, d, *J* = 7.0 Hz, OH-1), 2.32 (1H, d, *J* = 6.0 Hz, OH-3), 2.21 (1H, ddd, *J* = 14.5, 2.8, 2.8 Hz, H-2a), 1.76 (1H, ddd, *J* = 13.0, 3.5, 3.0 Hz, H-6a), 1.69 (1H, ddd, *J* = 15.0, 3.5, 3.0 Hz, H-2b), 1.32 (1H, sa, H-4), 1.28 (3H, s, H-24), 1.29 (3H, s, H-25), 1.17 (3H, s, H-28), 1.04 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, H-23), 1.03 (3H, s, H-26), 1.00 (3H, s, H-29), 0.99 (3H, s, H-27), 0.94 (3H, s, H-30), 0.88 (1H, sa, H-10).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz): δ 74.1 (C-3), 68.4 (C-1), 61.8 (C-10), 53.8 (C-8), 49.5 (C-4), 44.4 (C-6), 42.8 (C-18), 41.9 (C-2), 39.7 (C-13), 39.3 (C-22), 38.4 (C-9), 38.1 (C-14), 37.9 (C-5), 36.1 (C-16), 35.5 (C-11), 35.3 (C-19), 35.0 (C-30), 32.8 (C-21), 32.4 (C-15), 32.1 (C-28), 31.8 (C-29), 30.5 (C-12), 30.0 (C-17), 28.2 (C-20), 20.0 (C-26), 19.4 (C-25), 18.7 (C-27), 18.4 (C-24), 17.8 (C-7), 12.0 (C-23).

En un matraz bola de dos bocas (10 mL), se colocó el compuesto **82** (7.5 mg), previamente preparado a partir de **76** [54]. Al matraz se le adicionó piridina anhidra (1.0 mL) y cloruro de benzoílo (0.5 mL). La mezcla de reacción se dejó bajo agitación constante a temperatura ambiente durante 72 h. La formación de los productos se monitoreó por CCF. Después del procesamiento usual de la mezcla de reacción, el residuo se purificó por una columna cromatográfica, utilizando como sistema de elución *n*-hexano-AcOEt. Del proceso cromatográfico se obtuvo el derivado 1β,3β-dibenzoiloxifriedelano (**102**) (5.6 mg, 50.6%). El compuesto **82**, así como también los otros derivados semisintéticos, preparados a partir de la 1β-hidroxifriedelina según lo informado por Reyes y col. [54], fueron evaluados con respecto a su actividad antiinflamatoria.

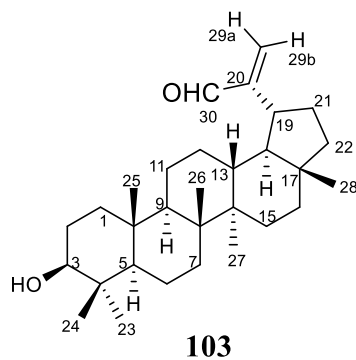


RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): δ 7.92 (2H, dd, $J = 8.3, 1.2$ Hz, H-2a, H-6a), 7.86 (2H, dd, $J = 8.3, 1.2$ Hz, H-2b, H-6b), 7.44 (1H, m, H-4a), 7.40 (1H, m, H-4b), 7.26 (2H, dd, $J = 7.6, 7.6$ Hz, H-3a, H-5b), 7.20 (2H, dd, $J = 7.8, 7.8$ Hz, H-3b, H-5b), 5.83 (1H, sa, H-1), 5.28 (1H, sa, H-3), 1.62 (3H, s, H-24), 1.17 (3H, s, H-28), 1.14 (3H, s, H-25), 1.03 (3H, s, H-26), 1.01 (3H, s, H-29), 0.98 (3H, s, H-27), 0.95 (3H, s, H-30), 0.91 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-23).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz): δ 166.5 (C=O-3), 166.1 (C=O-1), 132.6 (C-4b), 132.5 (C-4a), 130.6 (C-6b), 130.5 (C-6a), 129.6 (C-2b), 129.5 (C-2a), 128.1 (C-3b, C-5b), 128.0 (C-3a, C-5a), 127.3 (C-1b), 126.3 (C-1a), 73.4 (C-3), 68.8 (C-1), 60.9 (C-10), 53.9 (C-8), 48.5 (C-4), 43.6 (C-6), 42.8 (C-18), 39.6 (C-13), 39.3 (C-22), 38.5 (C-14), 37.9 (C-9), 37.7 (C-5), 36.5 (C-2), 36.0 (C-16), 35.3 (C-19), 35.3 (C-11), 35.0 (C-30), 32.8 (C-21), 32.4 (C-15), 32.1 (C-28), 31.8 (C-29), 30.3 (C-12), 30.0 (C-17), 28.2 (C-20), 20.1 (C-26), 19.1 (C-27), 18.8 (C-25), 18.1 (C-7), 14.1 (C-24), 11.7 (C-23).

8.7.2. Preparación del aldehído derivado de $19\beta\text{H}$ -lupeol (**103**)

En un matraz bola de una boca (20 mL), se colocó el compuesto **37** (410 mg) y se disolvió con *p*-dioxano (10 mL). El sistema se agitó durante 5 min y se adicionó SeO_2 (200 mg), previamente sublimado. Después de 12 h de reflujo, la solución se pasó sobre celita la cual fue tratada con una solución de KOH al 2.5%. Finalmente, se realizó una extracción líquido-líquido con CHCl_3 y la fase orgánica se lavó con agua hasta pH neutro. El producto resultante se purificó mediante cromatografía capa fina preparativa. Se obtuvo el aldehído derivado de $19\beta\text{H}$ -lupeol (**103**, 169 mg, 40% de rendimiento). Se evaluó la actividad antiinflamatoria y citotóxica del compuesto **103**.



RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ 9.51 (1H, s, H-30), 6.28 (1H, s, H-29b), 5.90 (1H, s, H-29a), 3.17 (1H, dd, *J* = 10.8, 5.2 Hz, H-3), 2.75 (1H, ddd, 11.0, 10.9, 5.6 Hz, H-19), 2.14 (1H, m, H-21b), 1.72 (1H, dd, *J* = 13.4, 4.6 Hz, H-15β), 1.67 (1H, d, *J* = 3.6 Hz, H-13), 1.01 (3H, s, H-26), 0.96 (3H, s, H-23), 0.92 (3H, s, H-27), 0.818 (3H, s, H-28), 0.813 (3H, s, H-25), 0.75 (3H, s, H-24), 0.66 (1H, d, *J* = 9.1 Hz, H-5).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz): δ 195.0 (C-30), 157.2 (C-20), 133.1 (C-29), 79.0 (C-3), 55.3 (C-5), 51.2 (C-18), 50.3 (C-9), 43.3 (C-17), 42.7 (C-14), 40.8 (C-8), 40.0 (C-22), 38.9(C-4), 38.7 (C-1), 37.8 (C-13), 37.2 (C-10), 35.4 (C-16), 34.3 (C-7), 32.6 (C-21), 28.0 (C-23), 27.7 (C-12), 27.41 (C-2), 27.37 (C-15), 21.0 (C-11), 18.3 (C-6), 17.8 (C-28), 16.1 (C-25), 16.0 (C-26), 15.4 (C-24), 14.4 (C-27).

9. CONCLUSIONES Y COMENTARIOS FINALES

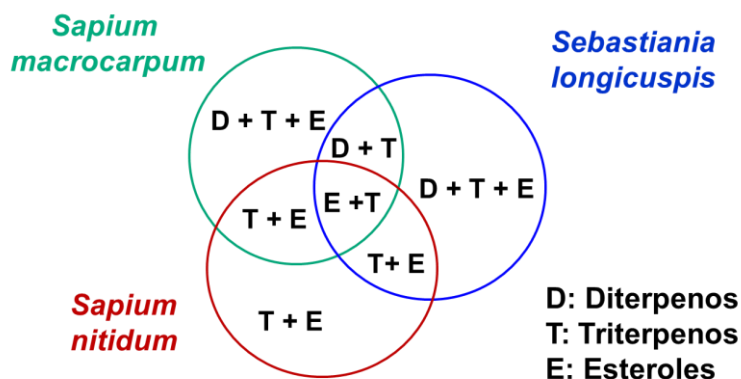
- A partir de las partes aéreas de *S. nitidum* se caracterizaron los compuestos triterpénicos 19 β H-lupeol (**37**), palmitato de β -amirilo (**88**), palmitato de lupeól (b) (**89**), acetato de lupeól (b) (**90**), palmitato de 11-oxo- β -amirilo (**91**), 3 β -palmitoiloxi-1 β ,11 α -dihidroxi-olean-12-eno (**93**), acetato de β -amirilo (**96**) y β -amirina (**97**), y los esteroides β -sitosterol (**27**), estigmasterol (**28**), cicloeucalenol (**92**), 6'-palmitoil- β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo (**94**) y β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo (**95**). El compuesto **93** presenta mayor actividad antiinflamatoria entre los compuestos bioevaluados obtenidos de esta especie, y constituye un nuevo producto natural.
- De *Sebastiania longicuspis* se aislaron los triterpenos moretenona (**25**), taraxerol (**43**), ácido acetilauritólico (**62**), 3-*epi*-taraxerol (**98**) y 16 β ,17-dihidroxi-*ent*-kauran-3-ona (**99**).
- Los triterpenos **37**, lupenona (**100**), los esteroides **27**, **28**, **95** y sitostenona (**101**), y el diterpeno macrocíclico tonantzitlolona (**38**), se aislaron de *Sapium macrocarpum*. Es la primera ocasión que se informa la presencia del compuesto **38** en el género *Sapium*, lo cual resulta relevante, considerando que es un metabolito secundario relativamente infrecuente en la naturaleza, sólo presente (hasta ahora) en especies euforbiáceas. Este diterpeno ha mostrado recientemente bioactividad en contra del virus de chikungunya y como agente antitumoral [95, 96].
- Del extracto hexánico de las partes aéreas de *Croton glabellus* se aislaron los esteroides **27**, **28** y **95**, y los diterpenos 6-*O*-acetilaustronulina (**69**) y austronulina (**70**). Estas últimas sustancias presentan una actividad antiinflamatoria moderada.
- El análisis de la variación de la actividad biológica con las modificaciones estructurales realizadas a partir del 1 β -hidroxifriedelina (**76**), permite concluir que la presencia del hidroxilo en la posición 1 β - del anillo A del friedelano es fundamental para que se manifieste la actividad antiinflamatoria.

La investigación química de los productos naturales (definidos estos como las sustancias presentes en organismos vivos) puede llevarse a cabo de acuerdo varios criterios, como el taxonómico, etnomédico, ecológico, químico, entre otros [97]. Considerando el gran número de especies vegetales aún por analizar químicamente en el mundo, en este trabajo se llevó a cabo el estudio de tres euforbiáceas no estudiadas previamente (el cual aporta conocimiento sobre la estructura de sus metabolitos secundarios, con el fin de abordar las propiedades e interacciones

biológicas [98]), siguiendo la aproximación taxonómica, dada la gran abundancia y variedad de especies de la familia Euphorbiaceae.

Aunque la morfología es la parte fundamental de las clasificaciones taxonómicas, es reconocida la relación que existe entre ciertos tipos de productos naturales (acetogeninas, terpenoides, alcaloides, fenilpropanoides) y su ubicación taxonómica (relaciones quimiotaxonómicas). A pesar de las innumerables diversificaciones que cada uno de los diferentes tipos de productos naturales puedan tener debido a las variaciones ecogeográficas y ontológicas, éstas son susceptibles de racionalizarse de acuerdo al conocimiento de su biosíntesis y del papel ecológico que desempeñan [99, 100].

Las especies *Sapium macrocarpum*, *Sebastiania longicuspis* y *Sapium nitidum* pertenecen a la subtribu Hippomaninae, tribu Hippomaneae, subfamilia Euphorbioideae de la familia Euphorbiaceae [101]. Al considerar los resultados obtenidos en este trabajo sobre las relaciones del contenido metabólico entre estas especies, puede proponerse una representación esquemática de este contenido, donde se observa que hay similitud en ciertos metabolitos secundarios entre las especies, pero también existen diferencias. Las tres especies coinciden en la presencia de esteroides y triterpenos.



10. REFERENCIAS

1. Cragg, G.M.; Boyd, M.R.; Khanna, R.; Kneller, R.; Mays, T.D.; Mazan, K.D.; Newman, D.J.; Sausville, E.A. International collaboration in drug discovery and development: the NCI experience. *Pure Appl. Chem.* **1999**, *71*, 1619-1633.
2. Houghton, P.J. Old yet new-pharmaceuticals from plants. *J. Chem. Ed.* **2001**, *78*, 175-184.
3. Koehn, F.E.; Carter, G.T. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 206-220.
4. www.who.int/topics/cancer/es/
5. Newman, D.J.; Cragg, G.M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 629-661.
6. Phillipson, D. Phytochemistry and medicinal plants *Phytochemistry* **2001**, *56* (3), 237-243.
7. Alonso, J.A.; Villarreal, M.L.; Salazar, L.A.; Gomez, M.; Dominguez, F.; Garcia, A. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *133*, 945-972.
8. Dy, G.K.; Adjei, A.A. Systemic cancer therapy: Evolution over the last 60 years. *Cancer* **2008**, *113*, 1857-1887.
9. Ouakrim, D.A.; Dashti, S.G.; Chau, R.; Buchanan, D.D.; Clendenning, M.; Rosty, C.; Winship, I.M.; Young, J.P.; Giles, G.G.; Leggett, B.; Macrae, F.A.; Ahnen, D.J.; Casey, G.; Gallinger, S.; Haile, R.W.; Le Marchand, L.; Thibodeau, S. N.; Lindor, N.M.; Newcomb, P.A.; Potter, J.D.; Baron, J.A.; Hopper, J.L.; Jenkins, M.A.; Win, A.K. Aspirin, Ibuprofen, and the Risk for Colorectal Cancer in Lynch Syndrome. *J. Natl. Cancer Inst.* **2015**, *107*, 1-11.
10. Steinmann, V.W. Diversidad y endemismo de la familia Euphorbiaceae en México. *Act. Bot. Mex.* **2002**, *61*, 61-93.
11. Bautista-Cruz, A.; Arnaud-Viñas, M.; Martínez-Gutiérrez, G.; Sánchez-Medina, P.; Pérez-Pacheco, R. The traditional medicinal and food uses of four plants in Oaxaca, Mexico. *J. Med. Plant. Res.* **2011**, *5*, 3404-3411.
12. Hoekman, K.S.; Brocha, A.; Robbinsa, C.; Cenicerosa, E.; Natarajanb, M. Review of biodiesel composition, properties, and specifications. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **2012**, *12*, 143-169.
13. Tao, J.; Cao, C.; Zhao, D.; Zhou, C.; Liang, G. Molecular analysis and expression of phenylalanine ammonia-lyase from poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* willd.). *Afr. J. Biotechnol.* **2011**, *10*, 126-135.

14. Vasas, A.; Rédei, D.; Csupor, D.; Molnár, J.; Hohmann, J. Diterpenes from European *Euphorbia* species serving as prototypes for natural-product-based drug discovery. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *2012*, 5115-5130.
15. Gao, J.; Chen, Q.; Liu, Y.; Xin, X.; Yili, A.; Aisa, H.A. Diterpenoid constituents of *Euphorbia macrorrhiza*. *Phytochemistry* **2016**, *122*, 246-253.
16. Ogundajo, A.L.; Aruna, A.M.; Owolabi, A.O.; Ogunwande, I.A. Essential oil of *Phyllanthus reticulatus* Poiret from Nigeria. *Am. J. Plant Sci.* **2015**, *6*, 6-13.
17. Dong, S. H.; Liu, H. B.; Xu, CH.; Ding, J.; Yue, J.M. Constituents of *Trigonostemon heterophyllus*. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 2576-2581.
18. Yazdiniapour, Z.; Ghanadian, M.; Zolfaghari, B.; Lanzotti, V. 6(17)-Epoxyalthrane diterpenes from *Euphorbia sogdiana* Popov with cytotoxic activity. *Fitoterapia* **2016**, *108*, 87-92.
19. García, A.; Delgado, G. Cytotoxic *cis*-fused bicyclic sesquiterpenoids from *Jatropha neopauciflora*. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 1618-1621.
20. Corea, G.; Fattorusso, E.; Lanzotti, V.; Taglialatela-Scafati, O.; Appendino, G.; Ballero, M.; Simon, P.N.; Dumontet, C.; Di Pietro, A. Jatropane diterpenes as P-glycoprotein inhibitors. First insights of structure-activity relationships and discovery of a new, powerful lead. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3395-3402.
21. Jadranin, M.; Pešić, M.; Aljančić, I.S.; Milosavljević, S.M.; Todorović, N.M.; Podolski-Renić, A.; Banković, J.; Tanić, N.; Marković, I.; Vajs, V.E.; Tešević, V.V. Jatropane diterpenoids from the latex of *Euphorbia dendroides* and their anti-P-glycoprotein activity in human multi-drug resistant cancer cell lines. *Phytochemistry* **2013**, *86*, 208-217.
22. Al Muqarrabun, L.M.R.; Ahmat, N.; Aris, S.R.S. A review of the medicinal uses, phytochemistry and pharmacology of the genus *Sapium*. *J. Ethnopharmacol.* **2014**, *155*, 9-20.
23. <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Euphorbiaceae/Sapium/>
24. Devkota, H.P.; Basnet, P.; Yahara, S. A new phenolic compound, 4-dehydrochebulic acid-1,6-dimethyl ester from *Sapium insigne* leaves. *J. Nat. Med.* **2010**, *64*, 191-193.
25. Huang, S.; Fujioka, T.; Yoshida, M.; Ishimaru, K. A new chalcone glycoside from *Sapium sebiferum*. *J. Nat. Med.* **2007**, *61*, 339-341.
26. Devkota, H.P.; Basnet, P.; Yahara, S. Diterpene esters and phenolic compounds from *Sapium insigne* (Royle) Benth. ex Hook fil. *Chem. Pharm. Bull.* **2009**, *57*, 1289-1291.

27. Chumkaew, P.; Karalai, C.; Ponglimanont, C.; Chantrapromma, K. Antimycobacterial activity of phorbol esters from the fruits of *Sapium indicum*. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 540-543.
28. Arbain, D.; Byrne, L.T.; Cannon, J.R.; Patrick, V.A.; White, A.H. (-)-Bukittinggine, the major alkaloid of *Sapium baccatum*. Crystal structure and absolute configuration of bukittinggine hydrobromide. *Aust. J. Chem.* **1990**, *43*, 185-190.
29. Ahmed, Y.; Sohrab, M.H.; Al-Reza, S.M.; Tareq, F.S.; Hasan, C.M.; Sattar, M.A. Antimicrobial and cytotoxic constituents from leaves of *Sapium baccatum*. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48*, 549-552.
30. Al Muqarrabun, L.M.R.; Ahmat, N.; Aris, S.R.S.; Norizan, N.; Shamsulrijal, N.; Yusof, F.Z.M.; Suratman, M.N.; Yusof, M.I.M.; Salim, F. A new triterpenoid from *Sapium baccatum* (Euphorbiaceae). *Nat. Prod. Res.* **2014**, *28*, 1003-1009.
31. Siems, K.; Jakupovic, J.; Castro, V.; Poveda, L. Rigidol, an unusual diterpene from *Sapium rifidifolium*. *Phytochemistry* **1993**, *33*, 1465-1468.
32. Woldemichael, G.M.; Lugo, M.T.G.; Franzblau, S.G.; Wang, Y.; Suarez, E.; Timmermann, B.N. Mycobacterium tuberculosis growth inhibition by constituents of *Sapium haemospermum*. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 598-603.
33. Hsu, F.L.; Lee, Y.Y. Antihypertensive activity of 6-*O*-galloyl-D-glucose, a phenolic glycoside from *Sapium sebiferum*. *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 308-312.
34. Yang, P.; Kinghorn, A.D. Coumarin constituents of the chinese tallow tree (*Sapium sebiferum*). *J. Nat. Prod.* **1985**, *48*, 486-488.
35. Ibarra, G.; Centro de Investigaciones en Ecosistemas UNAM. Herbario Nacional de México. 2007. <http://hasbrouck.asu.edu/imglib/seinet/ASU/ASU0047/ASU0047965.jpg>
36. Flores, J.S.; Vermont-Ricalde, R. The secretions and exudates of plants used in Mayan traditional medicine. *J. Herbs Spices Med. Plants* **1996**, *4*, 53-59.
37. García-Méndez, M.C.; Macías-Ruvalcaba, N.A.; Lappe-Oliveras, P.; Hernández-Ortega, S.; Macías-Ruvalcaba, M.L. Phytotoxic potential of secondary metabolites and semisynthetic compounds from endophytic fungus *Xylaria feejeensis* strain SM3e-1b isolated from *Sapium macrocarpum*. *J. Agr. Food Chem.* **2016**, *64*, 4255-4263.
38. <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Euphorbiaceae/Sebastiania/>

39. Lima, M.A.A.; Lima, J.Q.; Arriaga, Â.M.C.; Andrade-Neto, M.; Santiago, G.M.P.; Bezerra, B.P.; Ferreira, Y.S.; Veras, H.N.H.; Braz-Filho, R. Constituintes químicos de *Sebastiania macrocarpa* Muell. Arg. (Euphorbiaceae). *Quim. Nova* **2009**, *32*, 348-353.
40. Reena, G.; Kamalanathan, D.; Natarajan, D.; Nadu, T.; Drug, N. Chemical constituents and antimicrobial activity of *Sebastiania chamaelea*. *Chem. Nat. Compd.* **2015**, *51*, 1013–1014.
41. Gaertner, M.; Müller, L.; Roos, J.; Cani, G.; Santos, A.; Niero, R.; Calixto, J.; Yunes, R.; Delle Monache, F.; Cechinel-Filho, V. Analgesic triterpenes from *Sebastiania schottiana* roots. *Phytomedicine* **1999**, *6*, 41-44.
42. Penna, C.; Marino, S.; Vivot, E.; Cruañes, C.; Muñoz, J.D.; Cruañes, J.; Ferraro, G.; Gutkind, G.; Martino, V. Antimicrobial activity of argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. *J. Ethnopharmacol.* **2001**, *77*, 37-40.
43. Khera, S.; Jolad, S.D.; Carducci, M.D.; Timmermann, B.N. (-)-Fern-7-en-3 α -ol from *Sebastiania brasiliensis*. *Acta Crystallogr. Sect. E*, **2003**, *E59*, o1403-o1404.
44. Macías-Rubalcava, M.L.; Hernández-Bautista, B.E.; Jiménez- Estrada, M.; Cruz-Ortega, R.; Anaya, A.L. Pentacyclic triterpenes with selective bioactivity from *Sebastiania adenophora* leaves, Euphorbiaceae. *J. Chem. Ecol.* **2007**, *33*, 147-156
45. <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-159148>
46. Meave, J.A. Riqueza biológica y manejo del monumento natural Yaxchilán. CONABIO. *Biodiversitas* **2008**, *78*, 12-15.
47. <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Euphorbiaceae/Croton/>
48. Salatino, A.; Salatino, M.L.F.; Negri, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *J. Braz. Chem. Soc.* **2007**, *18*, 11-33.
49. Ravanelli, N.; Santos, K.P.; Motta, L.B.; Lago, J.H.G.; Furlan, C.M. Alkaloids from *Croton echinocarpus* Baill.: Anti-HIV potential. *South African J. Bot.* **2016**, *102*, 153-156.
50. Cordeiro, K.W.; Felipe, J.L.; Malange, K.F.; Do Prado P.R.; Figueiredo, P.; Garcez, F.R.; Freitas, K.C.; Garcez, W.S.; Toffoli-Kadri M.C. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Croton urucurana* Baillon bark. *J. Ethnopharmacol.* **2016**, *183*, 128-135.
51. Wang, J.; Yin, H.; Zhang, Y.; Li, G.; Li, Y.; Huang, W. Diterpenoids from the roots of *Croton crassifolius* and their anti-angiogenic activity. *Phytochemistry* **2016**, *122*, 270-275.

52. Lima, G.S.; Castro-Pinto, D.B.; Machado, G.C.; Maciel, M.A.M.; Echevarria, A. Phytomedicine antileishmanial activity and trypanothione reductase effects of terpenes from the Amazonian species *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae). *Phytomedicine* **2015**, *22*, 1133-1137.
53. Wang, J.F.; Yang, S.H.; Liu, Y.Q.; Li, D.X.; He, W.J.; Zhang, X.X.; Liu, Y.H; Zhou, X.J. Five new phorbol esters with cytotoxic and selective anti-inflammatory activities from *Croton tiglium*. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 1986-1989.
54. García, A.; Ramírez-Apan, M.T.; Cogordán, A. Delgado, G. Absolute configuration assignments by experimental and theoretical approaches of *ent*-labdane- and *cis-ent*-clerodane-type diterpenoids isolated from *Croton glabellus*. *Can. J. Chem.* **2006**, *84*, 1593-1602.
55. <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Euphorbiaceae/Garcia/>
56. Reyes, B.M.; Ramírez-Apan, M.T.; Toscano, R.A.; Delgado, G. Triterpenes from *Garcia parviflora*. Cytotoxic evaluation of natural and semisynthetic friedelanes *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 1839-1845.
57. Wang, K.W. A new fatty acid ester of triterpenoid from *Celastrus rosthornianus* with anti-tumor activities *Natural Product Research* **2007**, *21*, 669-674.
58. Barreiros, M.L.; David, J.M.; Pereira, P.A.; Guedes, M.L.S.; David, J.P. Fatty acid esters of triterpenes from *Erythroxylum passerinum*. *J. Braz. Chem. Soc.* **2002**, *13*, 669-673.
59. Chavez, J.P.; Dos Santos, I.D.; Cruz, F.G.; David, J.M. Flavonoids and triterpene ester derivatives from *Erythroxylum leal Costae*. *Phytochemistry* **1996**, *41*, 941-943.
60. Matsunaga, S.; Tanaka, R.; Akagi, M. Triterpenoids from *Euphorbia maculata*. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 535-537.
61. Wenkert, E.; Baddeley, G.V.; Burfitl, I.R.; Moreno, L.N. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of naturally-occurring substances LVII. Triterpenes related to lupane and hopane. *Org. Magn. Resonance* **1978**, *11*, 337-343.
62. Kongduang, D.; Wungshintaweekul, J.; De-Eknamkul, W. Biosynthesis of β -sitosterol and stigmasterol proceeds exclusively via the mevalonate pathway in cell suspension cultures of *Croton stellatopilosus*. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 4067-4072.

63. Forgo, P.; Kövér, K.E. Gradient enhanced selective experiments in the ^1H NMR chemical shift assignment of the skeleton and side-chain resonances of stigmasterol a phytosterol derivative. *Steroids* **2004**, *69*, 43–50.
64. Kikuchi, T.; Kadota, S.; Tsubono, K. Studies on the constituents of Orchidaceous plants. IV. Proton and carbon-13 signal assignments of cycloeucalenol-type triterpenes from *Nervilia purpurea* Schlechter by two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, *34*, 2479-2486.
65. Wang, K. A new triterpenoidal ester from *Celastrus rosthornianus*. *Fitoterapia* **2008**, *79*, 311-313.
66. González, A.G.; Ferro, E.E.; Ravelo, A.G. Triterpenes from *Maytenus horrida*. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 2785-2788.
67. Cáceres-Castillo, D.; Mena-Rejón, G.J.; Cedillo-Rivera, R.; Quijano, L. 21β -Hydroxy-oleanane-type triterpenes from *Hippocratea excelsa*. *Phytochemistry* **2008**, *69*, 1057-1064.
68. Lima, F.V.; Malheiros, A.; Otuki, M.F.; Yunes, R.A.; Filho, V.C.; Monache, F.D. Three new triterpenes from the resinous bark of *Protium kleinii* and their antinociceptive activity. *J. Braz. Chem. Soc.* **2005**, *16*, 578-582.
69. Nguyen, A.T.; Malonne, H.; Duez, P.; Vanhaelen-Fastre, R.; Vanhaelen, M.; Fontaine, J. Cytotoxic constituents from *Plumbago zeylanica*. *Fitoterapia* **2004**, *75*, 500-504.
70. Kim, D. K.; Lim, J. P.; Kim, J. W.; Park, H. W.; Eun, J. S. Antitumor and antiinflammatory constituents from *Celtis sinensis*. *Arch. Pharm. Res.* **2005**, *28*, 39-43.
71. Takasaki, M.; Konoshima, T.; Tokuda, H.; Mazuda, K.; Arai, Y.; Kenji, S.; Ageta, H. Anticarcinogenic Activity of *Taraxacum* Plant. II. *Biol. Pharm. Bull.* **1999**, *22*, 606-610.
72. Bandeira, P.N.; Lemos, T.L.G.; Costa, S.M.O.; Santos, H.S. Obtenção de derivados da mistura triterpenoídica α - e β -amirina. *Braz. J. Pharmacogn.* **2007**, *17*, 204-208.
73. Burns, D.; Reynolds, W.F.; Buchanan, G.; Reese, P.B.; Enriquez, R.G., Assignment of ^1H and ^{13}C spectra and investigation of hindered side-chain rotation in lupeol derivatives. *Magn. Reson. Chem.* **2000**, *38*, 488-493.
74. Liu, Z.; Jiang, W.; Deng, Z.W.; Lin, W.H. Assignment of the absolute stereochemistry of an unusual diterpenoid from the mangrove plant *Excoecaria agallocha* L. *J. Chin. Pharm. Sci.* **2010**, *19*, 387-392.

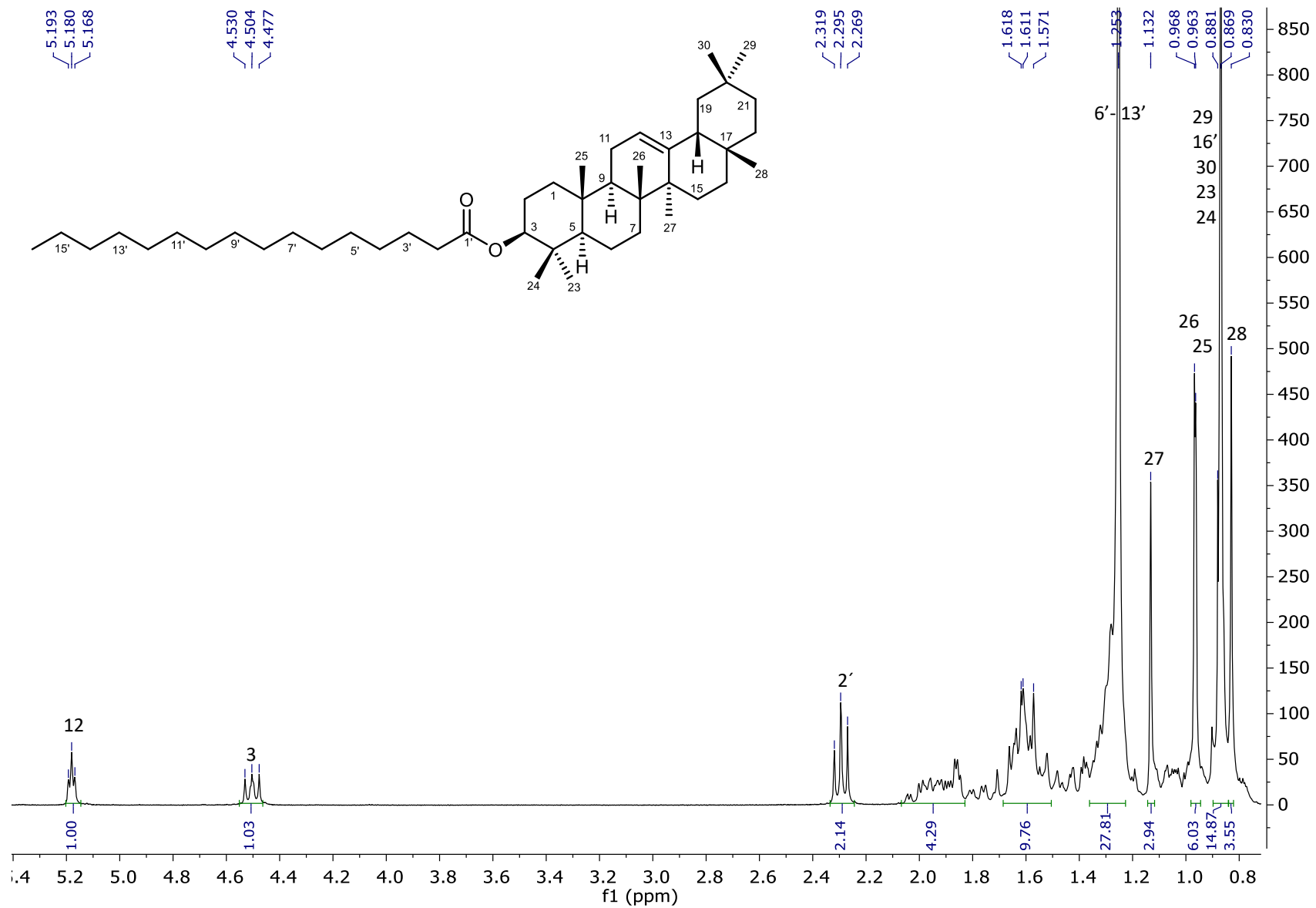
75. Hernández-Chávez, I.; Torres-Tapia, L.W.; Simá-Polanco, P.; Cedillo-Rivera, R.; Moo-Puc, R.; Peraza-Sánchez, S.R. Antigiardial activity of *Cupania dentata* bark and its constituents. *J. Mex. Chem. Soc.* **2012**, *56*, 105-108.
76. (a) David, J.P.; Meira, M.; David, J.M.; Guedes, M.L.S. Triterpenos e ferrulatos de alquila de *Maprounea guianensis*. *Quim. Nova* **2004**, *27*, 62-65. (b) Delgado, G.; Hernández, J.; Rios, M. Y.; Aguilar, M. I. Pentacyclic Triterpenes from *Cnidioscolus multilobus*. *Planta Med.* **1994**, *60*, 289-290.
77. Sousa, G.F.; Duarte L.P.; Alcântara A.F.; Silva G.D.; Vieira-Filho S.; Silva R.; Oliveira D.; Takahashi J. New triterpenes from *Maytenus robusta*: Structural elucidation based on NMR experimental data and theoretical calculations *Molecules* **2012**, *17*, 13439-13456.
78. Viswanadh, G.S.; Ramaiah, P.A.; Laatsch, H.; Maskey, R. Chemical constituents of the heartwood and bark of *Homonoia riparia*. *J. Trop. Med. Plants* **2006**, *7*, 267-273.
79. Ding, Y.; Jia, Z. Tetracyclic diterpenols from *Euphorbia sieboldiana*. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 2413-2415.
80. Agrawal, P.K.; Bishnoi, V.; Singh, A.K. NMR Chemical shift correlations in 16,17-dihydroxy-kauranoids: Implication for stereochemical assignments. *Phytochemistry* **1995**, *39*, 929-930.
81. Carpenter, R.C.; Sotheeswaran, S.; Sultanbawa, M.U.S. ¹³CNMR studies of some lupane and taraxerane triterpenes. *Org. Magn. Resonance* **1980**, *14*, 462-465.
82. Greca, M.D.; Monaco, P.; Previtera, L. Stigmasterols from *Typha latifolia*. *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 1430-1435.
83. Prachayasittikul, S.; Suphamong, S.; Worachartcheewan, A.; Lawung, R.; Somsak Ruchirawat, S.; Prachayasittikul, V. Bioactive metabolites from *Spilanthes acmella* Murr. *Molecules* **2009**, *14*, 850-867.
84. Dräger, G.; Jeske, F.; Kunst, E.; Lopez, E. G., Sanchez, H. V.; Tschritzis, F.; Kirschning, A.; Jakupovic, J. Tonantzitlolone and other Diterpenes from *Stillingia sanguinolenta*. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 5020-5026. Es pertinente señalar que el nombre de tonantzitlolona para la substancia **38** (aislada inicialmente de *Stillingia sanguinolenta*, colectada en Nuevo León, México) fue acuñado por el Dr. Xorge A. Domínguez (1926-1992), en honor a la diosa azteca Tonantzin. Jeske, F. Tesis Doctoral. 1997. Universidad Técnica de Berlín, Alemania.

85. Techer, S.; Girard-Valenciennes, E.; Retailleau, P.; Neyts, J.; Guéritte, F.; Leyssen, P.; Litaudon, M.; Smadja, J.; Grondin, I. Tonantzitlolones from *Stillingia lineata* ssp. *lineata* as potential inhibitors of chikungunya virus. *Phytochemistry Lett.* **2015**, *12*, 313-319.
86. Napolitano, J.G.; Gavín, J.A.; García, C.; Norte, M.; Fernández, J.J.; Hernández Daranas, A. On the Configuration of five-membered rings: A spin-spin coupling constant approach. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 6338-6347.
87. Dräger, G.; Jeske, F.; Kunst, E.; Lopez, E.G.; Sanchez, H.V.; Tschritzis, F.; Kirschning, A.; Jakupovic, J. Tonantzitlolone and other diterpenes from *Stillingia sanguinolenta*. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 6128.
88. Wittenberg, R.; Beier, C.; Dräger, G.; Jas, G.; Jasper, C.; Monenscheina, H.; Kirschning, A. Towards the total synthesis of tonantzitlolone - preparation of key fragments and the complete carbon backbone. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 4457-4460.
89. Jasper, C.; Wittenberg, R.; Quitschalle, M.; Jakupovic, J.; Kirschning, A. Total synthesis and elucidation of the absolute configuration of the diterpene tonantzitlolone. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 479-482.
90. Jasper, C.; Adibekian, A.; Busch, T.; Quitschalle, M.; Wittenberg, R.; Kirschning, A. Total synthesis of cyclic diterpene tonantzitlolone based on a highly stereoselective substrate-controlled aldol reaction and ring-closing metathesis. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 8719-8734.
91. Busch, T.; Schuster, H.; Kirschning, A. Determination of the absolute configuration of the diterpene tonantzitlolone B. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 5273-5275.
92. Wal, A.; Wal, P.; Rai, A.K.; Raj, K. Isolation and modification of pseudohybrid plant (Lupeol). *J. Pharm. Sci. Res.* **2010**, *2*, 13-25.
93. El-Readi, M.Z.; Hamdan, D.; Farrag, N.; El-Shazly, A.; Wink, M. Inhibition of P-glycoprotein activity by limonin and other secondary metabolites from *Citrus* species in human colon and leukaemia cell lines. *Eur. J. Pharm.* **2010**, *626*, 139-145.
94. Chu, C.W.; Liu, C.M.; Chung, M.I.; Chen, C.Y. Biofunctional constituents from *Michelia compressa* var. *lanyuensis* with anti-melanogenic properties. *Molecules* **2015**, *20*, 12166-12174.
95. Olivon, F.; Palenzuela, H.; Girard-Valenciennes, E.; Neyts, J.; Pannecouque, C.; Roussi, F.; Grondin, I.; Leyssen, P.; Litaudon, M. Antiviral activity of flexibilane and tigliane diterpenoids from *Stillingia lineata*. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 1119-1128.

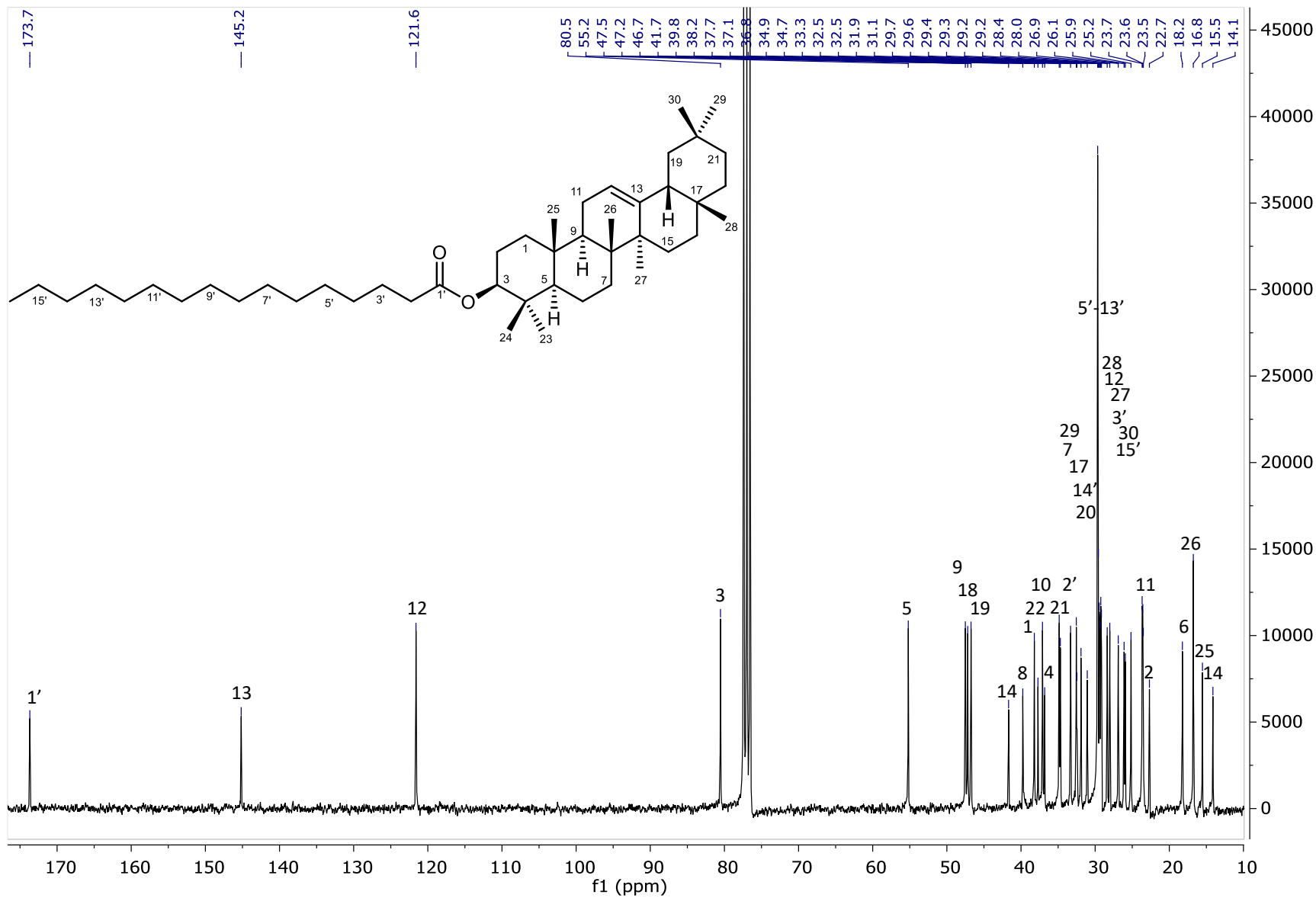
96. Sourbier, C.; Scroggins, B.T.; Mannes, P.Z.; Liao, P.J.; Siems, K.; Wolf, D.; Beutler, J.A.; Linehan, W.M.; Neckers, L. Tonantzitlolone cytotoxicity toward renal cancer cells is PKC θ - and HSF1-dependent. *Oncotarget* **2015**, *6*, 29963-29974.
97. Espinosa-García, F.J.; Delgado, G. Relationship between ecology of plant defense and the prospection of secondary metabolites with potential medicinal or agricultural application. *Rev. Latinoam. Quím.* **1998**, *26*, 13-29.
98. Gottlieb, O.R.; Borin, M.R. Quantitative Biology: A guide into the understanding of plant bioactivity. *J. Braz. Chem. Soc.* **2002**, *13*, 772-776.
99. Gottlieb, O. R. Phytochemicals: Differentiation and function. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 1715-1724.
100. Gottlieb, O.R.; Borin, M.R.; de Brito, N.R.S. Integration of ethnobotany and phytochemistry: dream or reality? *Phytochemistry* **2002**, *60*, 145-152.
101. Martínez-Gordillo, M.; Jiménez-Ramírez, J.; Cruz-Durán, R.; Juárez-Arriaga, E.; García, R.; Cervantes, A.; Mejía-Hernández, R. Los géneros de la familia Euphorbiaceae en México. *An. Inst. Biol. UNAM* **2002**, *73*, 155-281.

11. ANEXOS

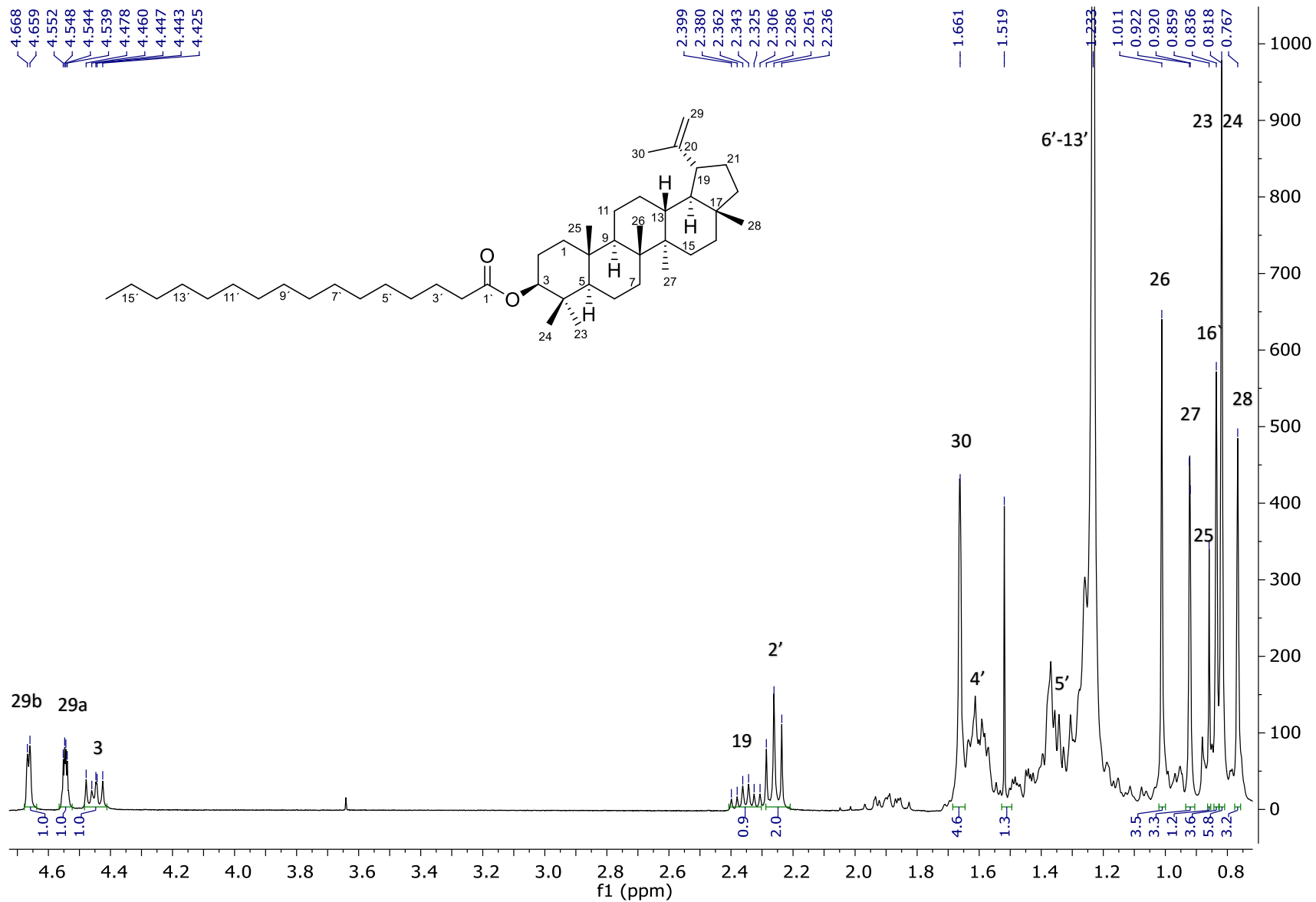
11.1. ESPECTROS



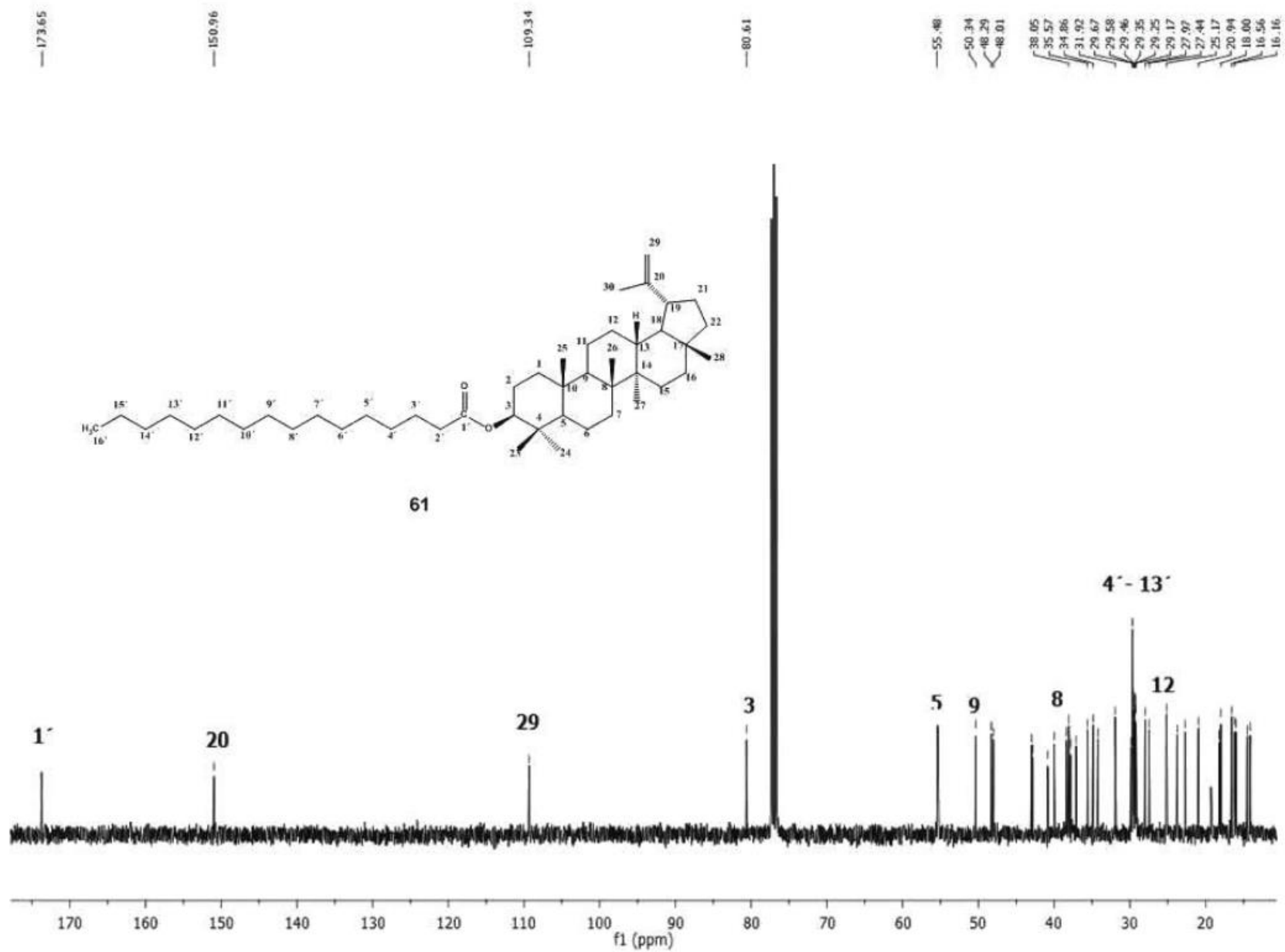
Espectro 1. RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de palmitato de β -amirilo (**88**)



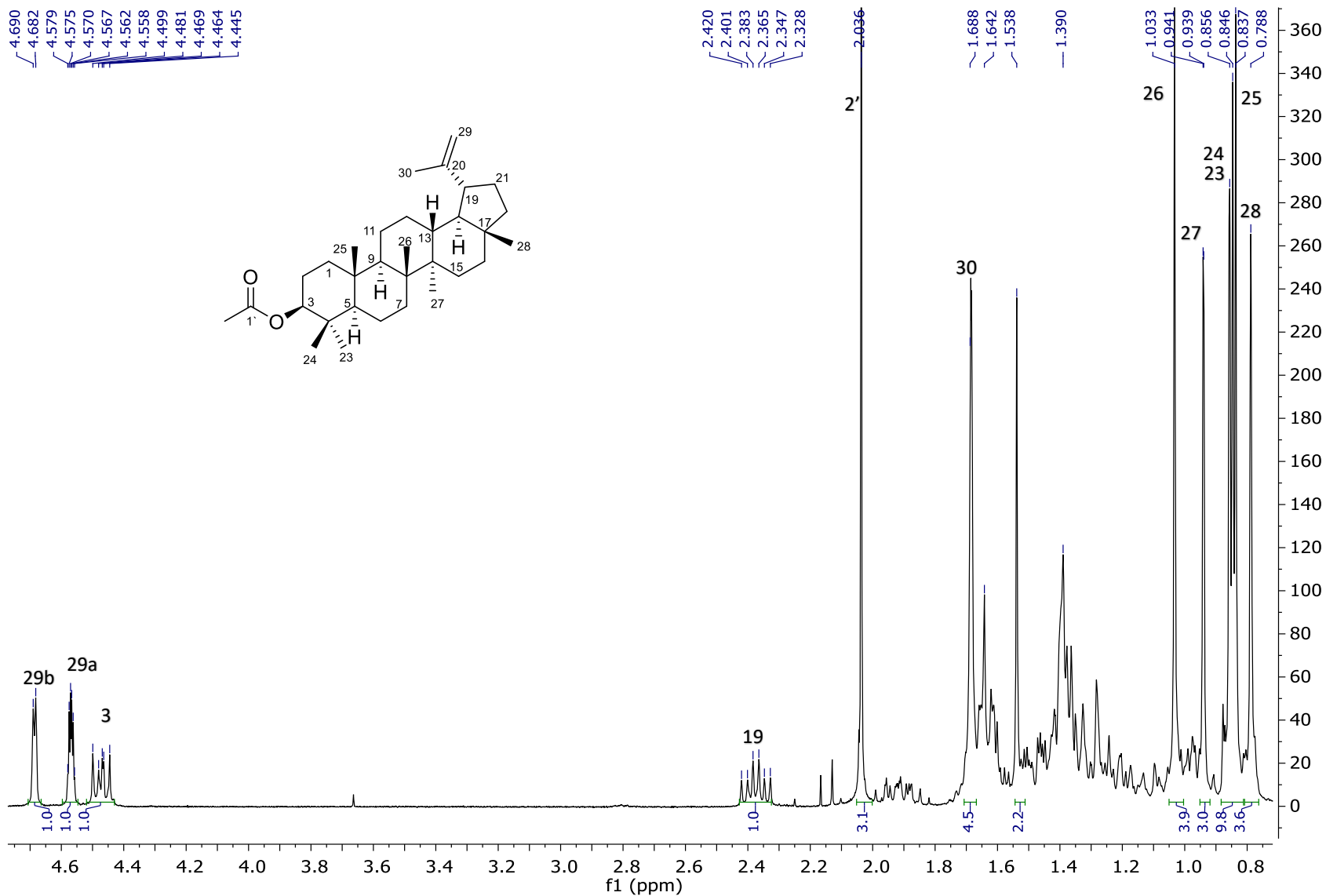
Espectro 2. RMN ^{13}C (CDCl₃, 100 MHz) de palmitato de β -amirilo (**88**)



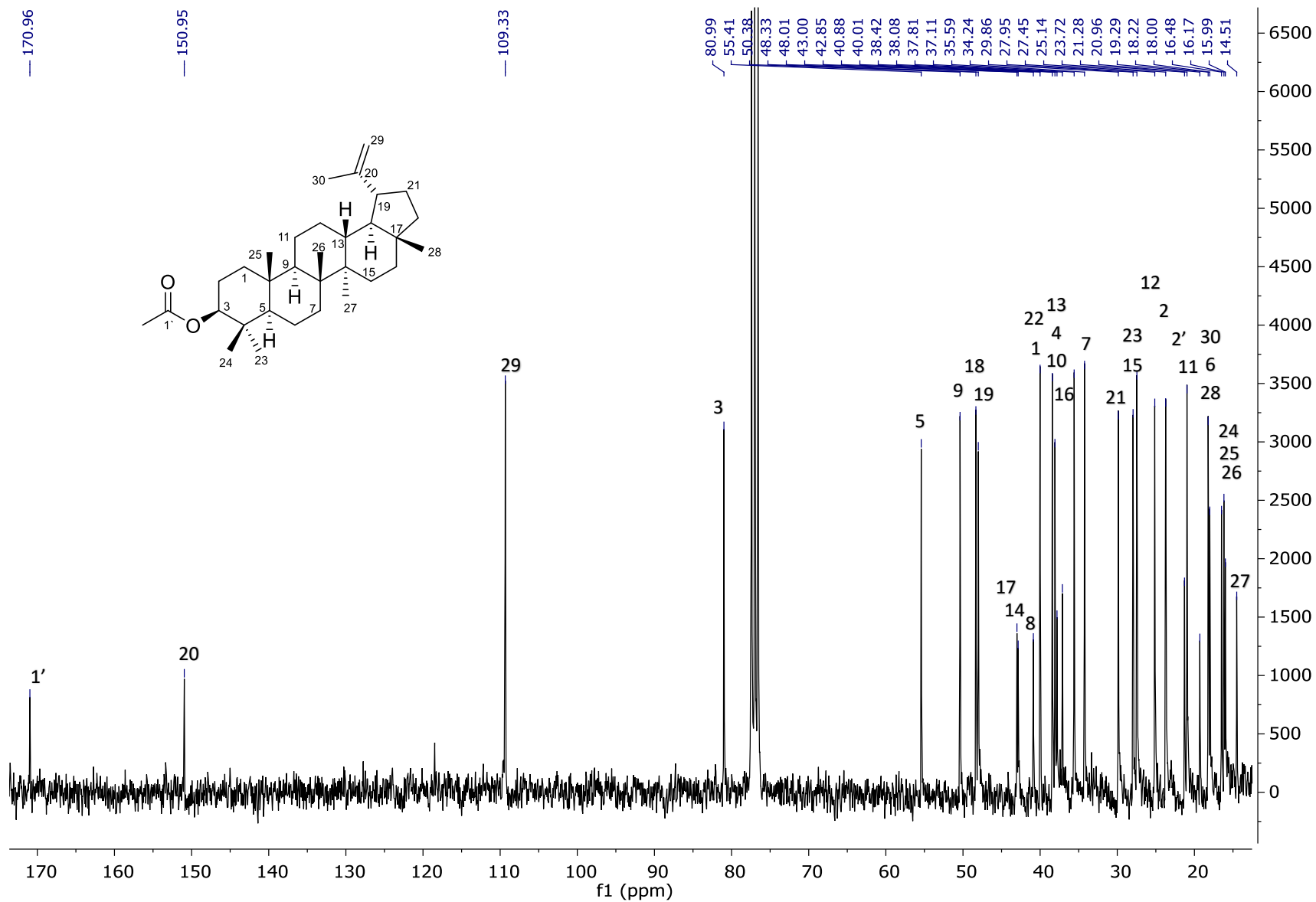
Espectro 3. RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) de palmitato de lupeól (89)



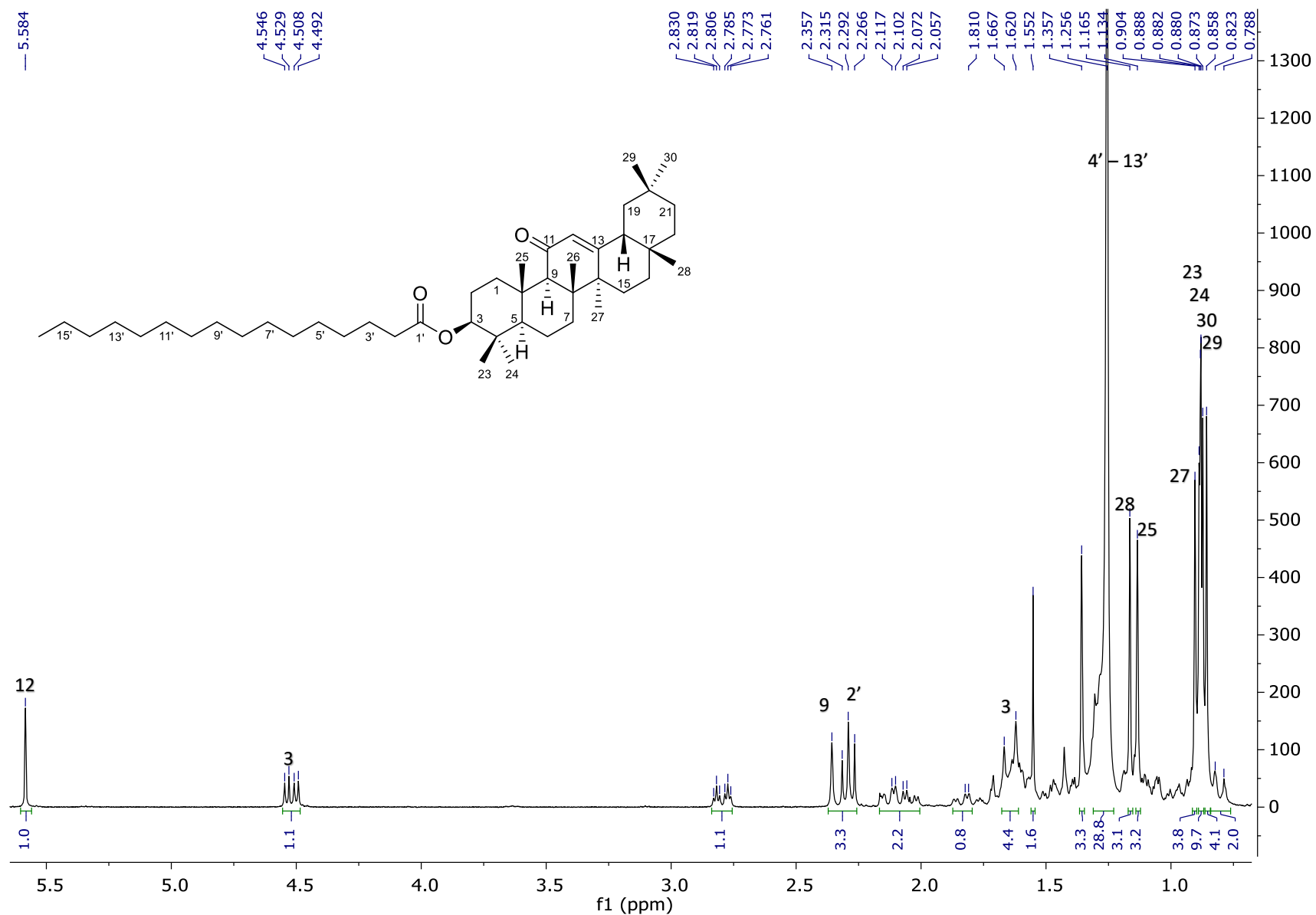
Espectro 4. RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) de palmitato de lupeól (89)



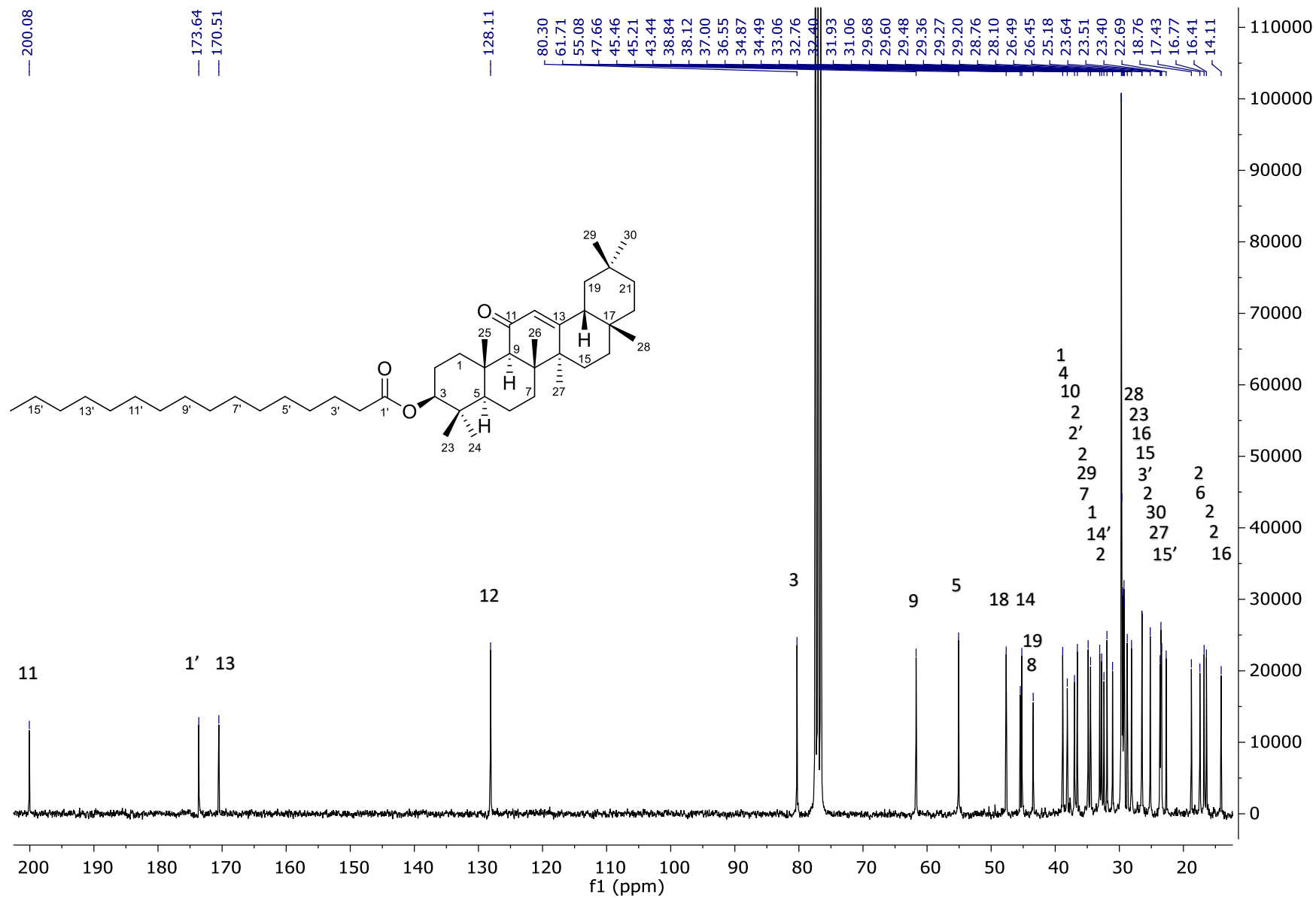
Espectro 5. RMN ^1H (CDCl₃, 300 MHz) del acetato de lupeño (**90**)



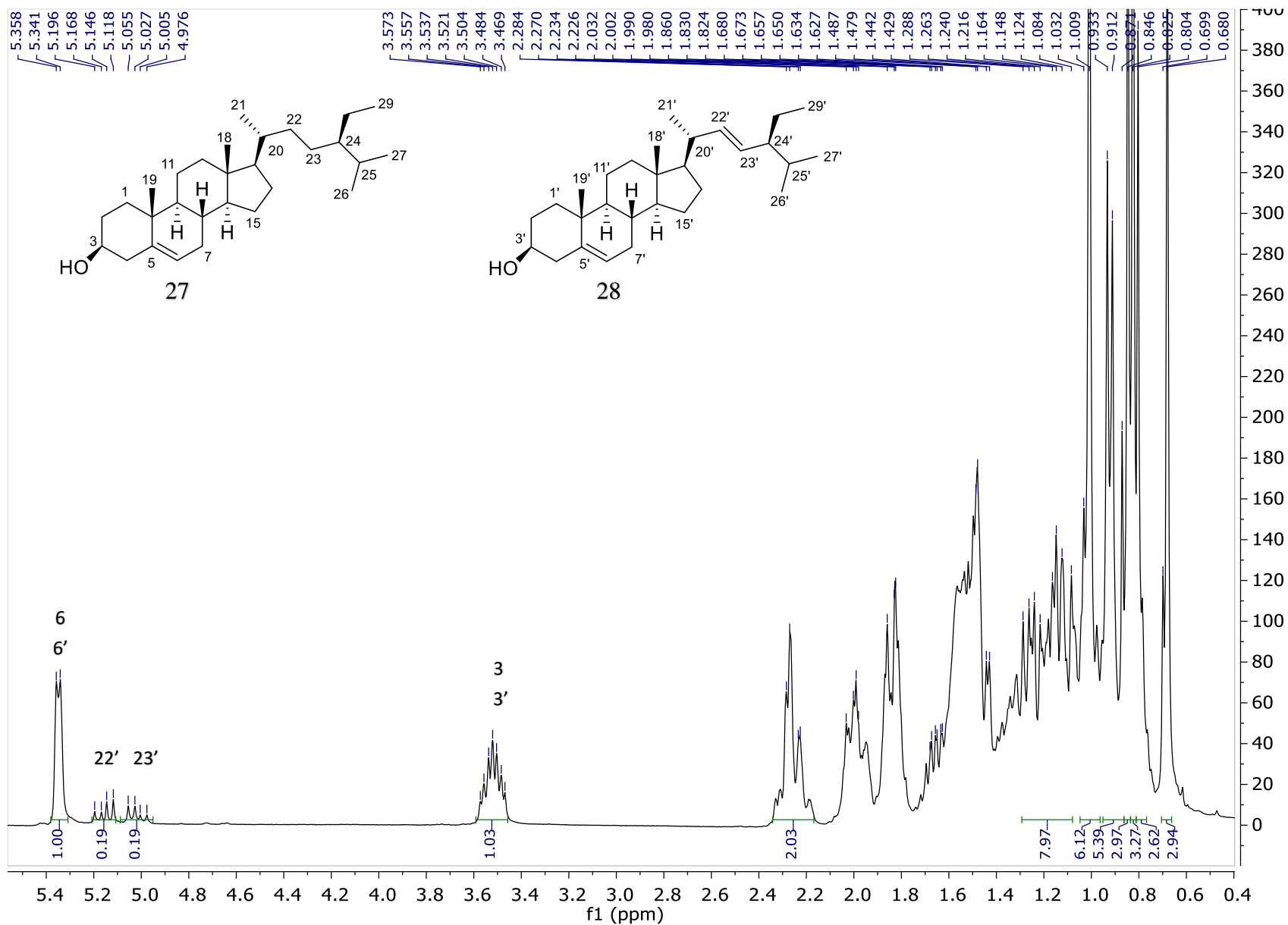
Espectro 6. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) de acetato de lupeólo (90)



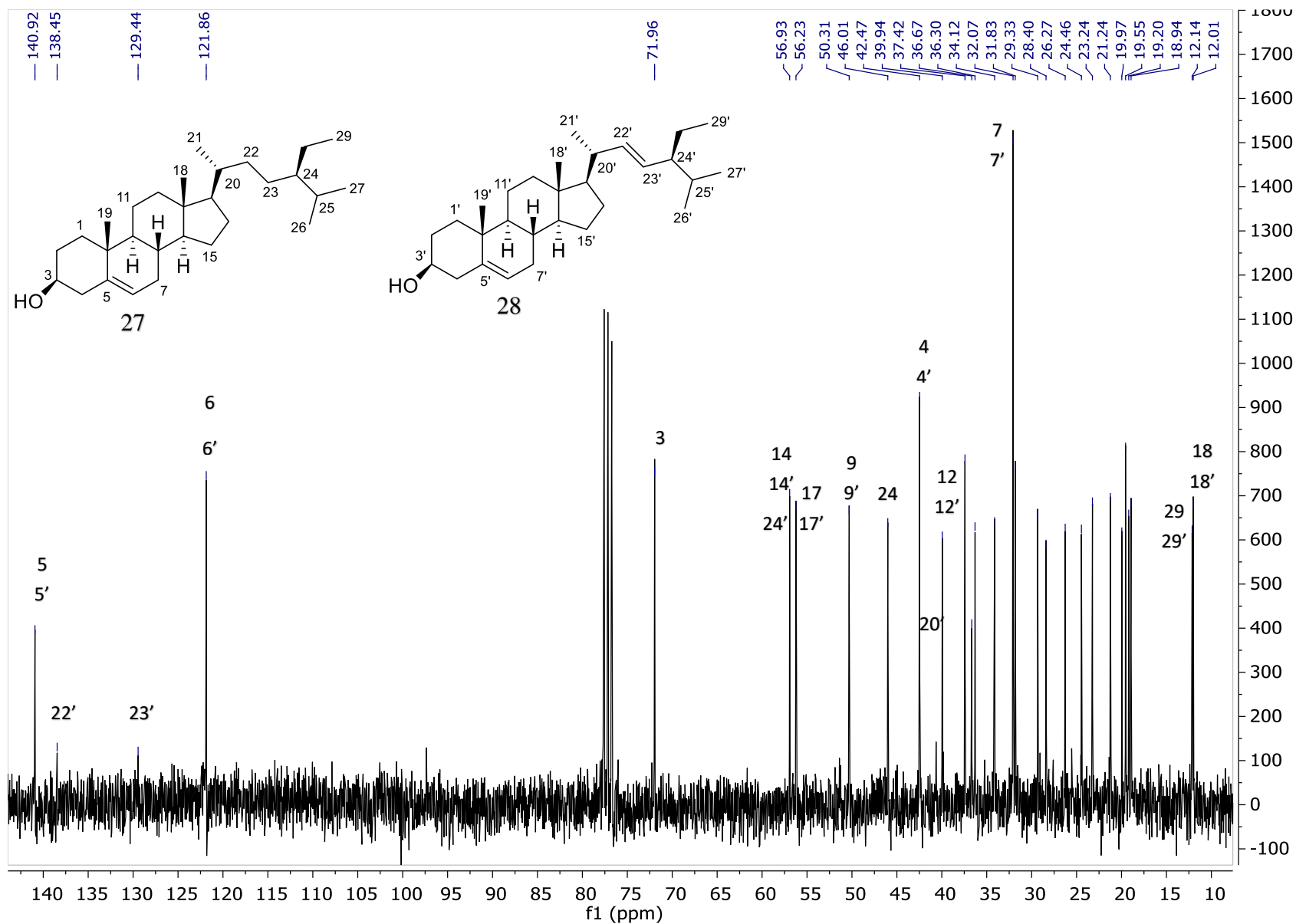
Espectro 7. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) de palmitato de 11-oxo-β-amirilo (91)



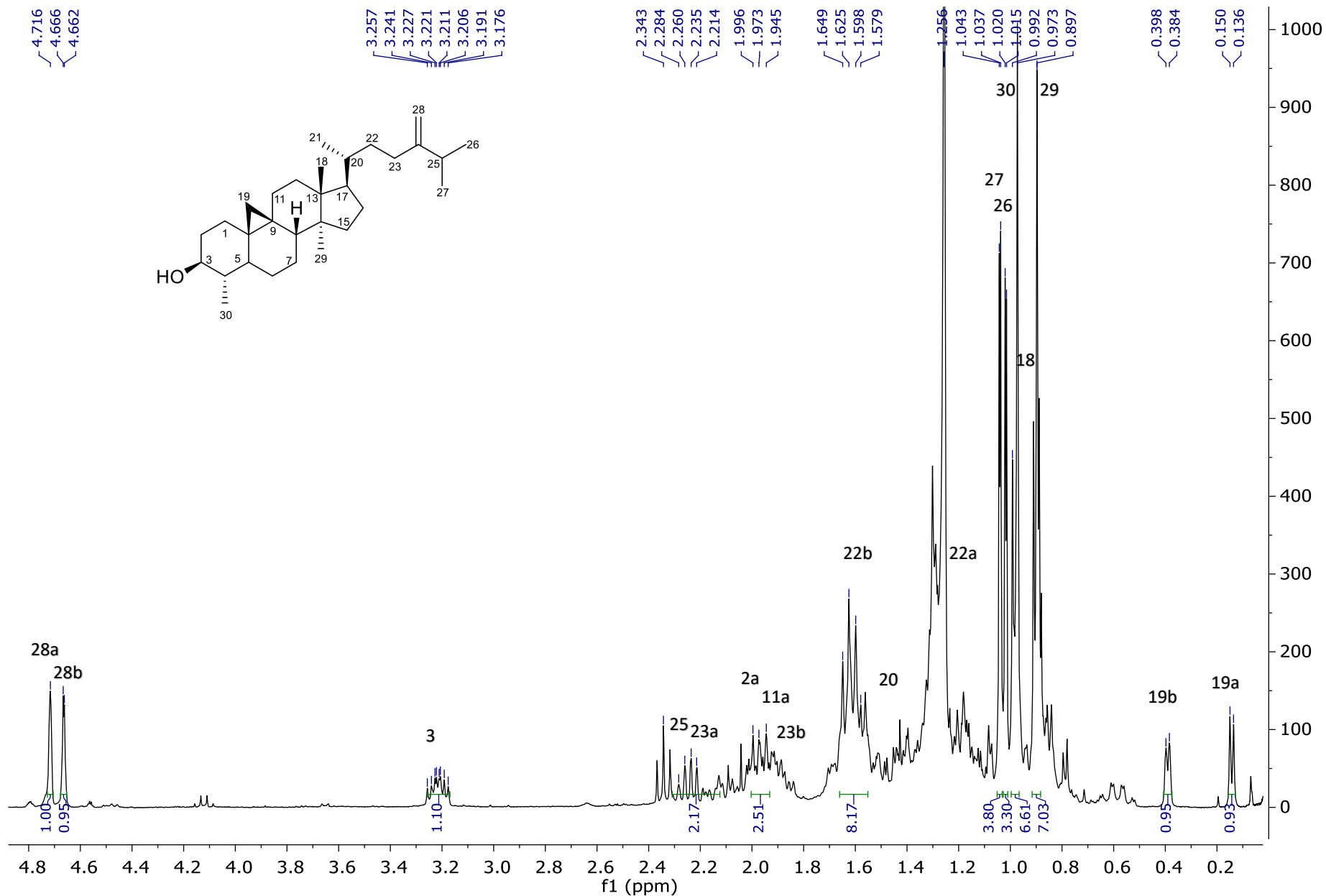
Espectro 8. RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) de palmitato de 11-oxo-β-amirilo (91)



Espectro 9. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de β -sitosterol (**27**) – estigmasterol (**28**) (4.3:1)



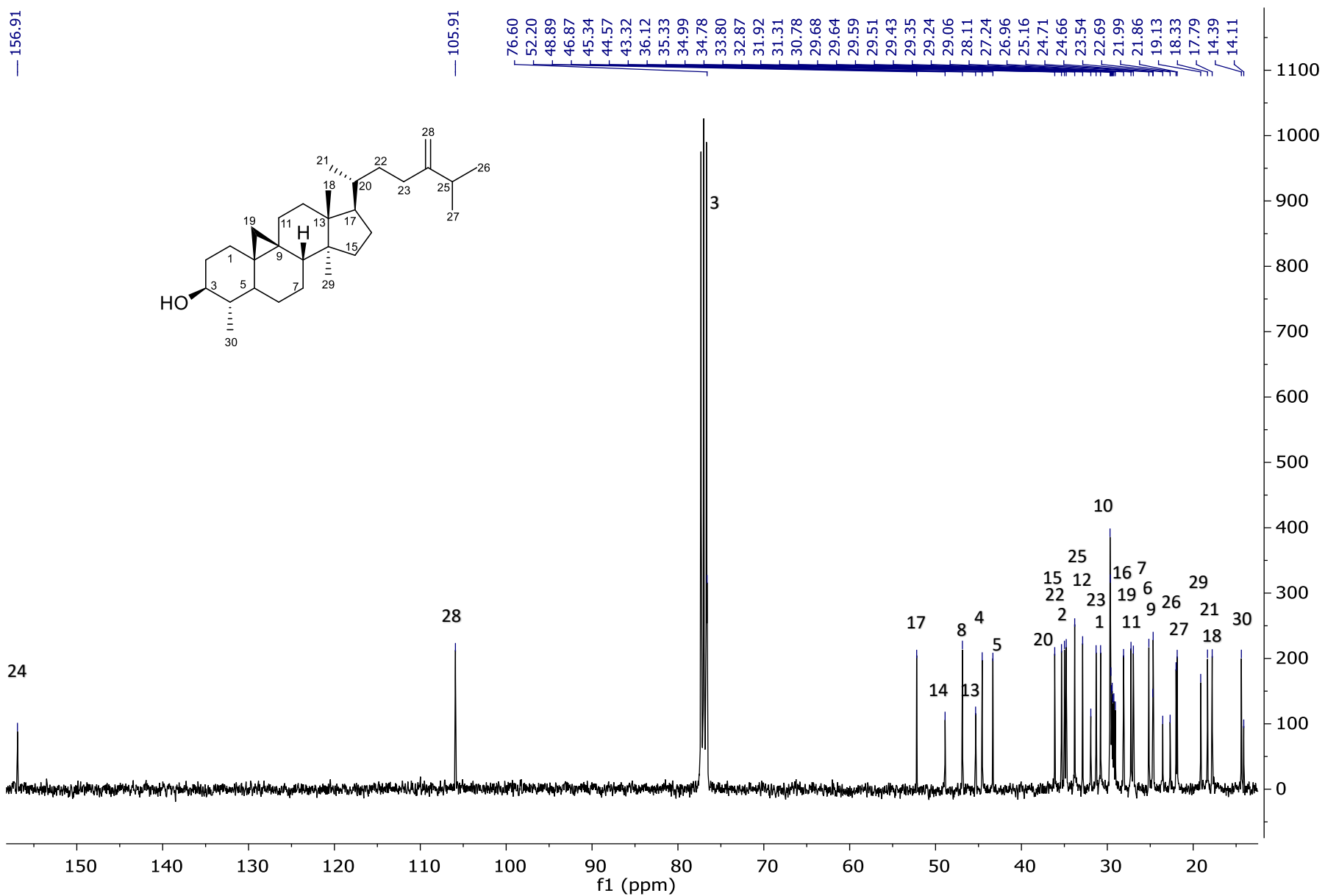
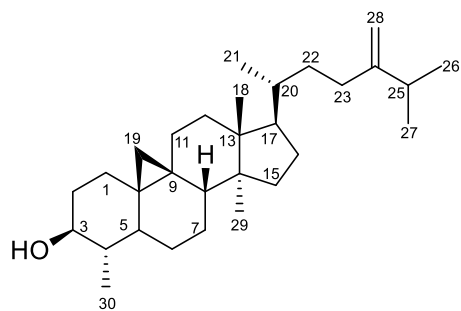
Espectro 10. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) de β -sitosterol (**27**) – estigmasterol (**28**) (4.3:1)



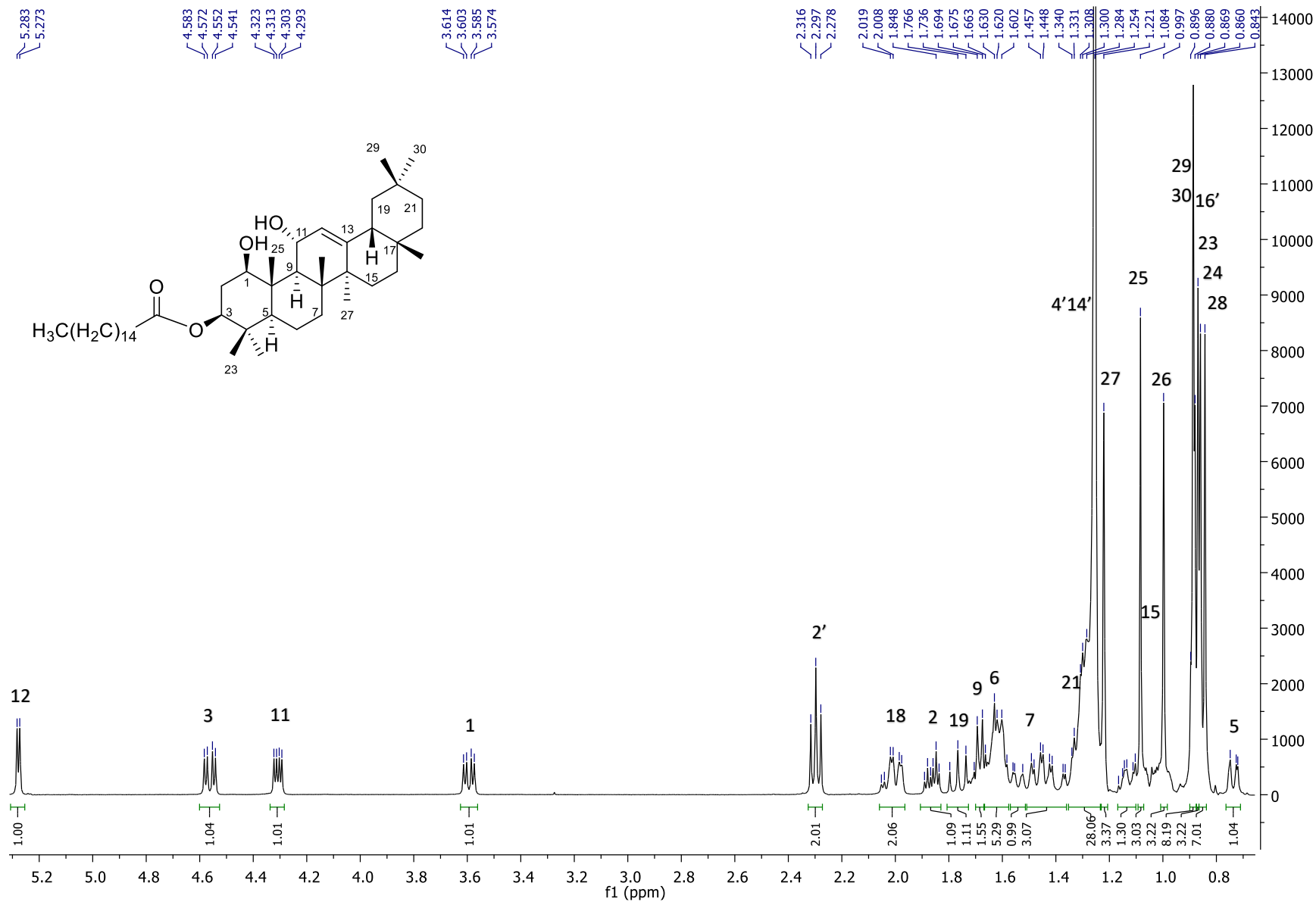
Espectro 11. RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) de cicloecalenol (92)

— 156.91

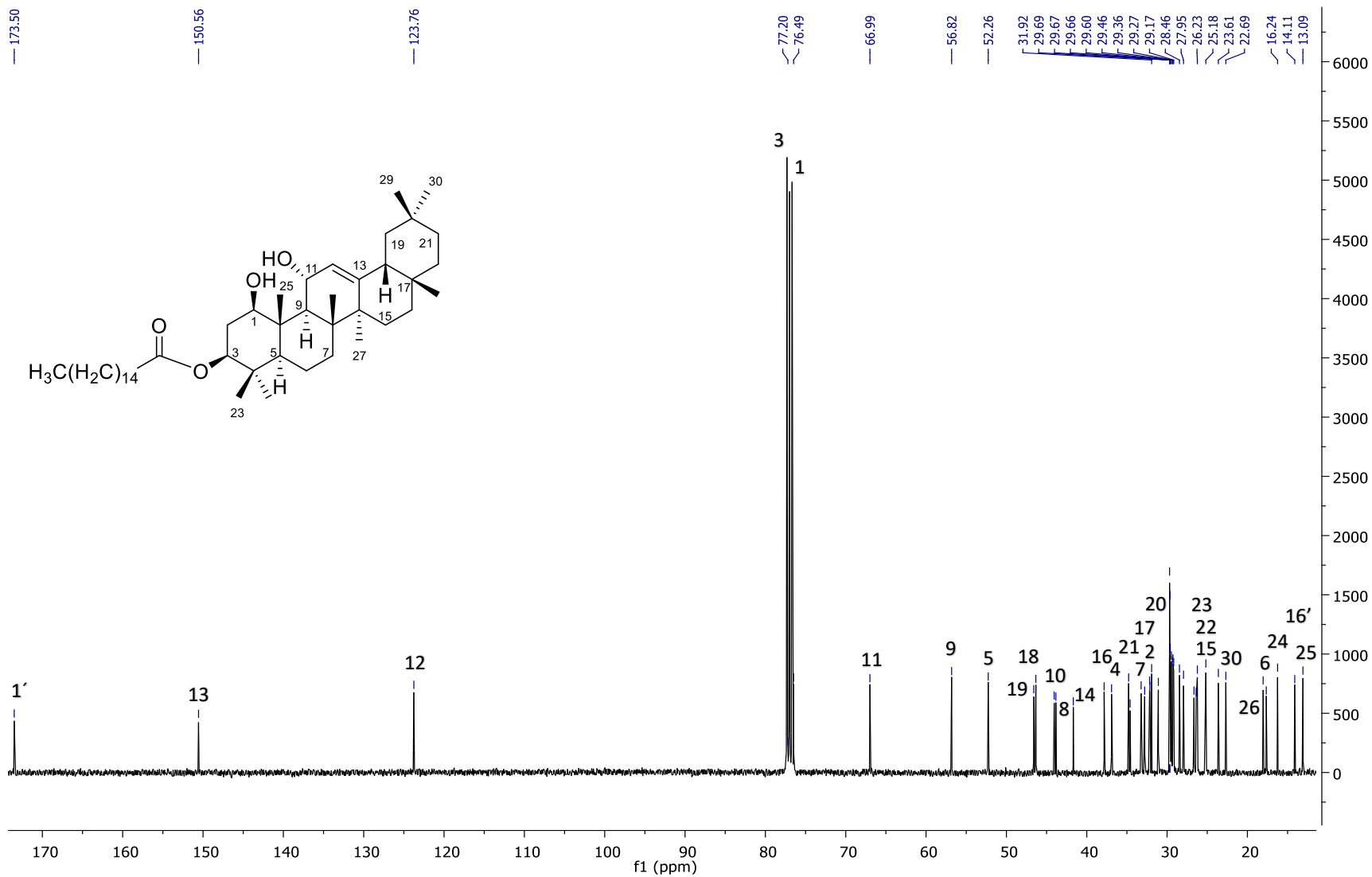
— 105.91



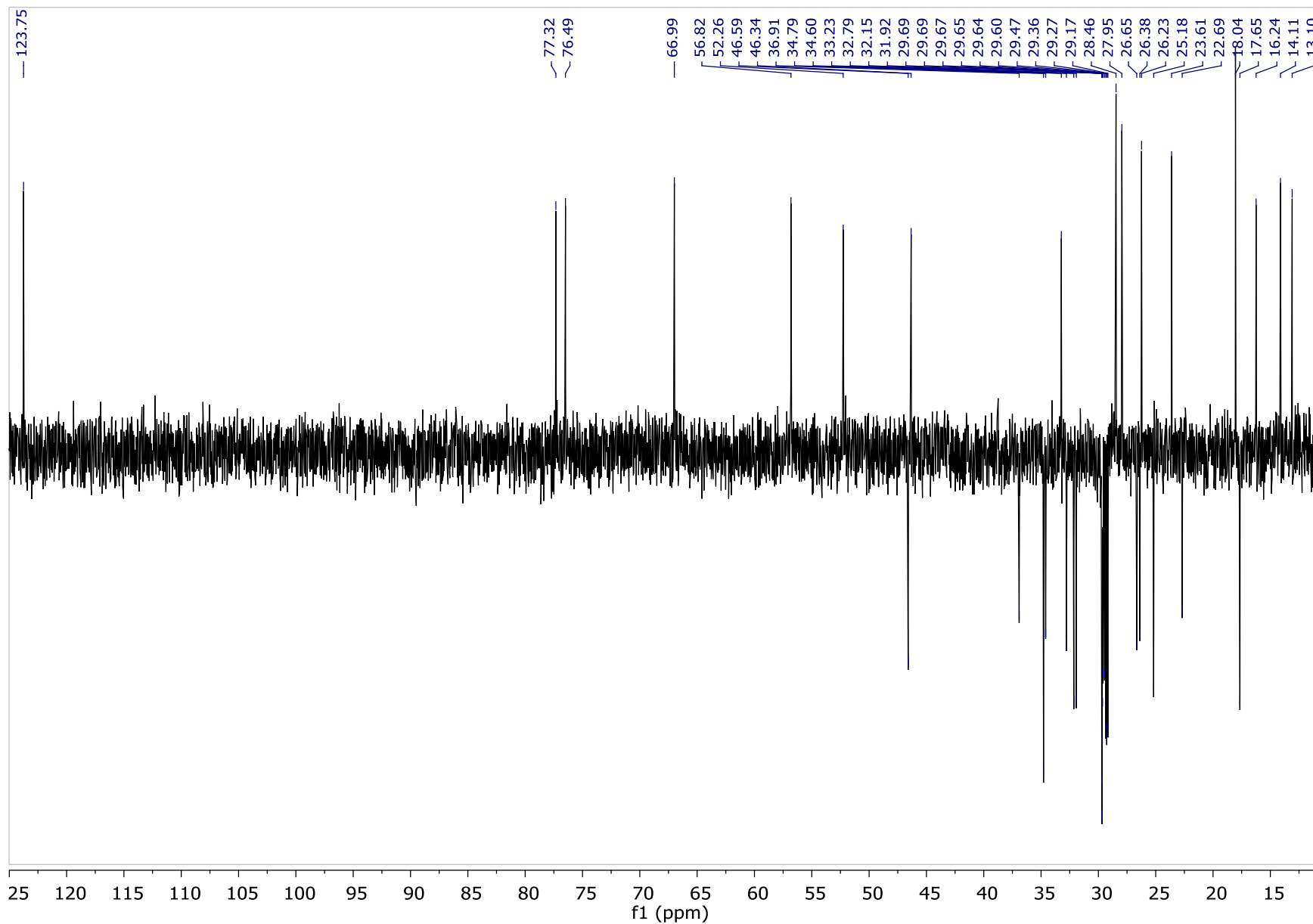
Espectro 12. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de cicloecalenol (**92**)



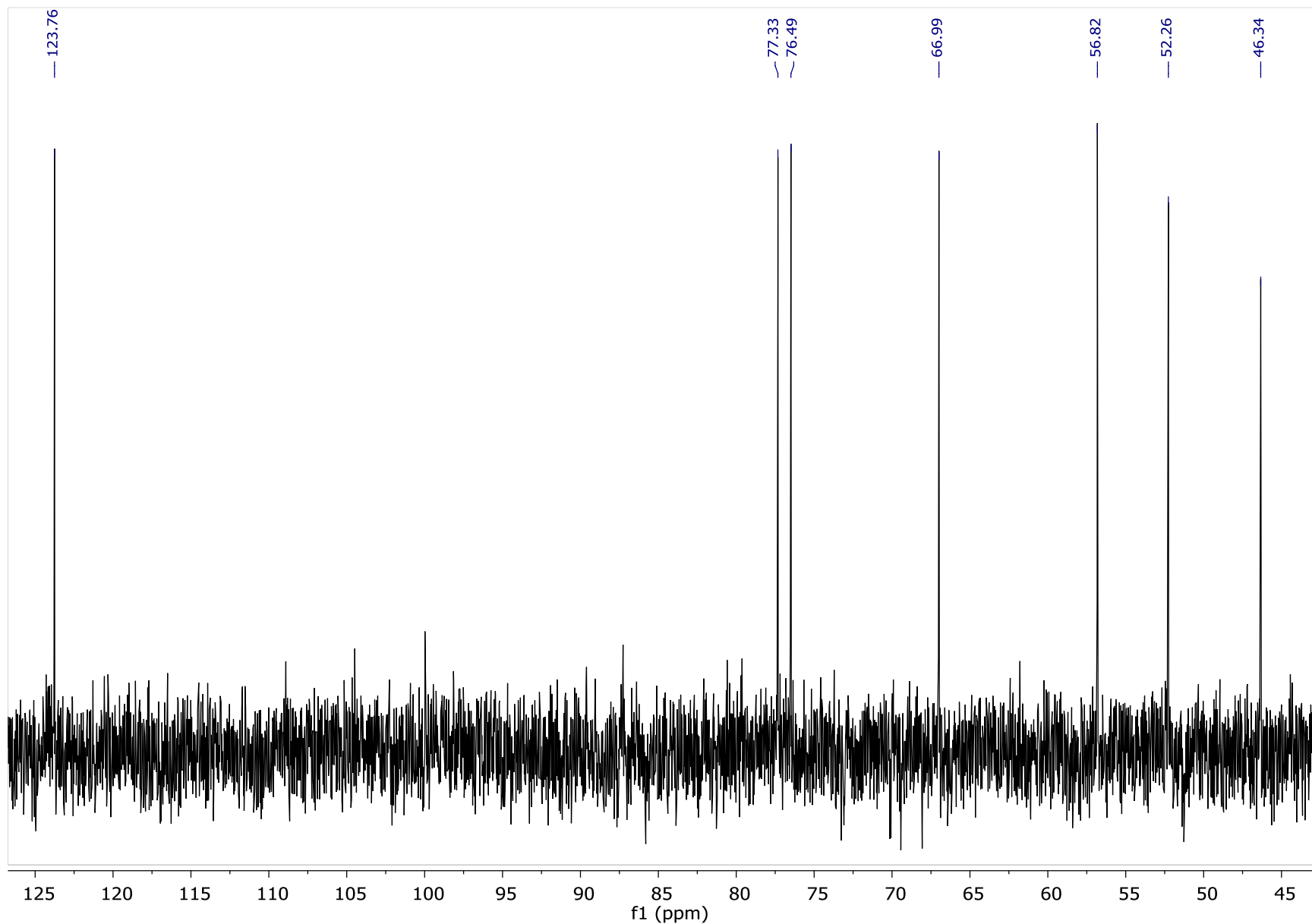
Espectro13. RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) de 3β-palmitoiloxi-1β,11α-dihidroxi-olean-12-eno (93)



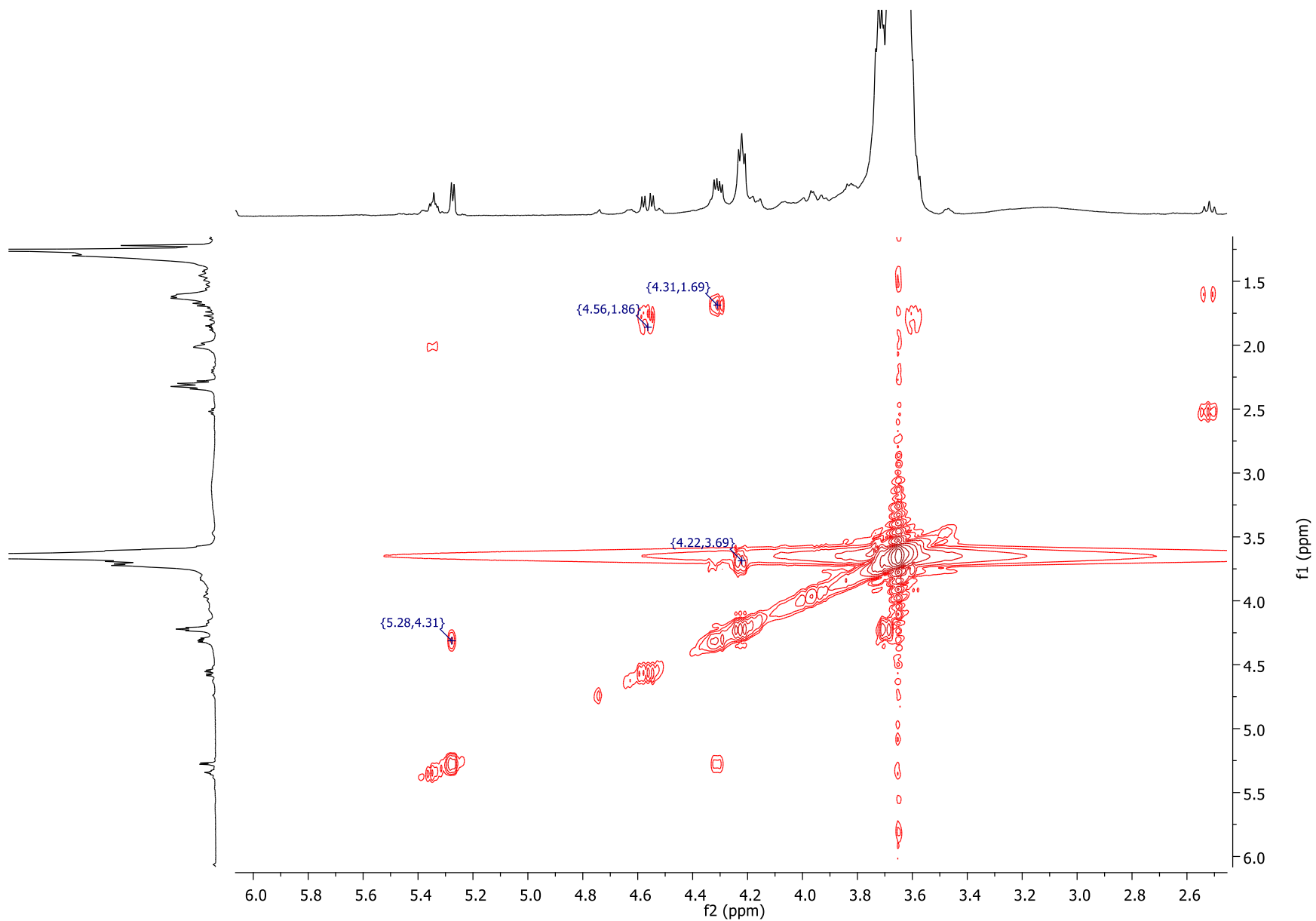
Espectro14. RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) de 3β-palmitoiloxi-1β,11α-dihidroxi-olean-12-eno (93)



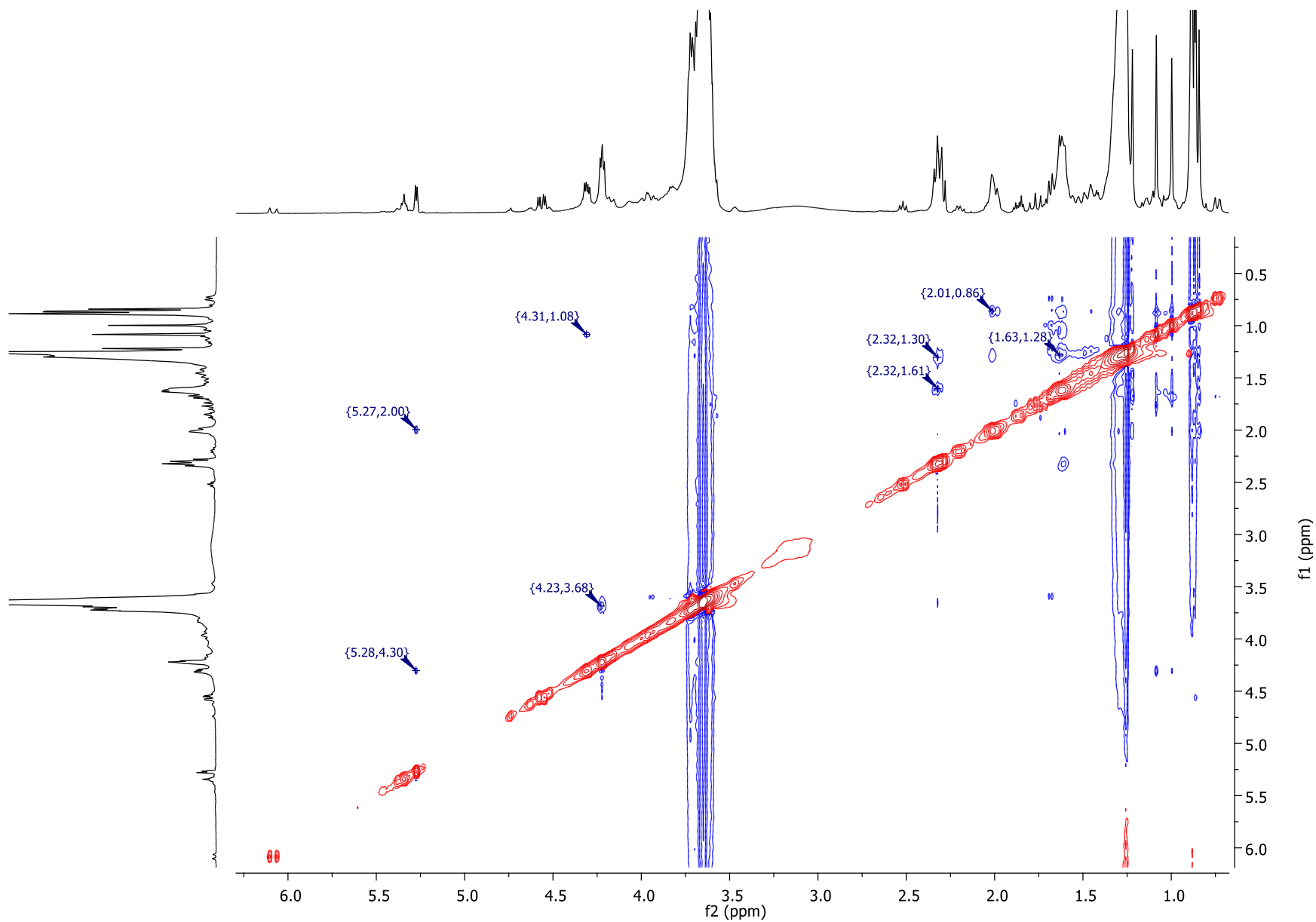
Espectro 15. DEPT 135 (CDCl₃, 100 MHz) de 3β-palmitoiloxi-1β,11α-dihidroxi-olean-12-eno (**93**)



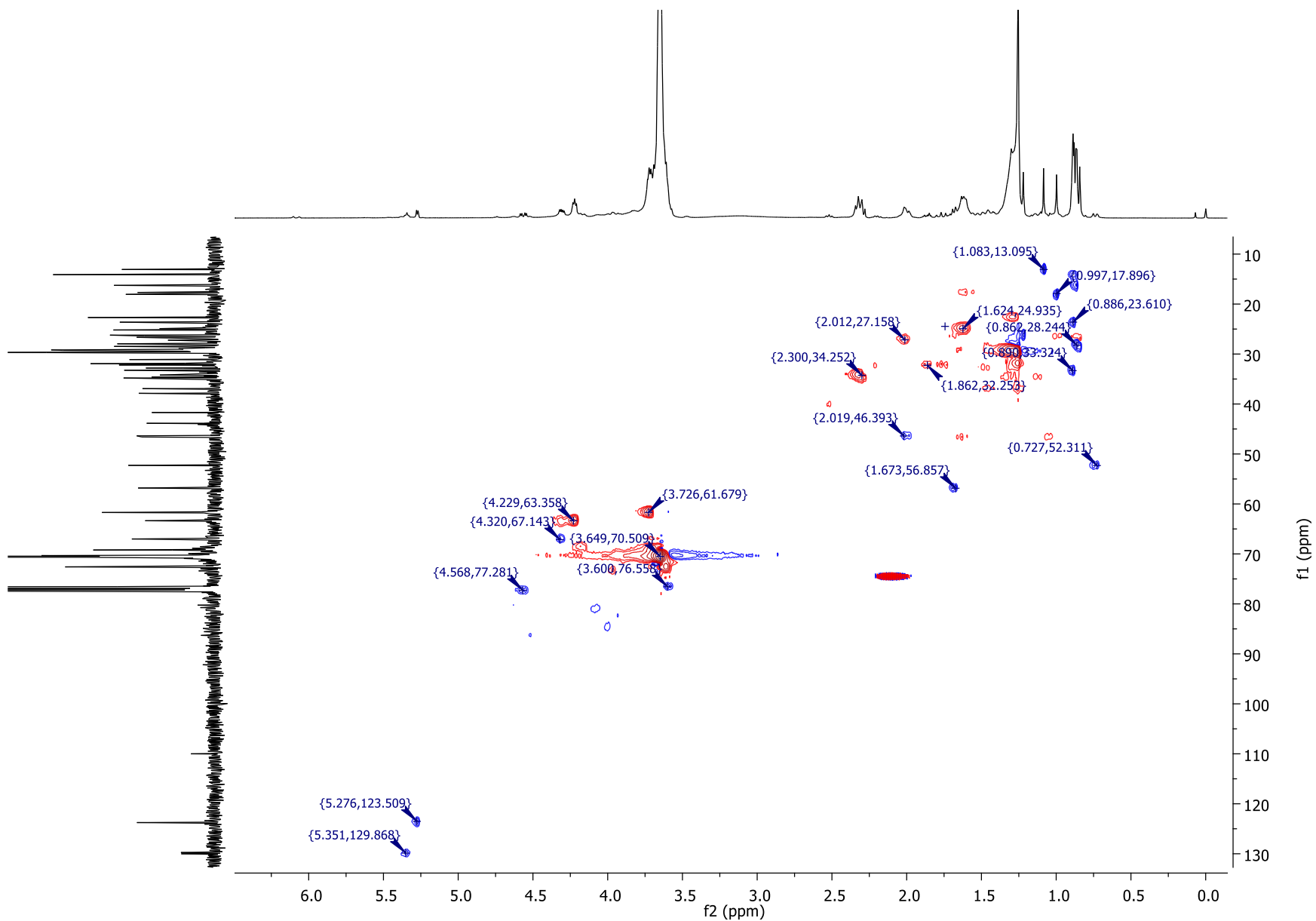
Espectro 16. DEPT 90 (CDCl₃, 100 MHz) de 3β-palmitoiloxi-1β,11α-dihidroxi-olean-12-eno (**93**)



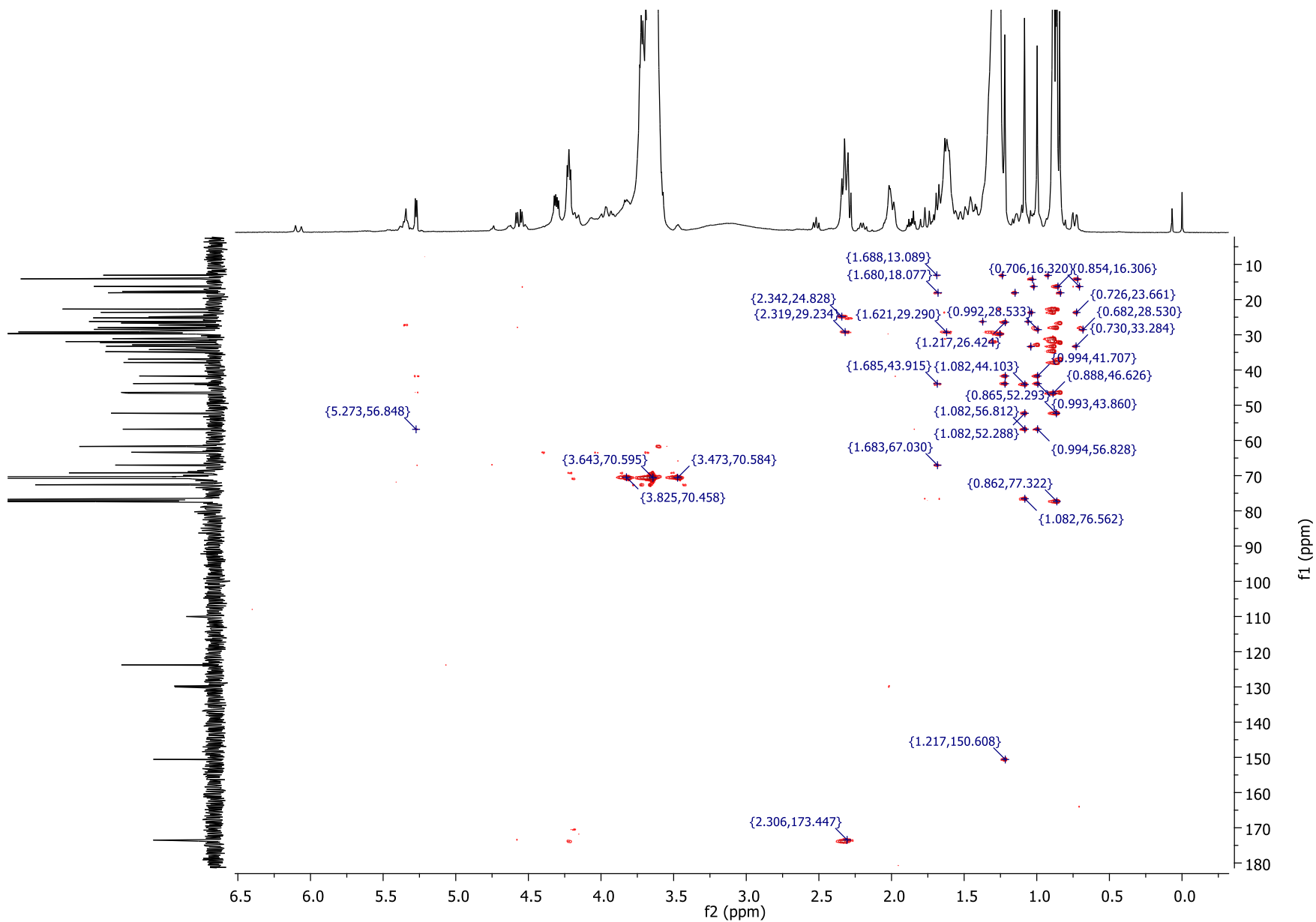
Espectro 17. COSY (CDCl₃, 400 MHz) de 3β-palmitoiloxi-1β,11α-dihidroxi-olean-12-eno (**93**)



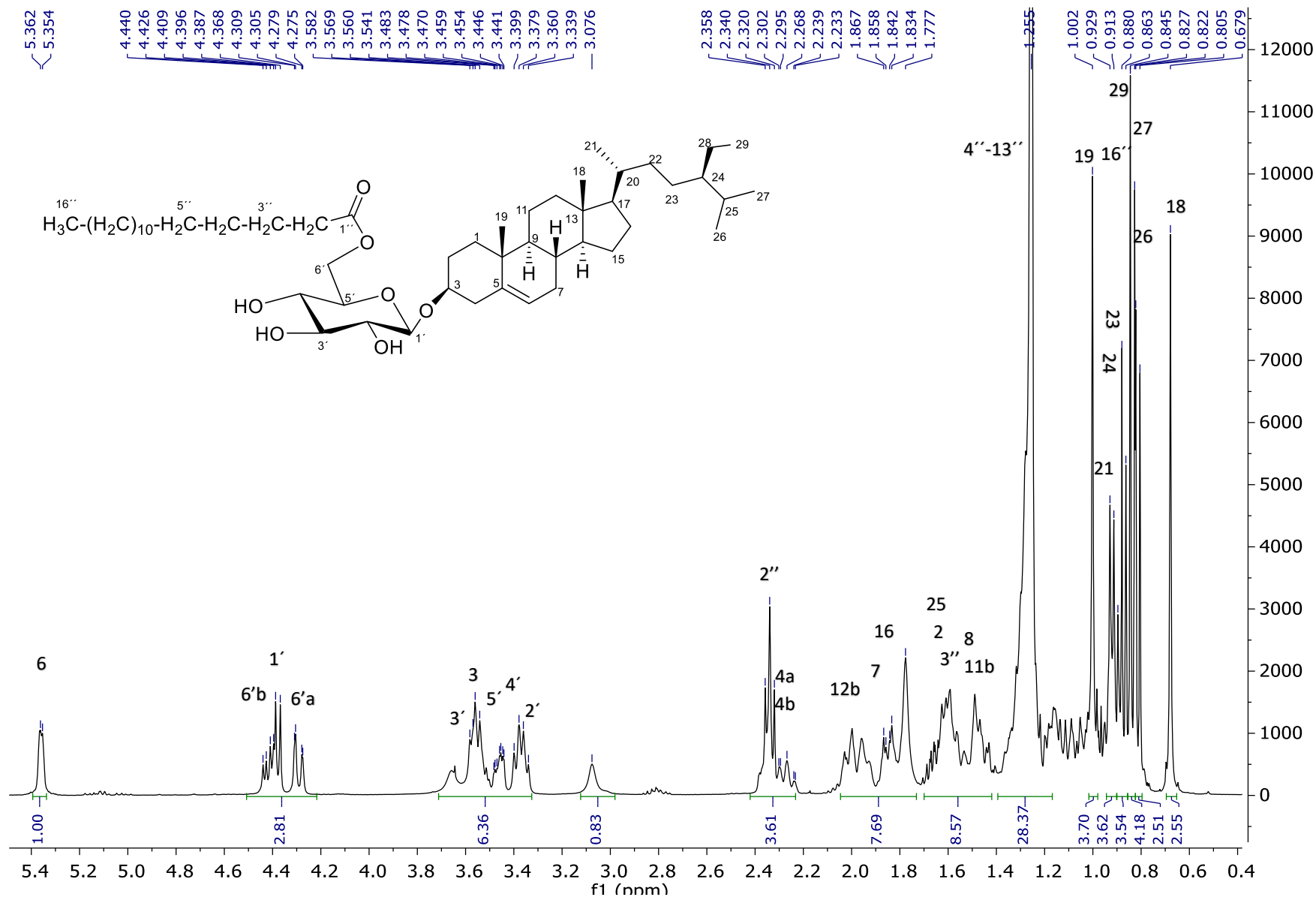
Espectro 18. NOESY (CDCl_3 , 400 MHz) de 3β -palmitoiloxi- 1β , 11α -dihidroxi-olean-12-eno (**93**)



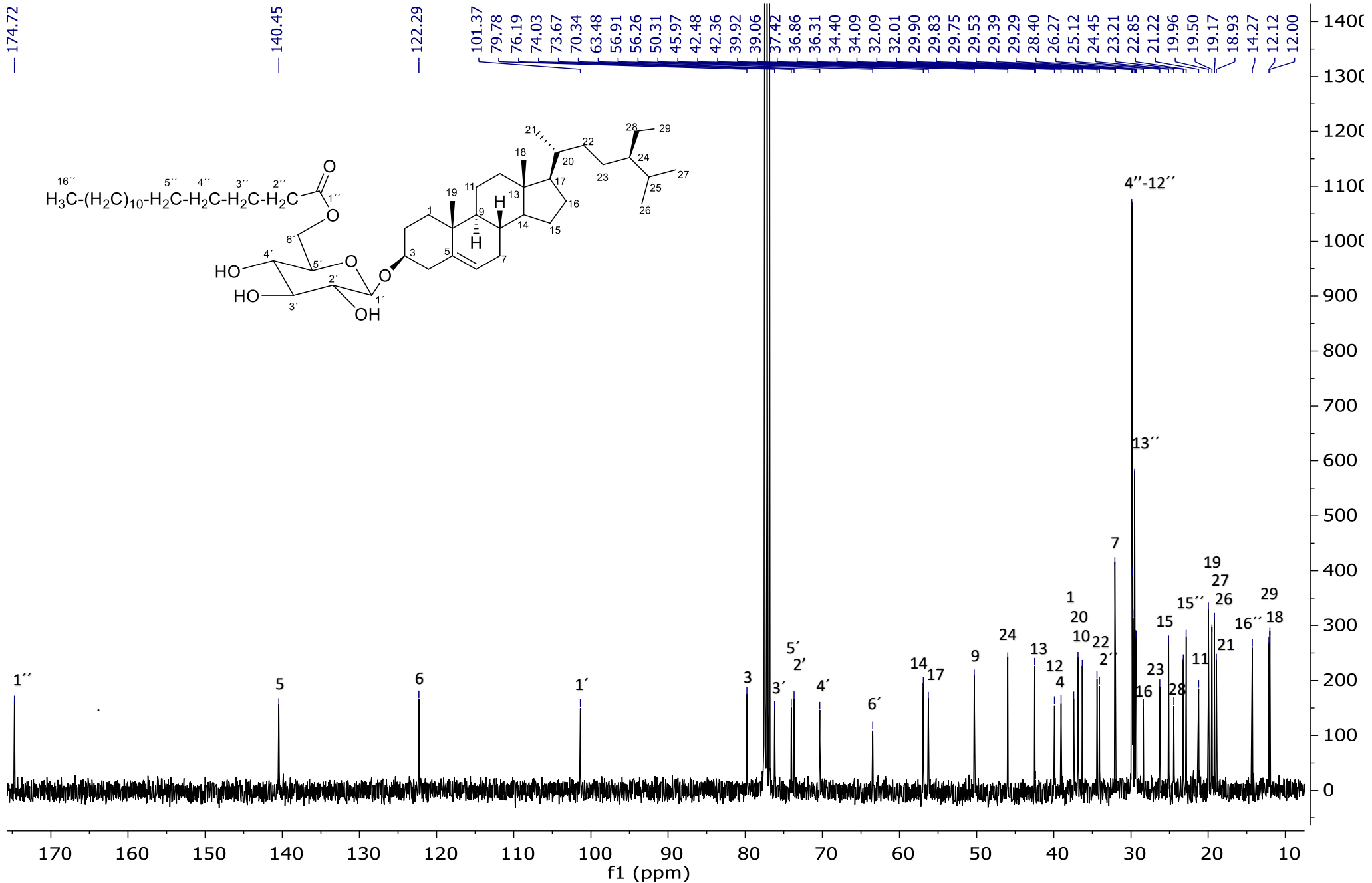
Espectro 19. HSQC (CDCl_3 , 100 MHz) de 3β -palmitoiloxi- $1\beta,11\alpha$ -dihidroxi-olean-12-eno (**93**)



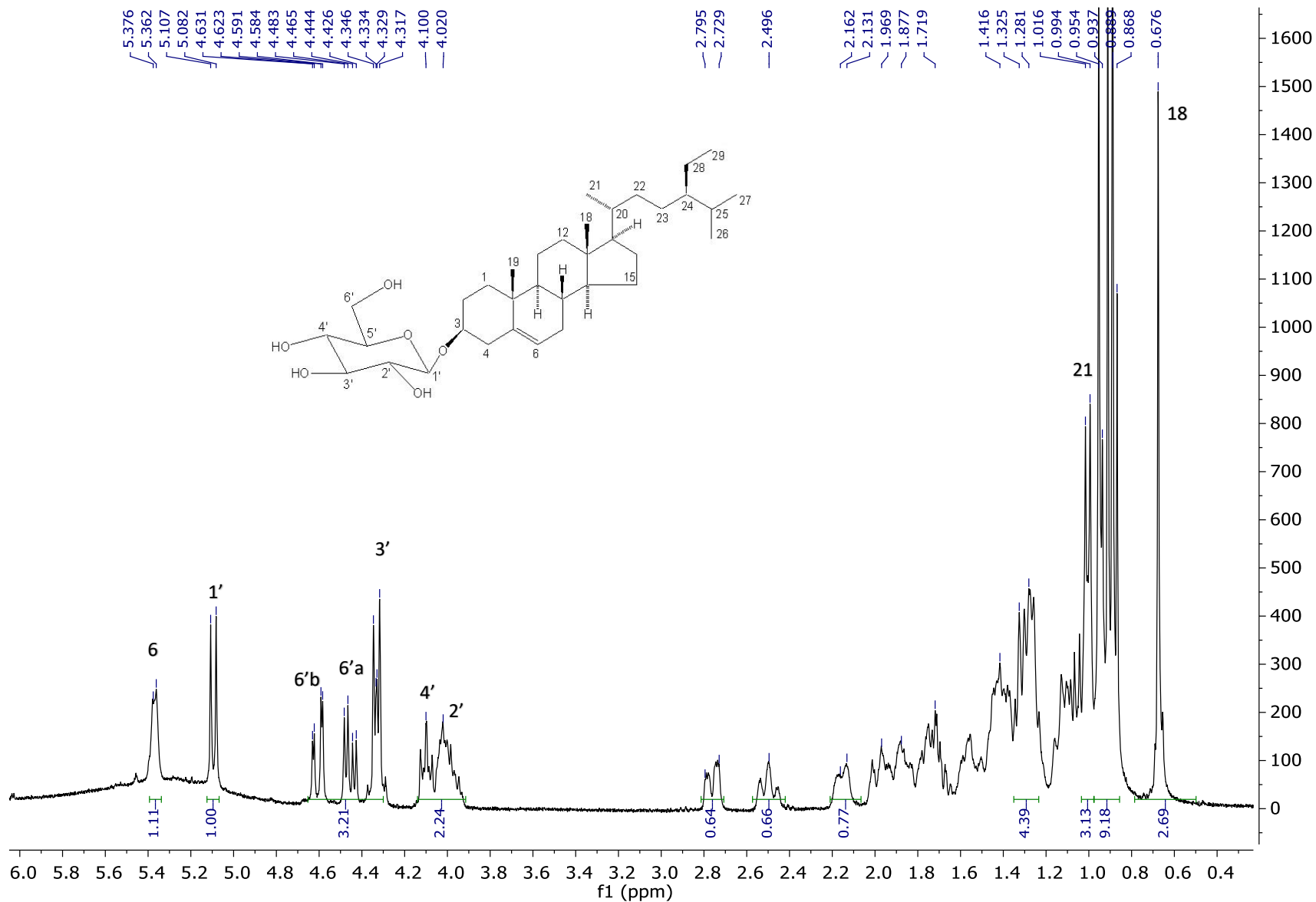
Espectro 20. HMBC (CDCl₃, 100 MHz) de 3β-palmitoiloxi-1β,11α-dihidroxi-olean-12-eno (**93**)



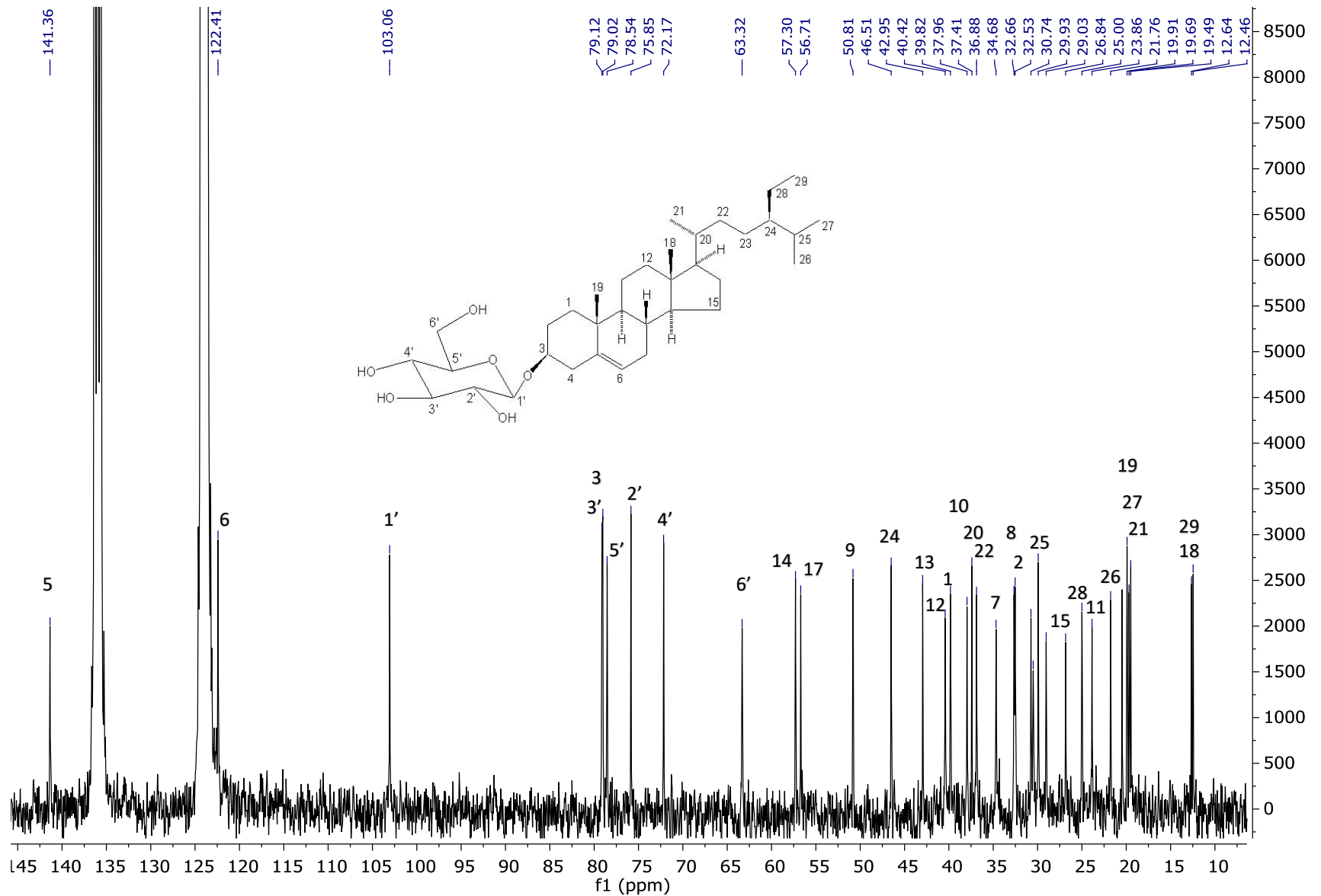
Espectro 21. RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) de 6'-palmitoil-β-D-glucopiranósido de β-sitosterilo (**94**)



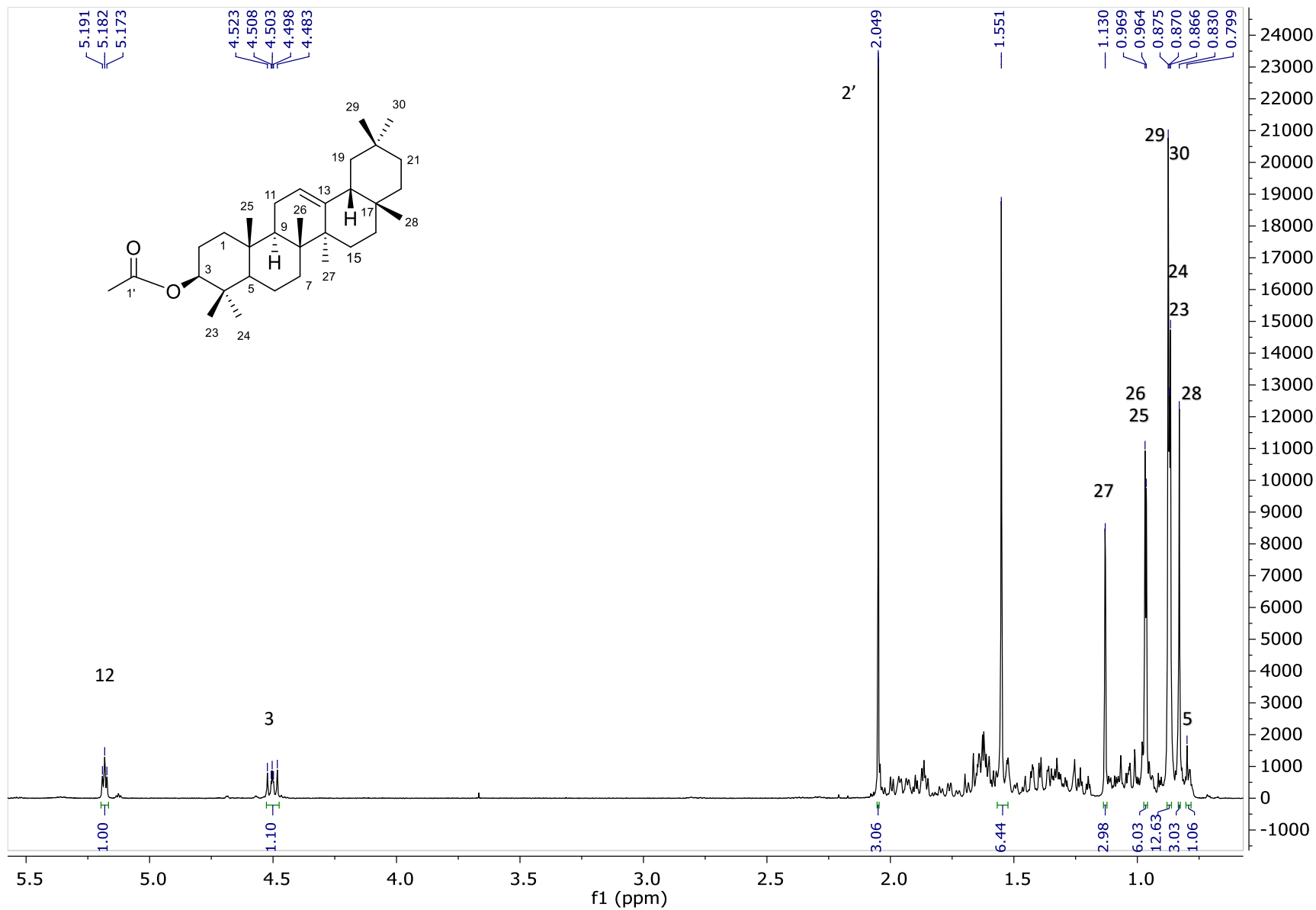
Espectro 22. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de 6'-palmitoil- β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo (94)



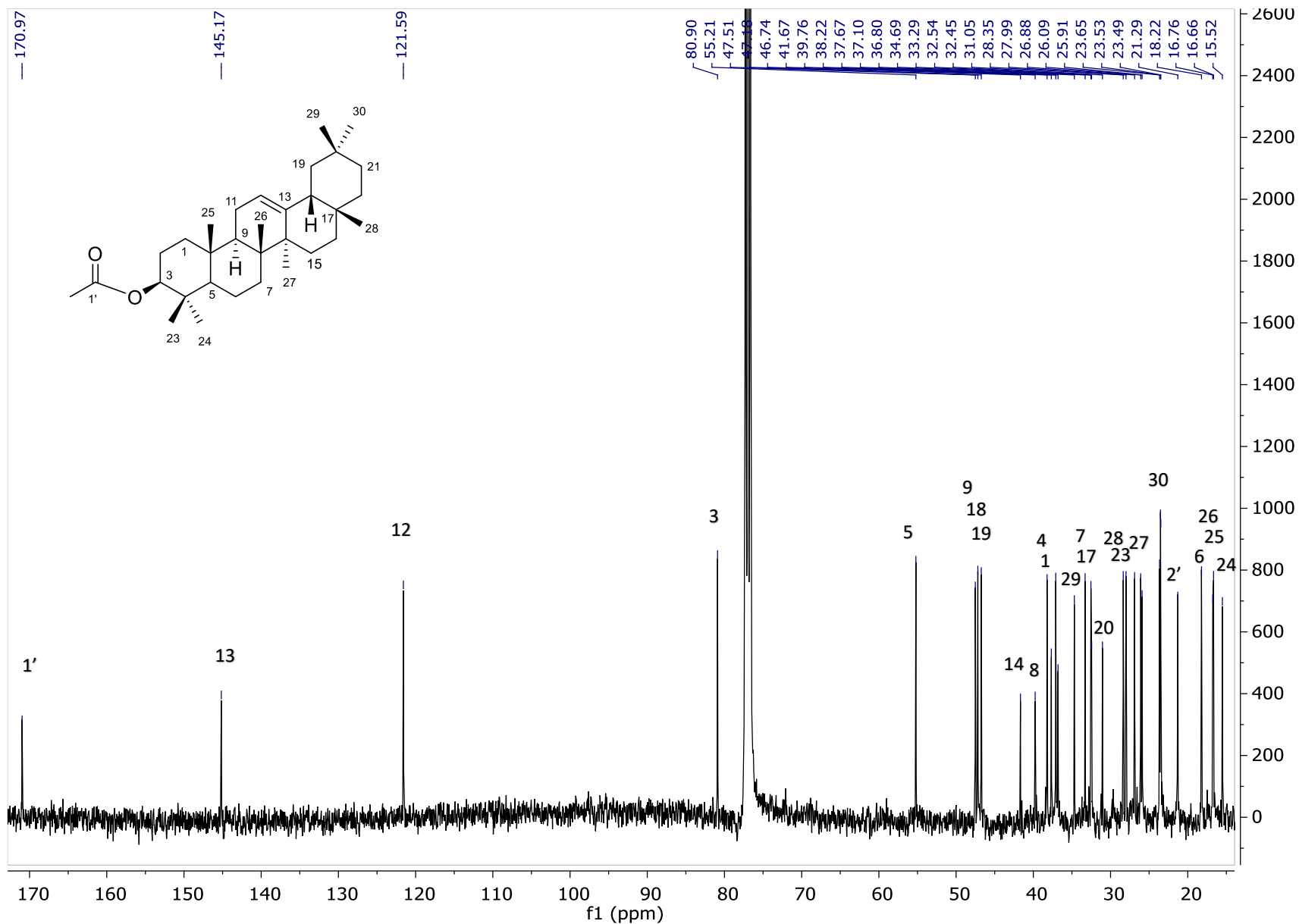
Espectro 23. RMN ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 300 MHz) de β -D-glucopiranósido de β -sitosterilo (95)



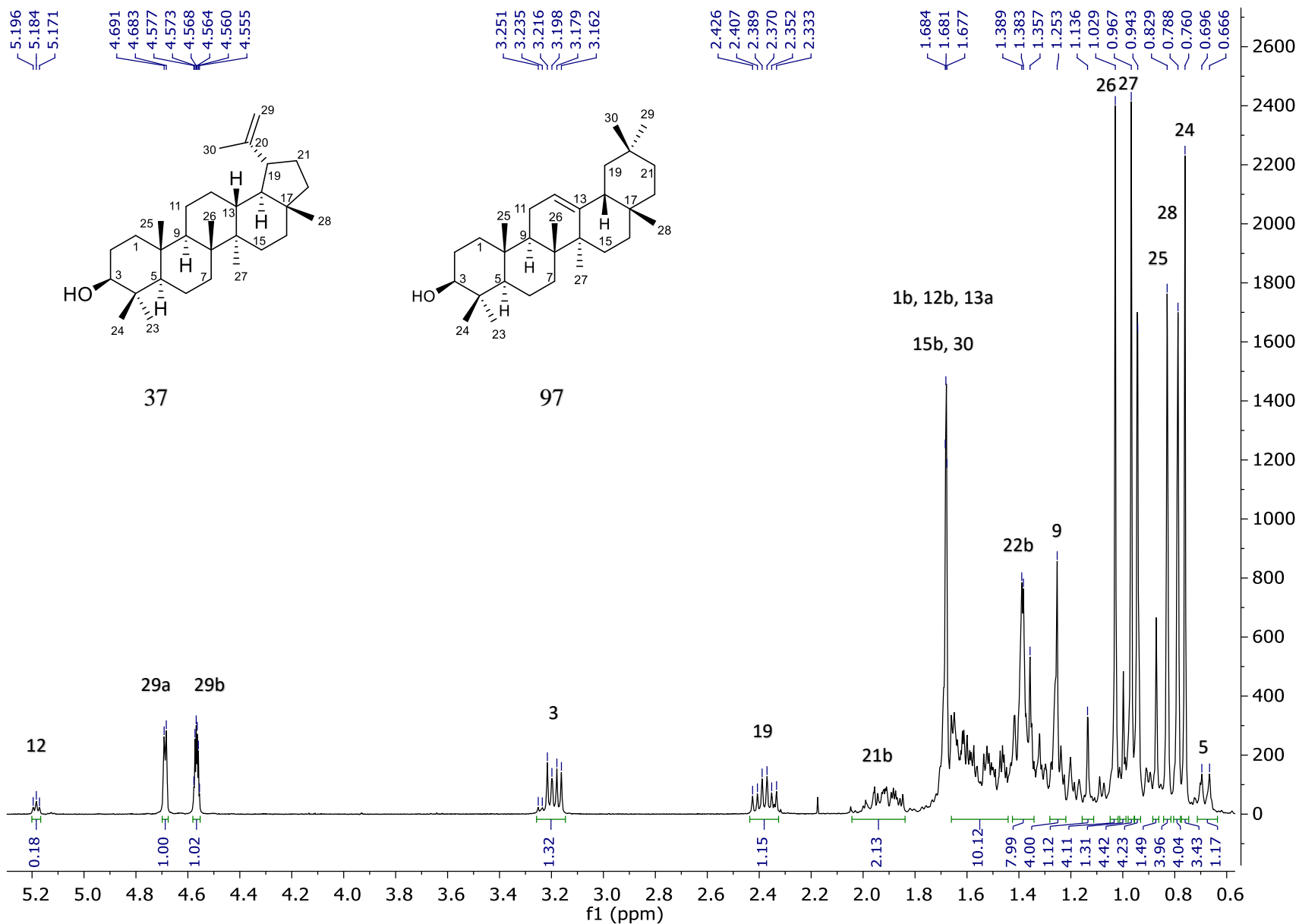
Espectro 24. RMN ^{13}C ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 75 MHz) de β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo (**95**)



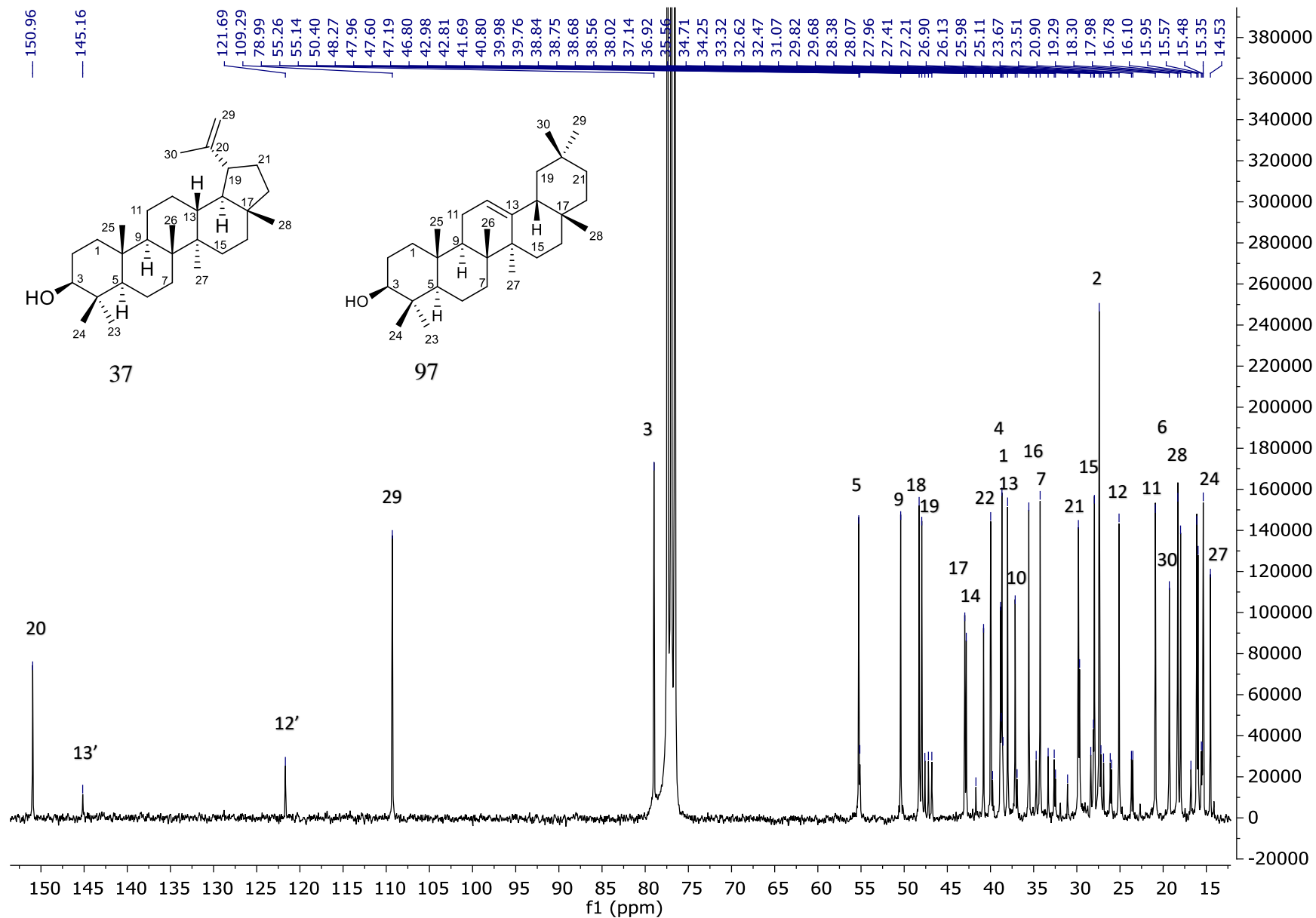
Espectro 25. RMN ^1H (CDCl₃, 400 MHz) de acetato de β -amirilo (**96**)



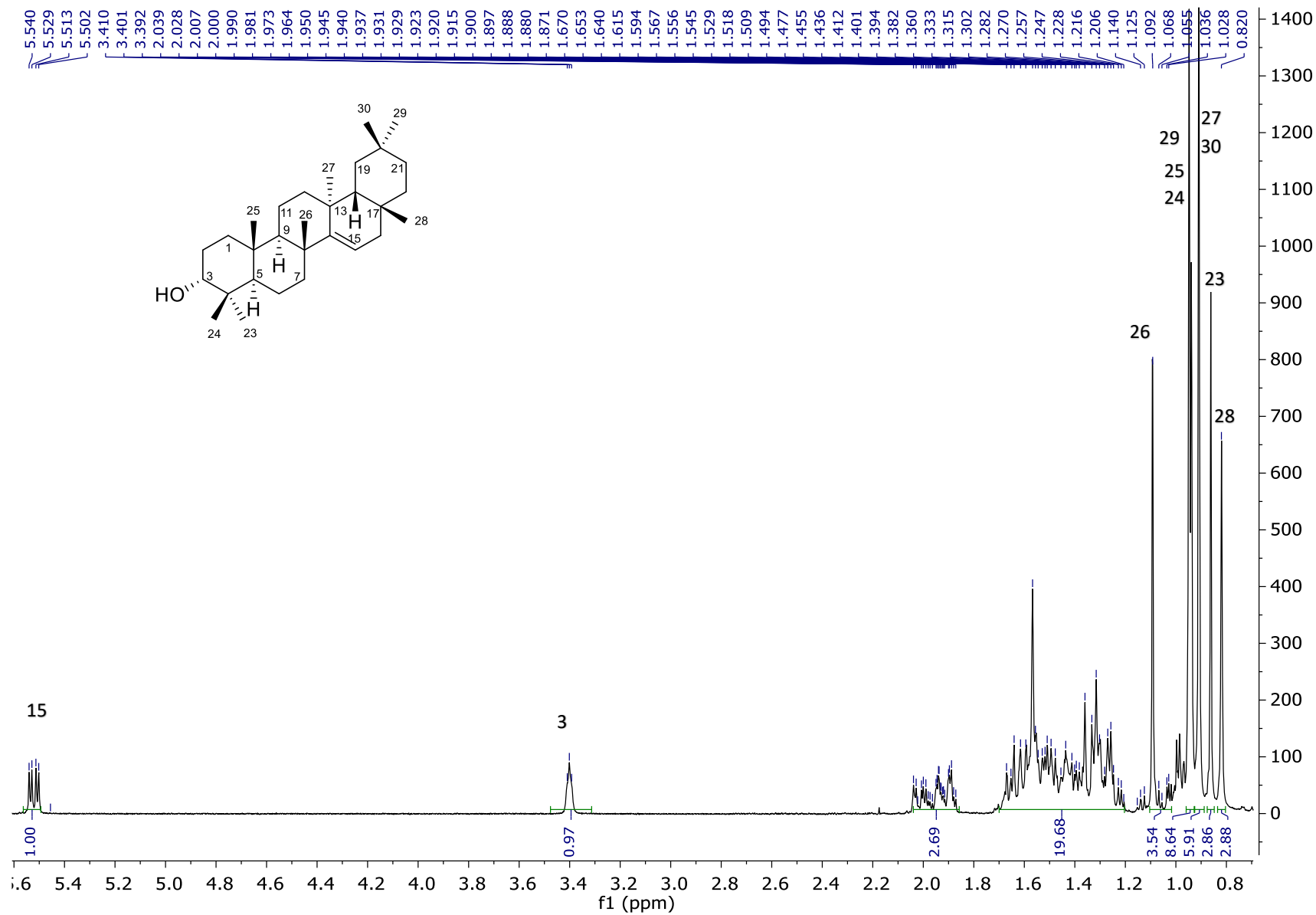
Espectro 26. RMN ^{13}C (CDCl₃, 100 MHz) de acetato de β -amirilo (**96**)



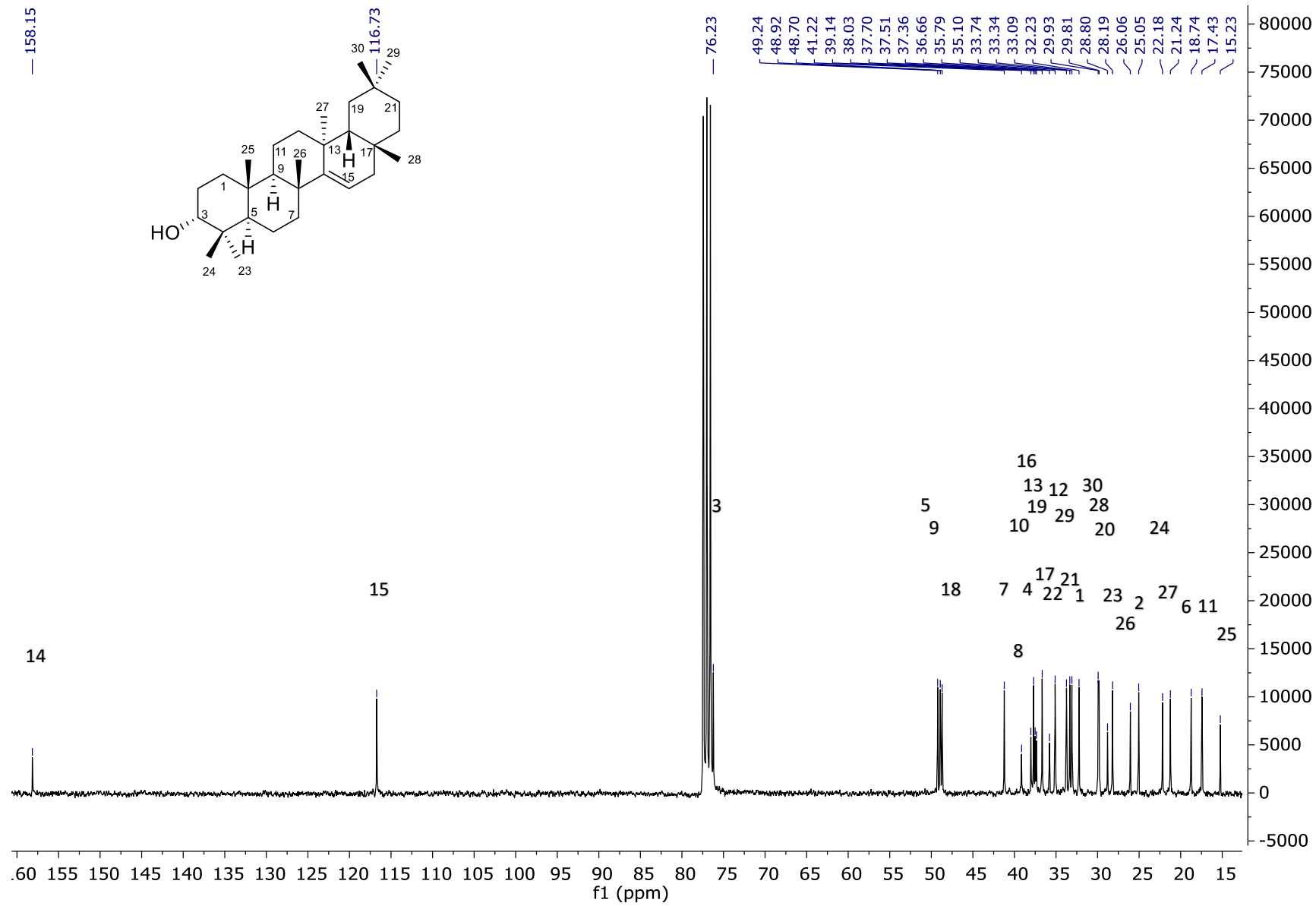
Espectro 27. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) mezcla de 19βH-lupeol (37) y β-amirina (97) (9:1)



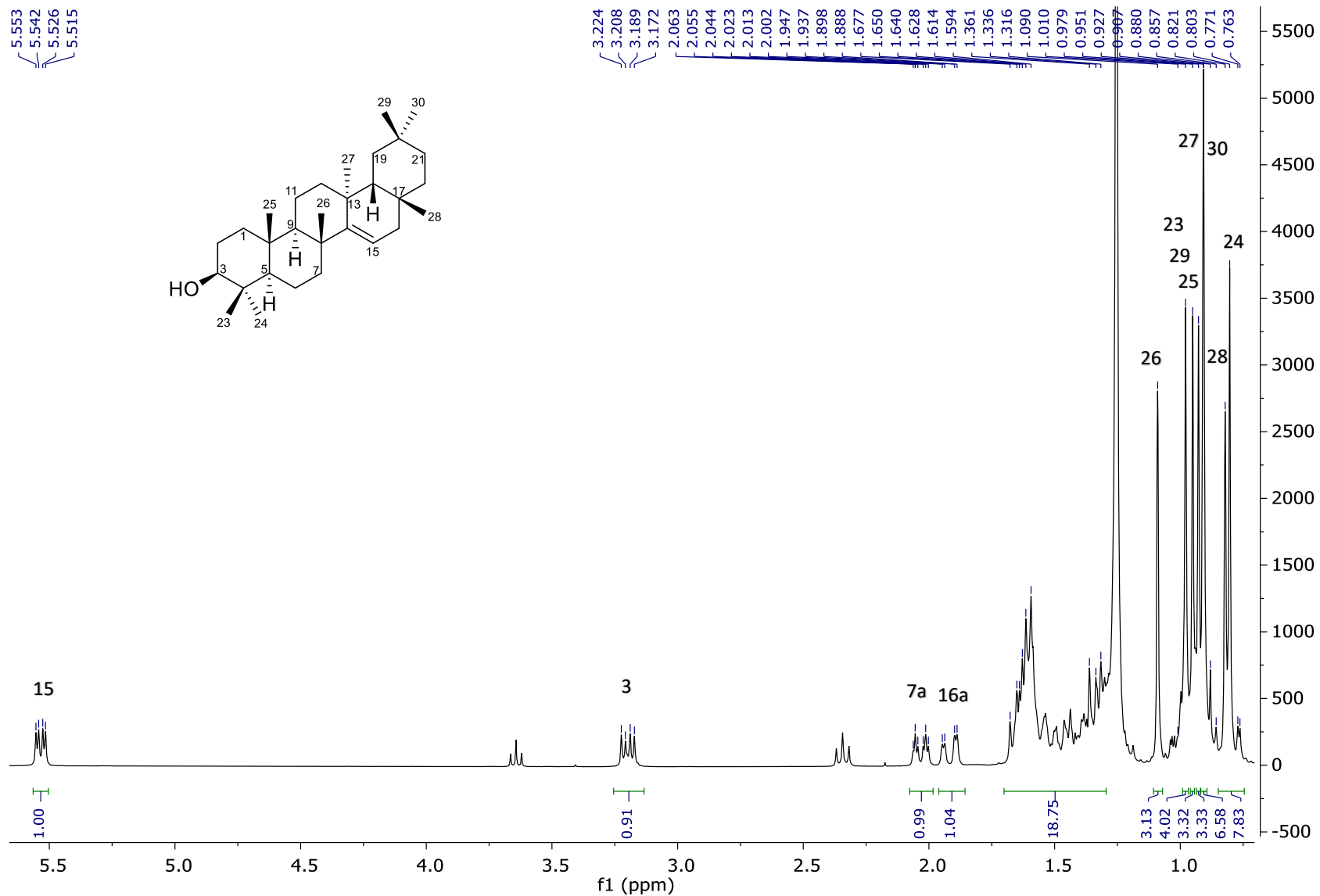
Espectro 28. RMN ^{13}C (CDCl₃, 75 MHz) mezcla de $19\beta\text{H}$ -lupeol (**37**) y β -amirina (**97**) (9:1)



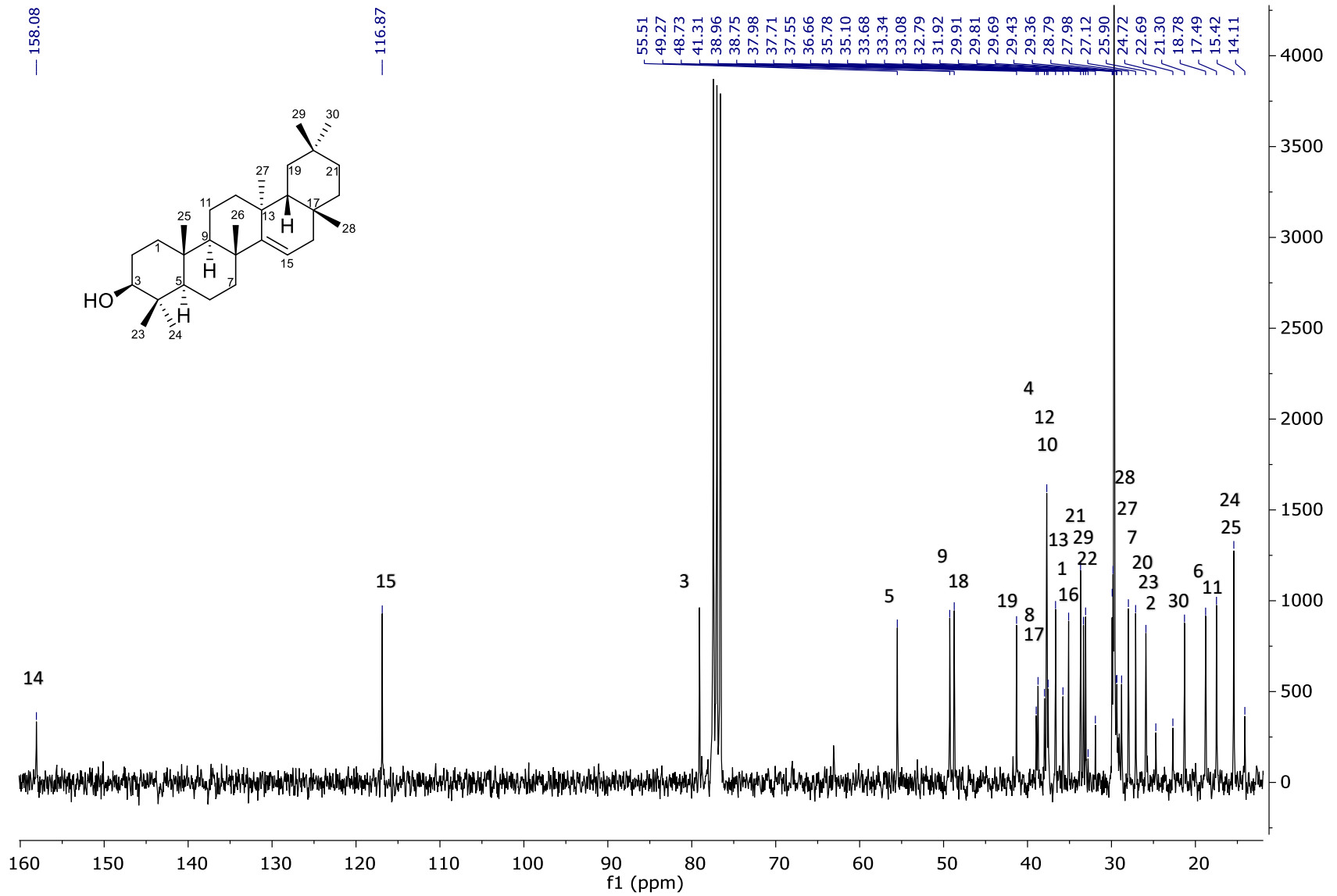
Espectro 29. RMN ^1H (CDCl₃, 300 MHz) de *epi*-taraxerol (98)



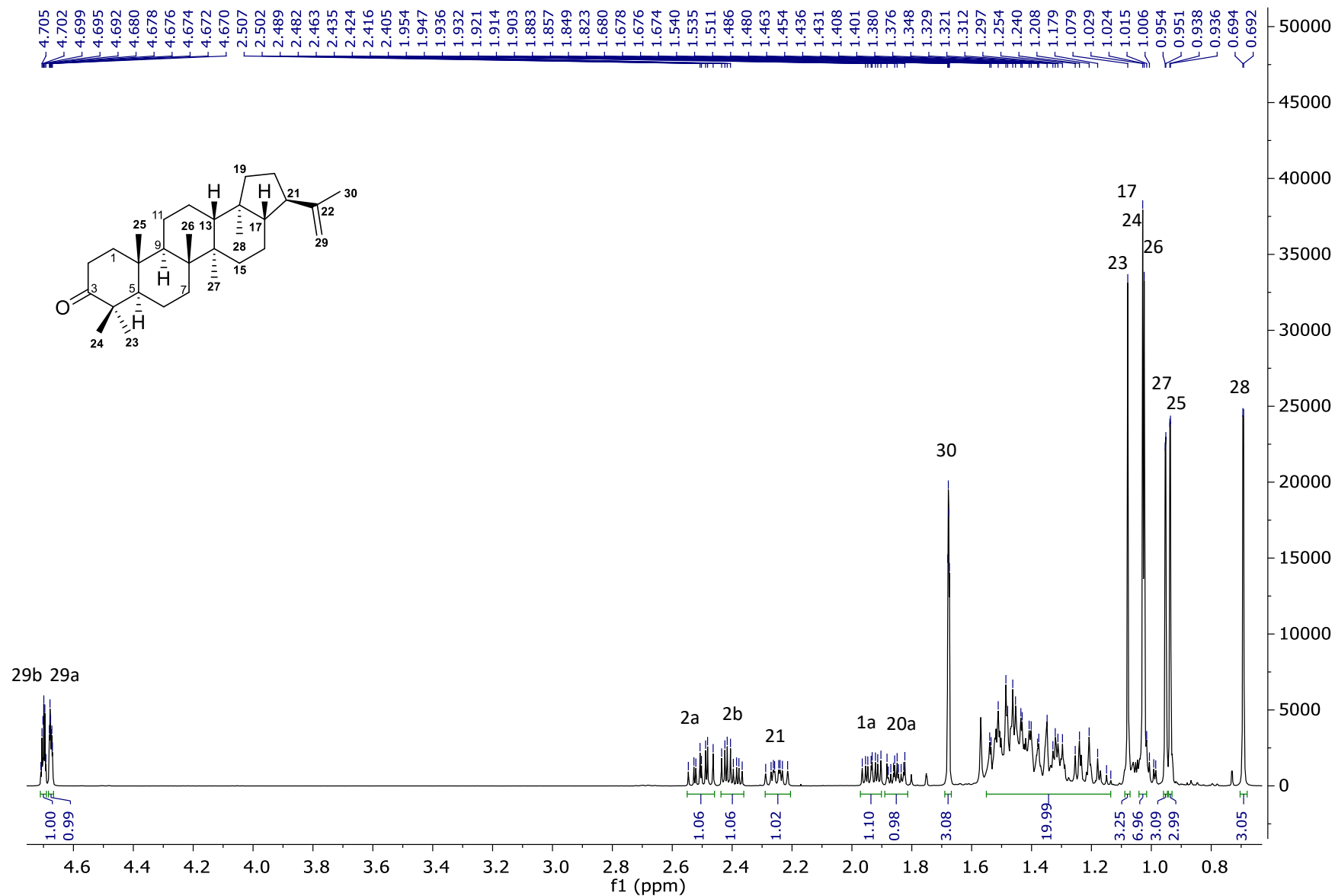
Espectro 30. RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) de *epi*-taraxerol (**98**)



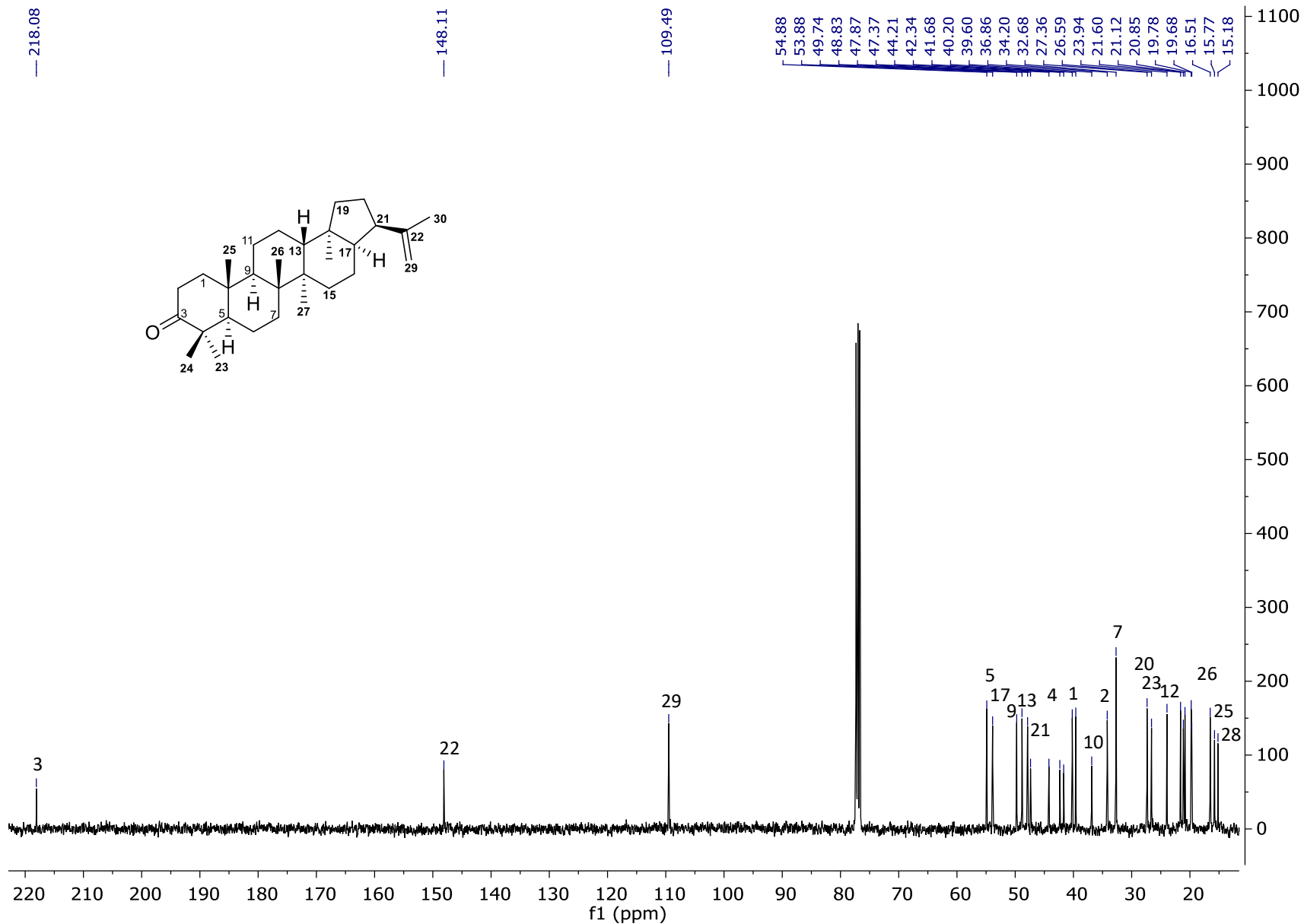
Espectro 31. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) de taraxerol (43)



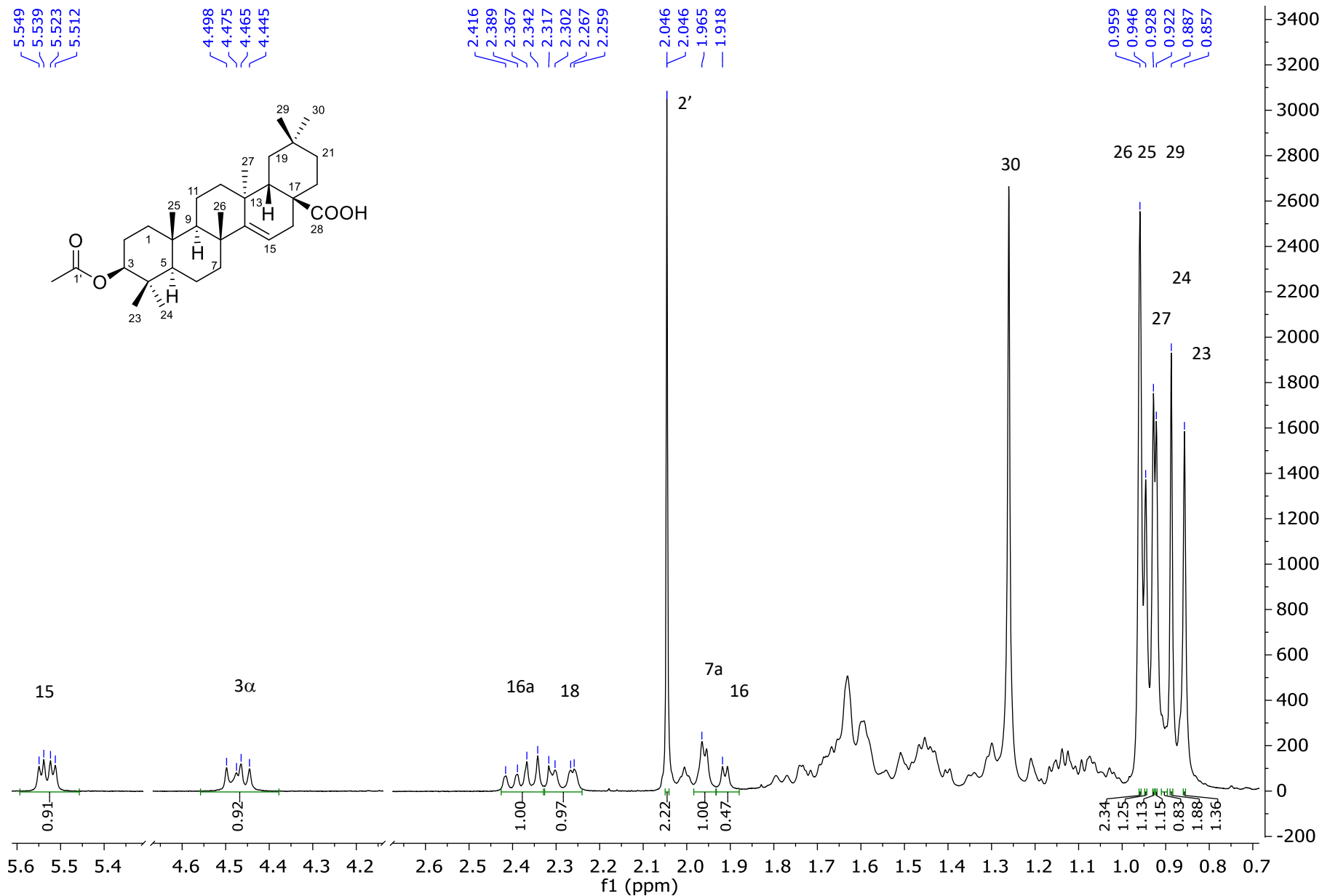
Espectro 32. RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) de taraxerol (43)



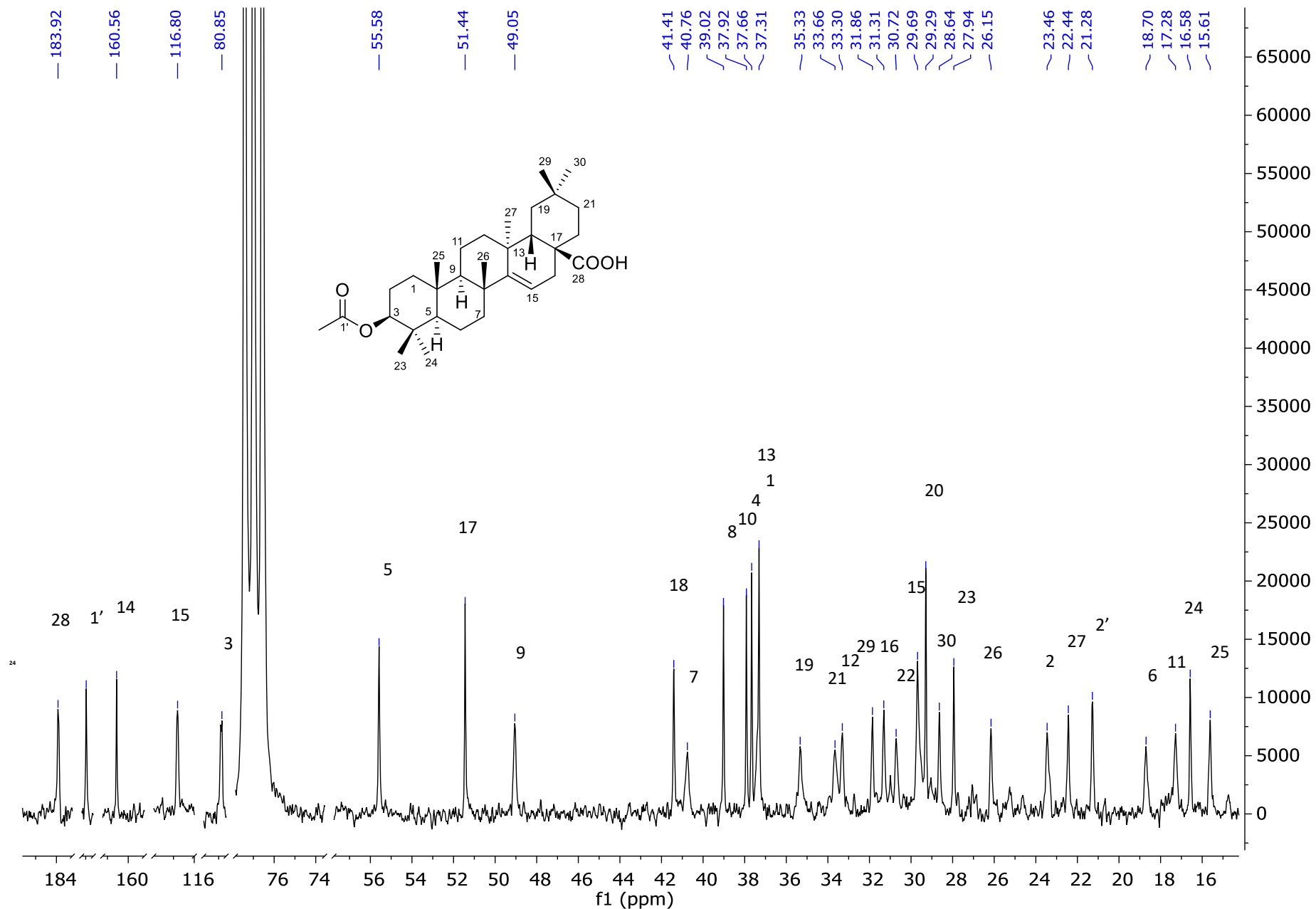
Espectro 33. RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) de 3-oxo-21 α H-hop-22(29)-eno (**25**, moretenona)



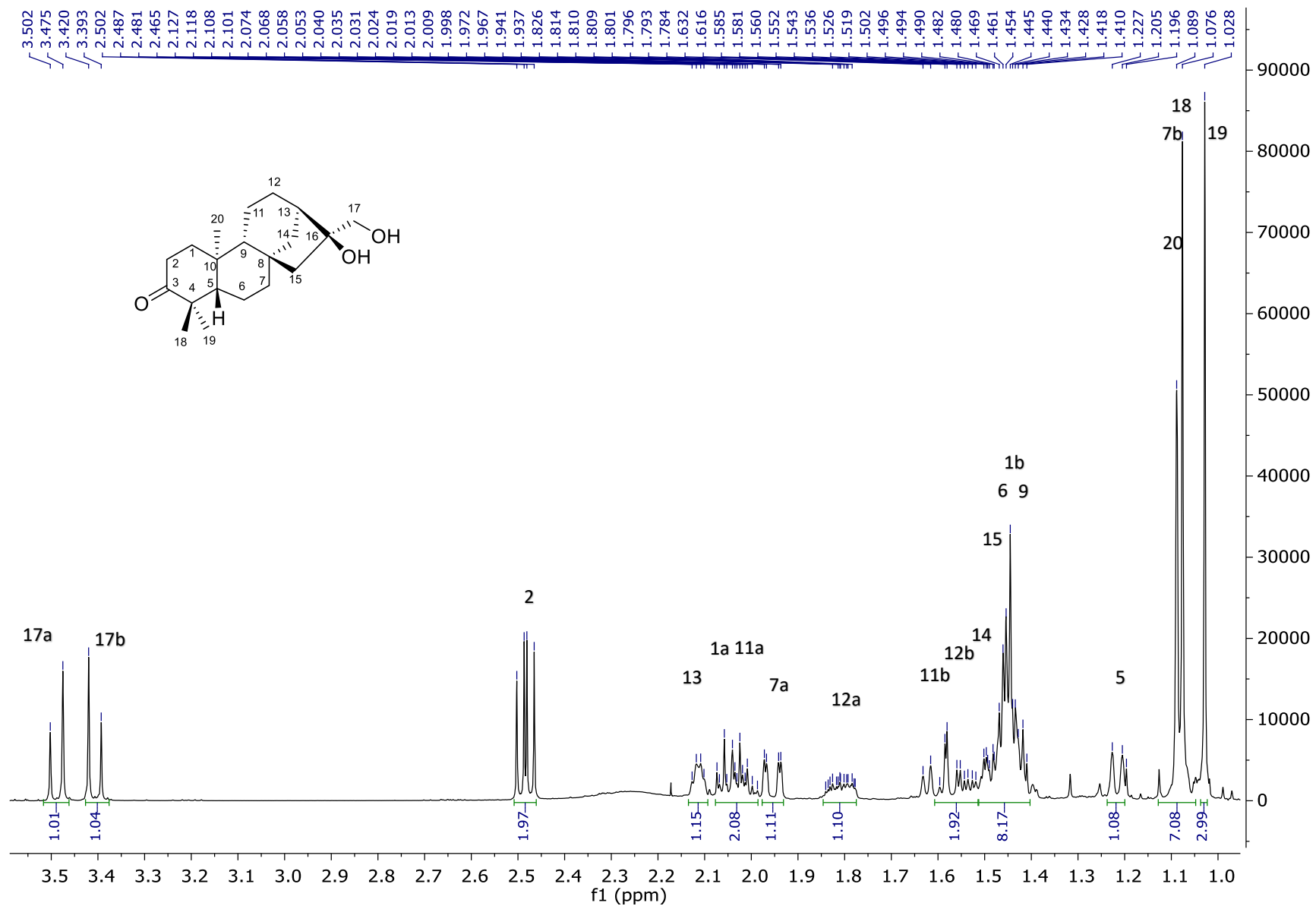
Espectro 34. RMN ^{13}C (CDCl₃, 100 MHz) de 3-oxo-21 α H-hop-22(29)-eno (**25**, moretenona)



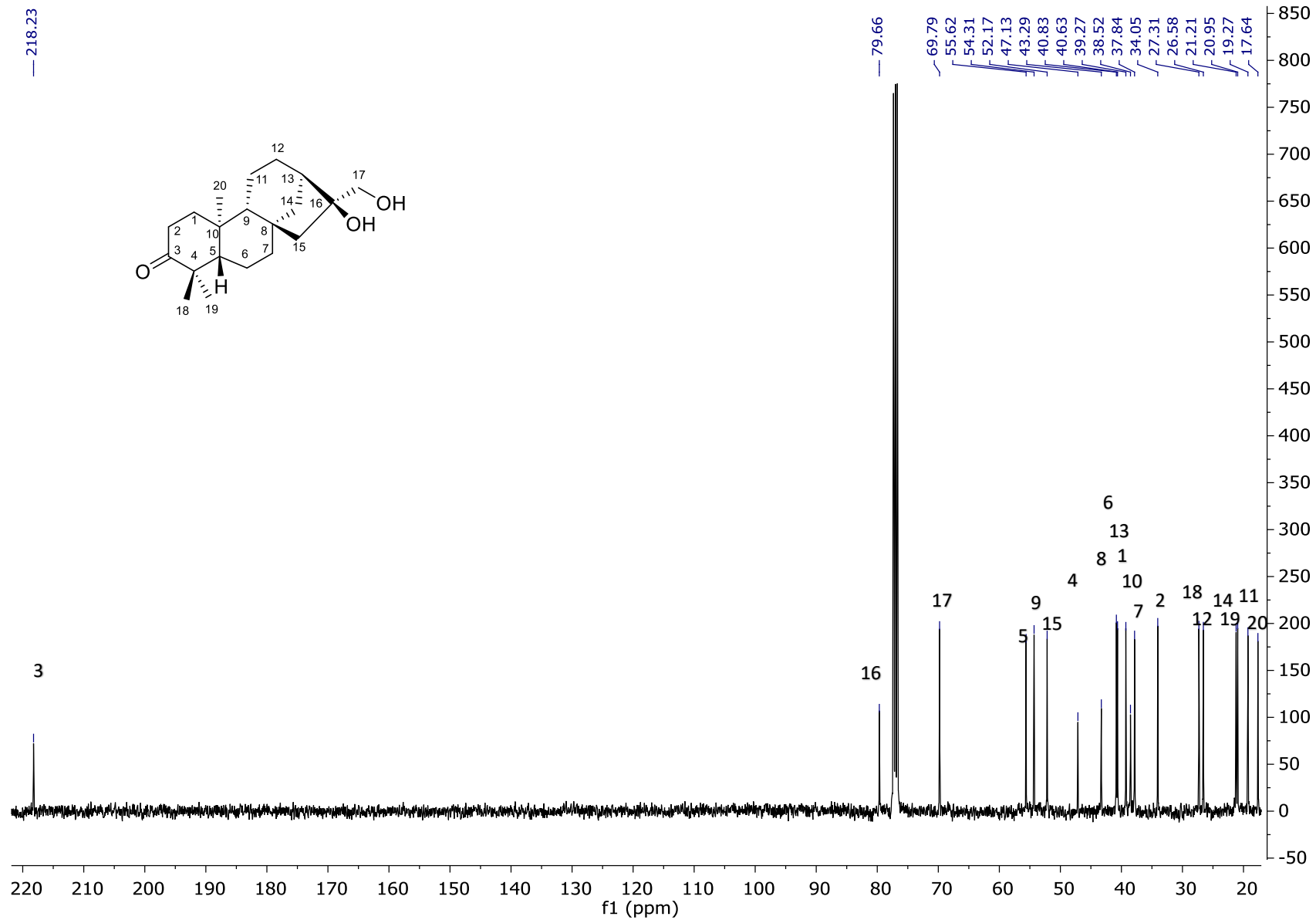
Espectro 35. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de ácido acetilauritico (**62**)



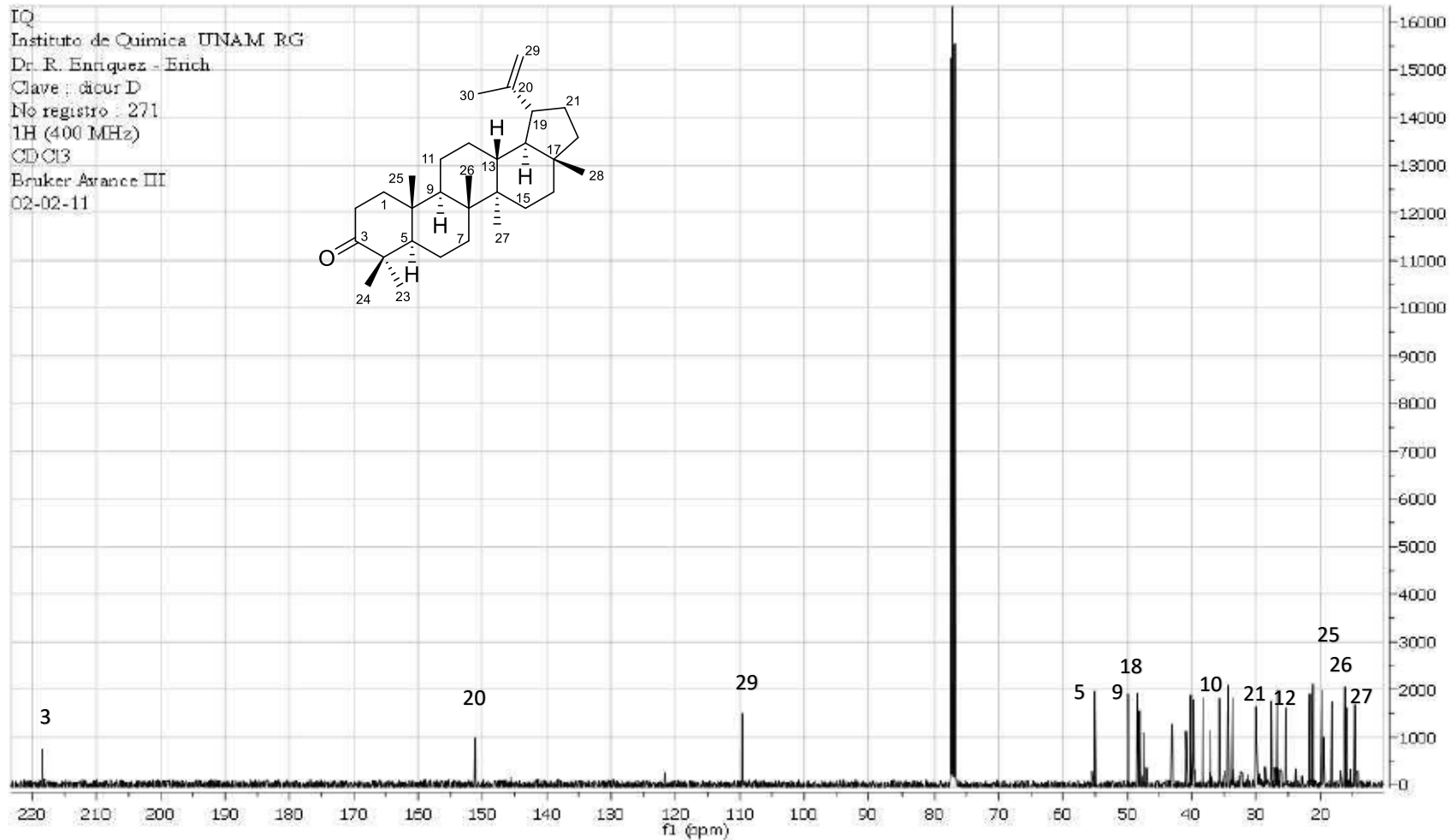
Espectro 36. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) de ácido acetilauritico (**62**)



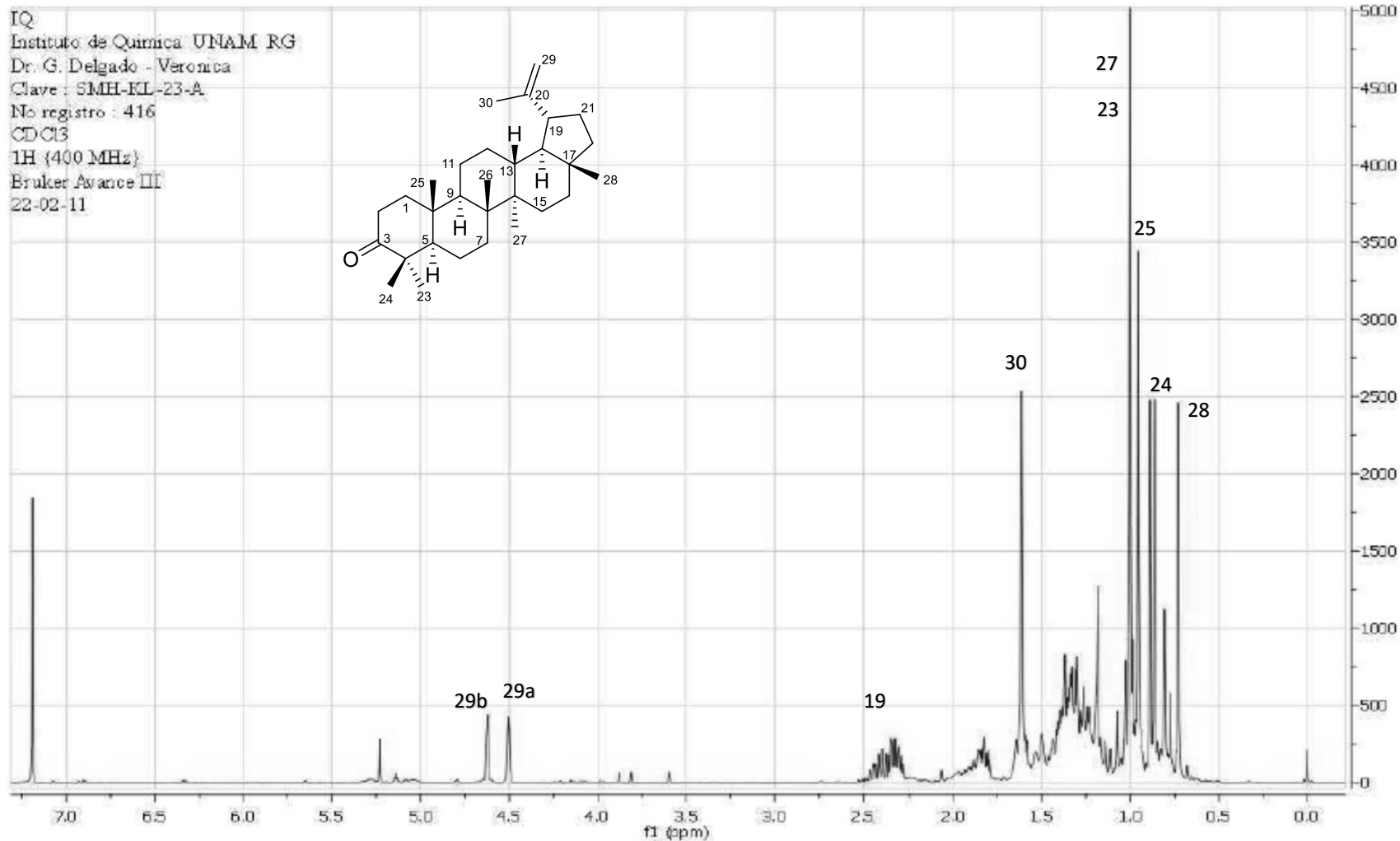
Espectro 37. RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) de 16β,17-dihidroxi-*ent*-kauran-3-ona (**99**)



Espectro 38. RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) de 16β,17-dihidroxi-*ent*-kauran-3-ona (**99**)



Espectro 39. RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) de lupenona (**100**)



Espectro 40. RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) de lupenona (**100**)

909_ICH

Instituto de Química UNAM ICH

Dr. G. Delgado/Verónica R

Clave: SMA-7-33-5(tac)

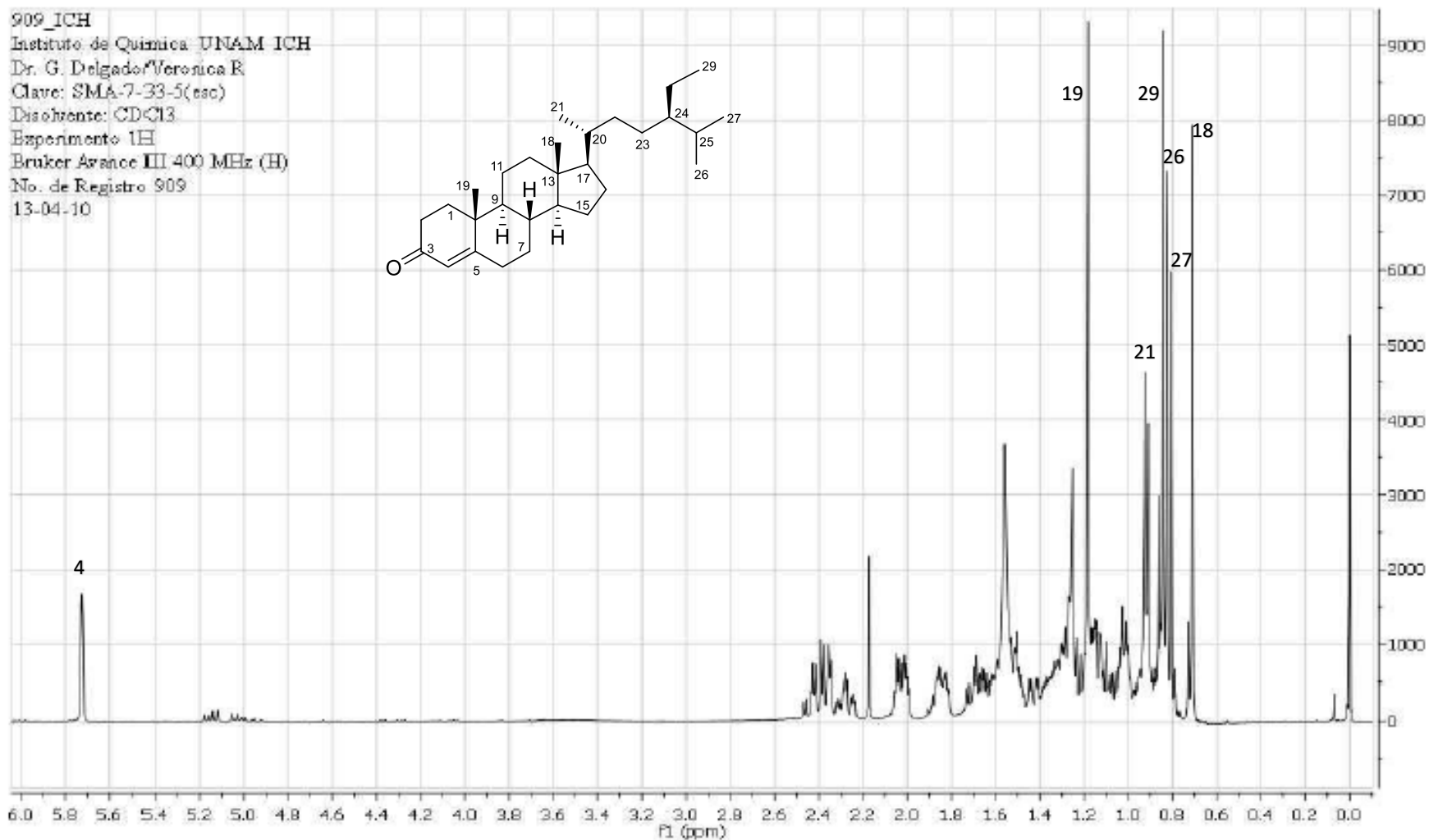
Disolvente: CDCl₃

Experimento 1H

Bruker Avance III 400 MHz (H)

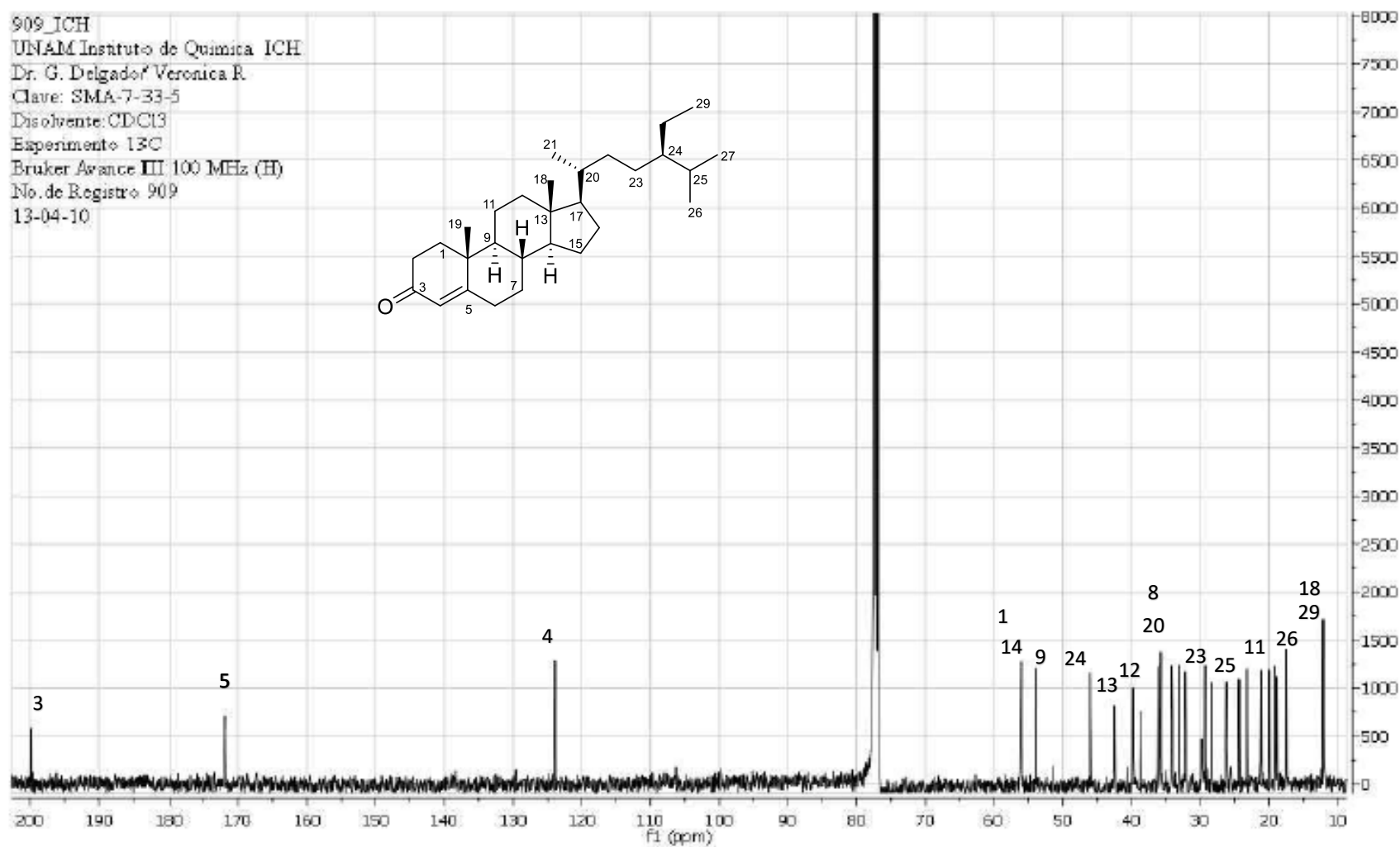
No. de Registro 909

13-04-10

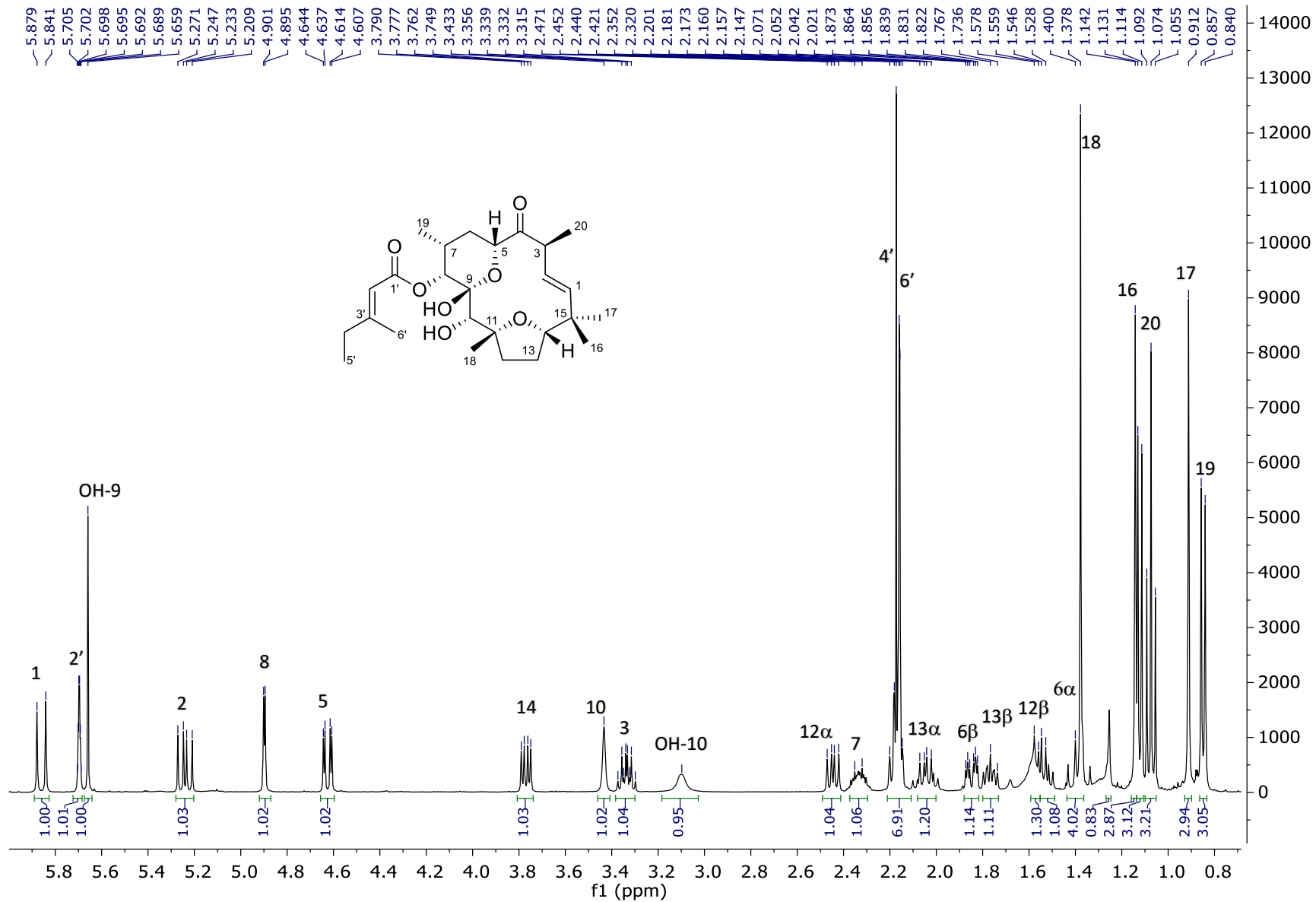


Espectro 41. RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) de sitostenona (101)

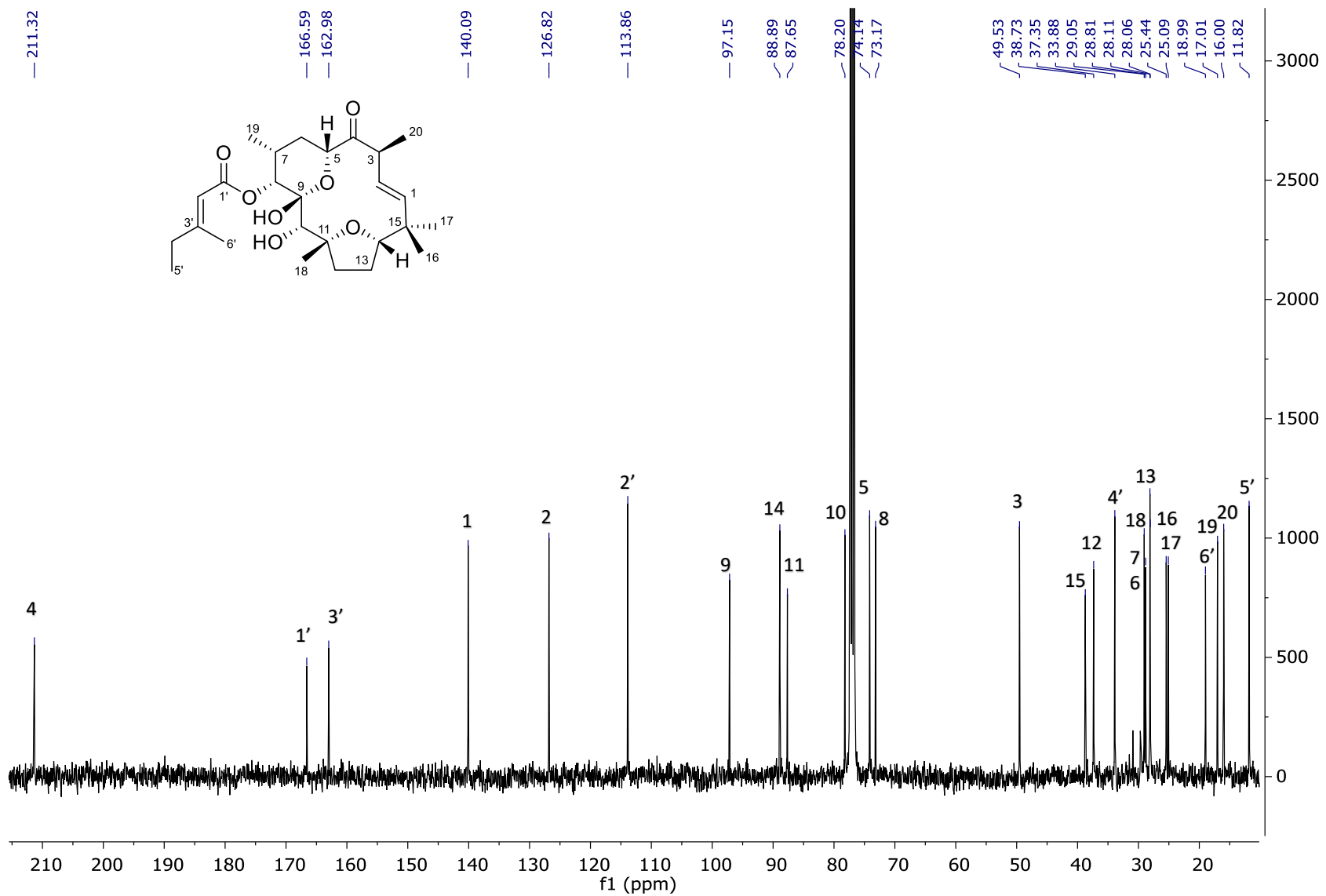
909_ICH
UNAM Instituto de Química ICH
Dr. G. Delgado/Verónica R.
Clave: SMA-7-33-5
Disolvente: CDCl₃
Experimento: 13C
Bruker Avance III 100 MHz (H)
No. de Registro: 909
13-04-10



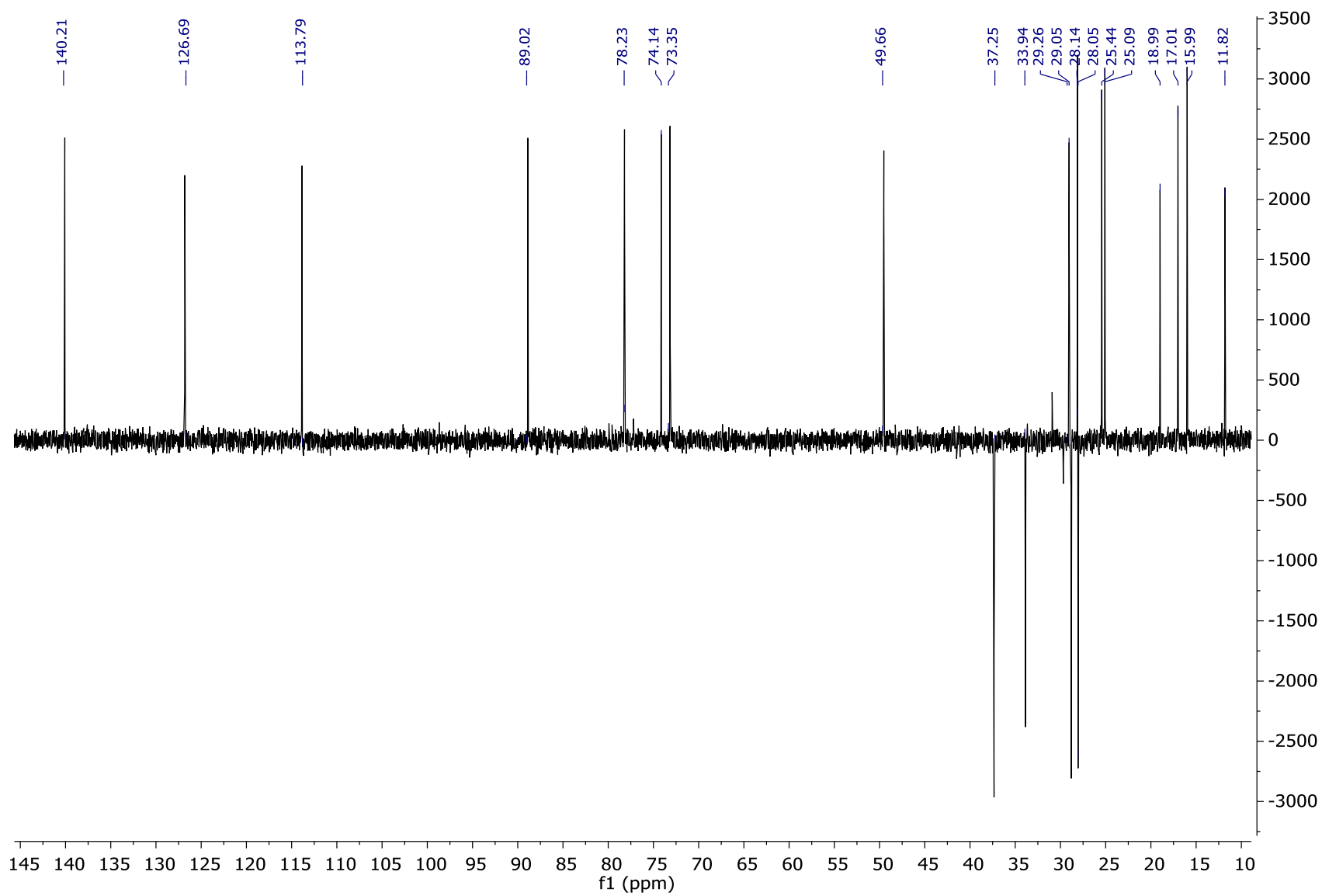
Espectro 42. RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) of sitostenona (**101**)



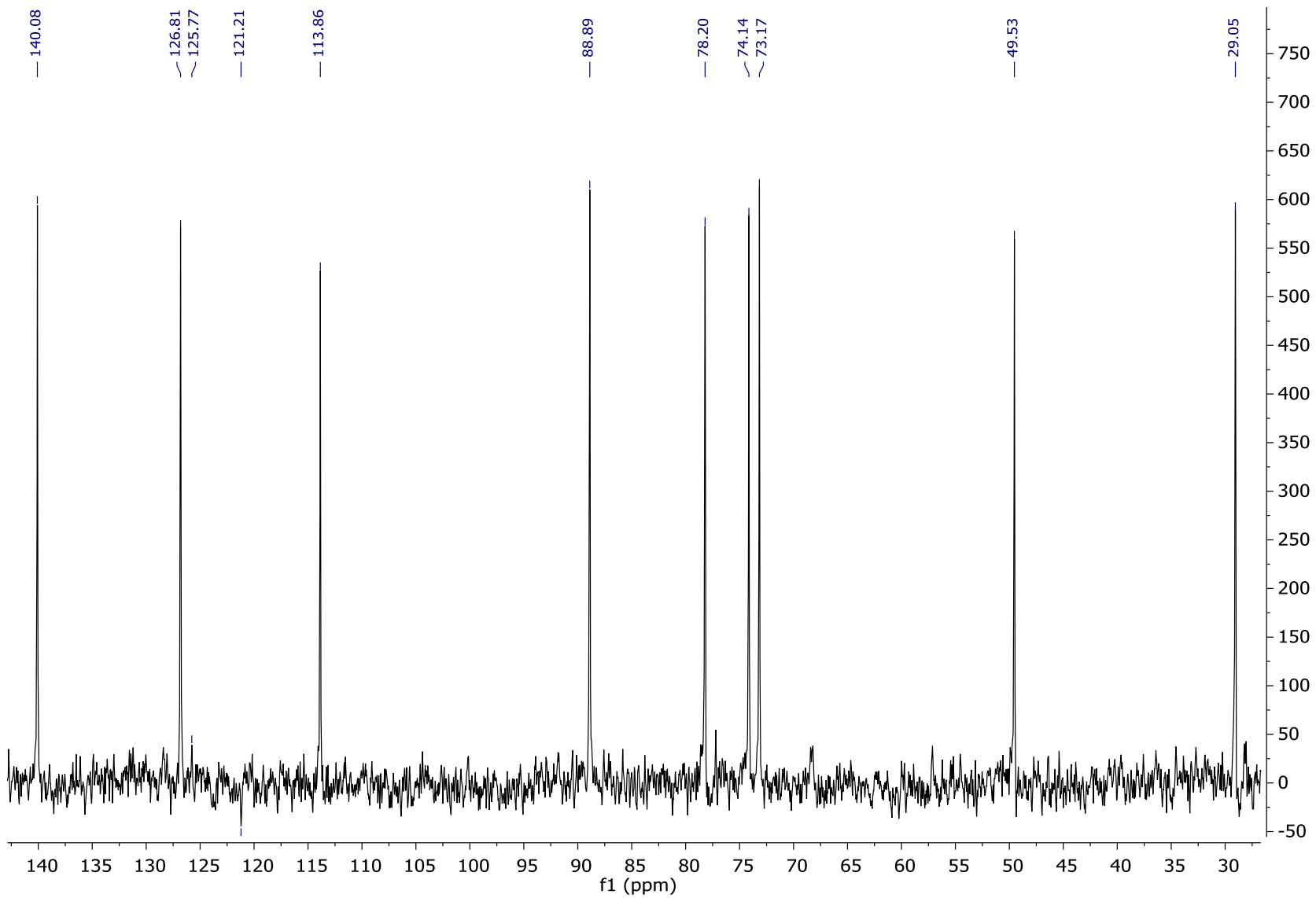
Espectro 43. RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) de tonantzitolona (**38**)



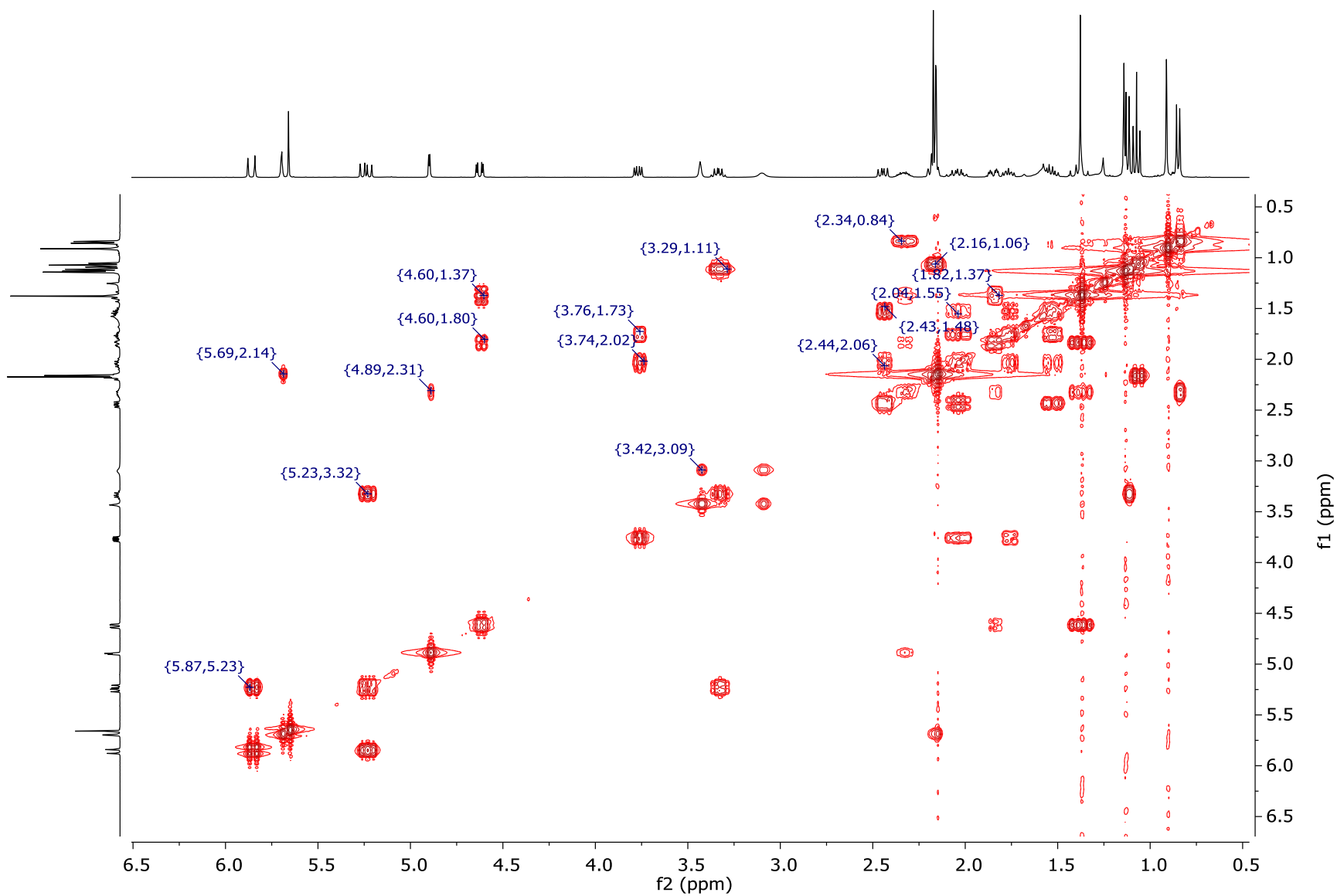
Espectro 44. RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) de tonantzitolona (**38**)



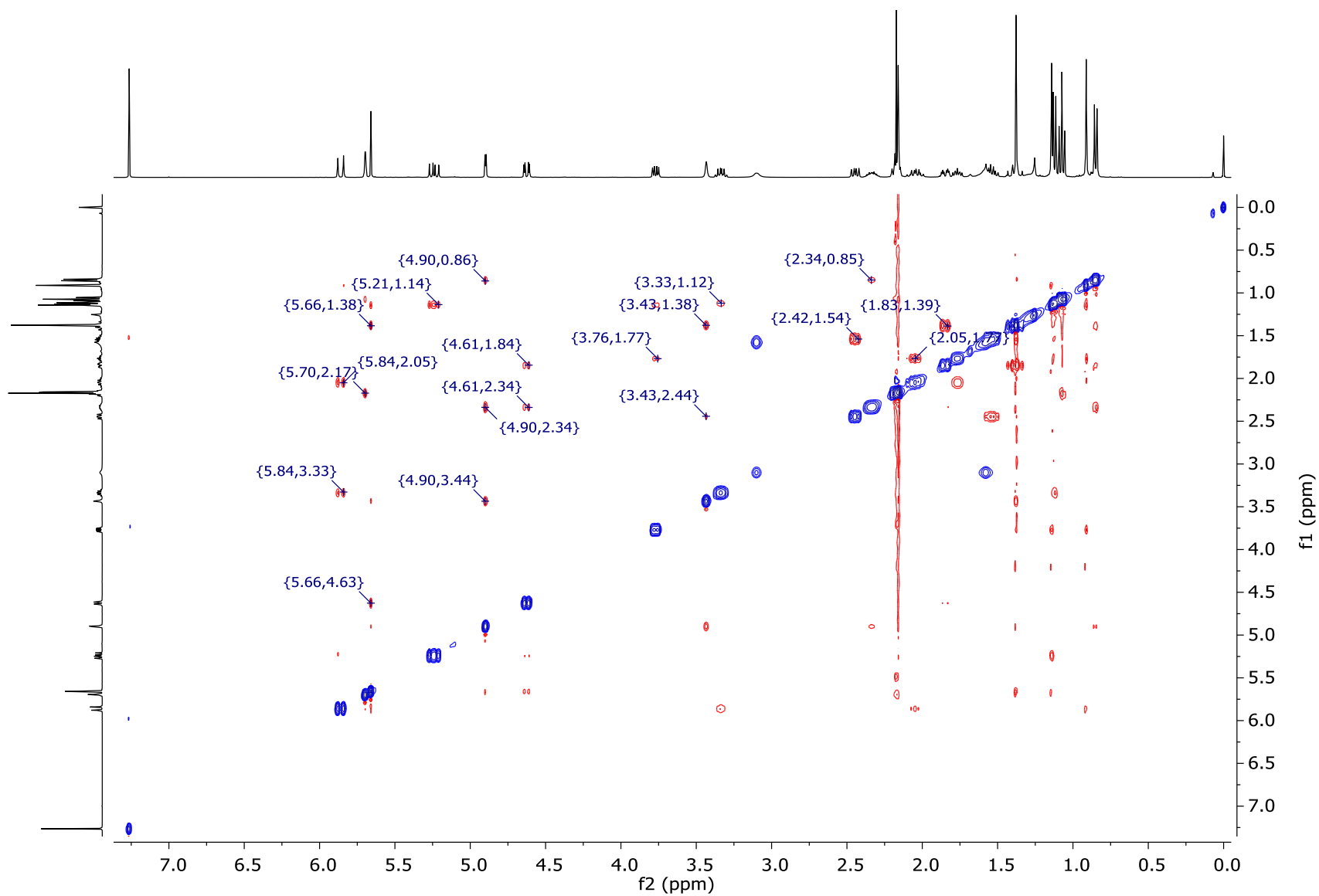
Spectro 45. DEPT-135 (CDCl₃, 100 MHz) de tonantzitlolona (**38**)



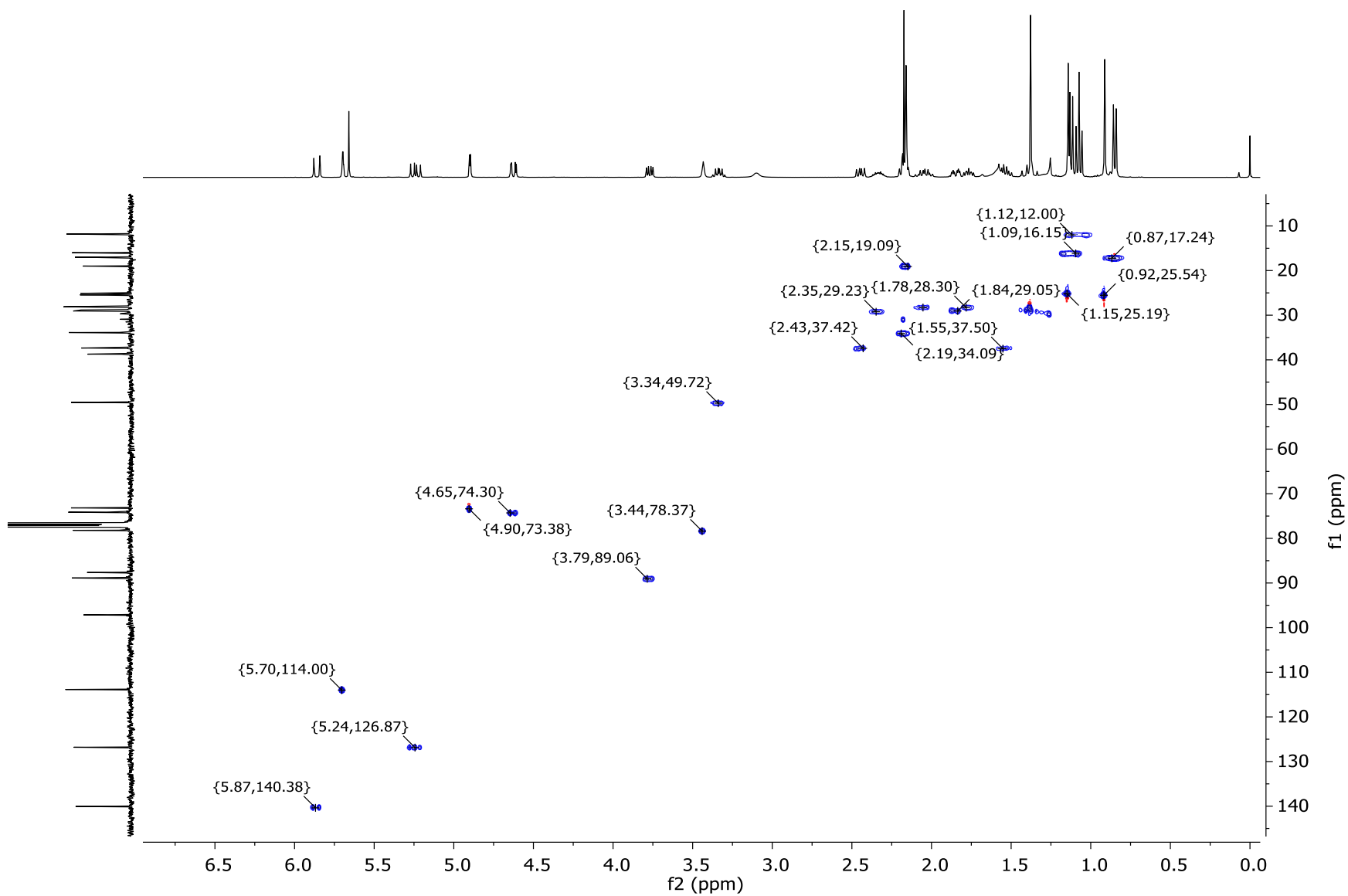
Espectro 46. DEPT-90 (CDCl₃, 100 MHz) de tonantzitlolona (**38**)



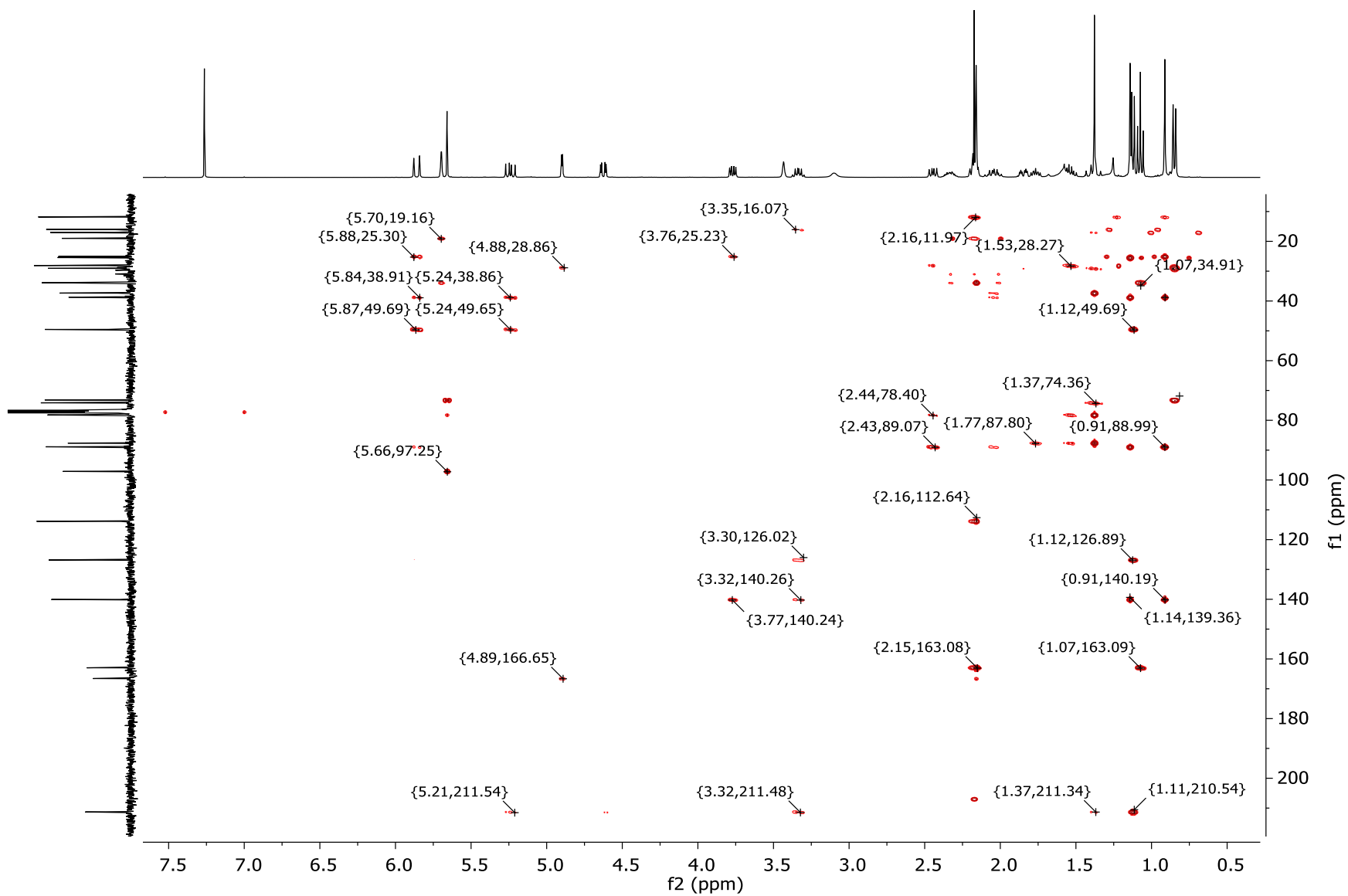
Espectro 47. COSY (CDCl₃, 400 MHz) de tonantzitlolona (**38**)



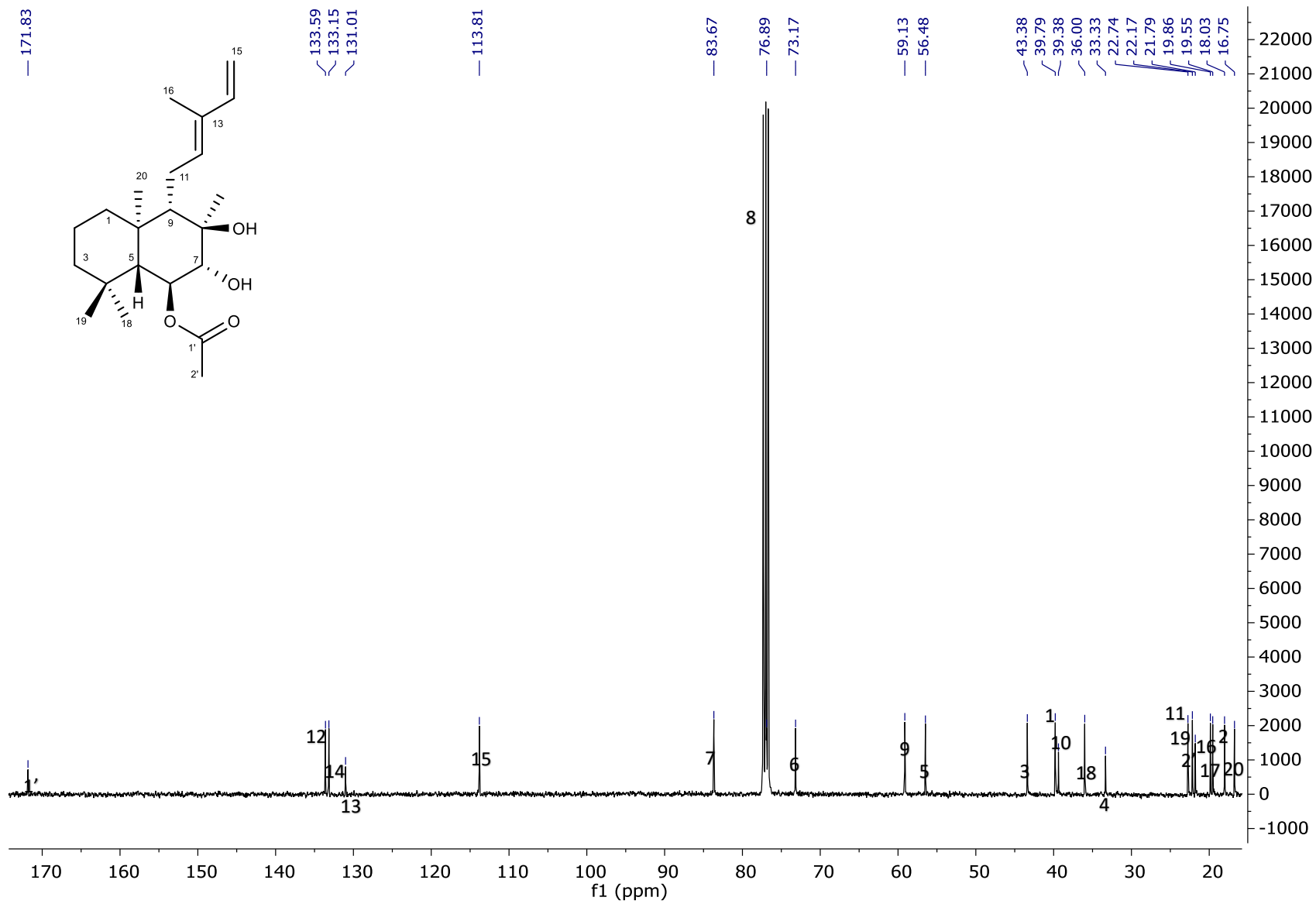
Espectro 48. NOESY (CDCl₃, 400 MHz) de tonantzitlolona (**38**)



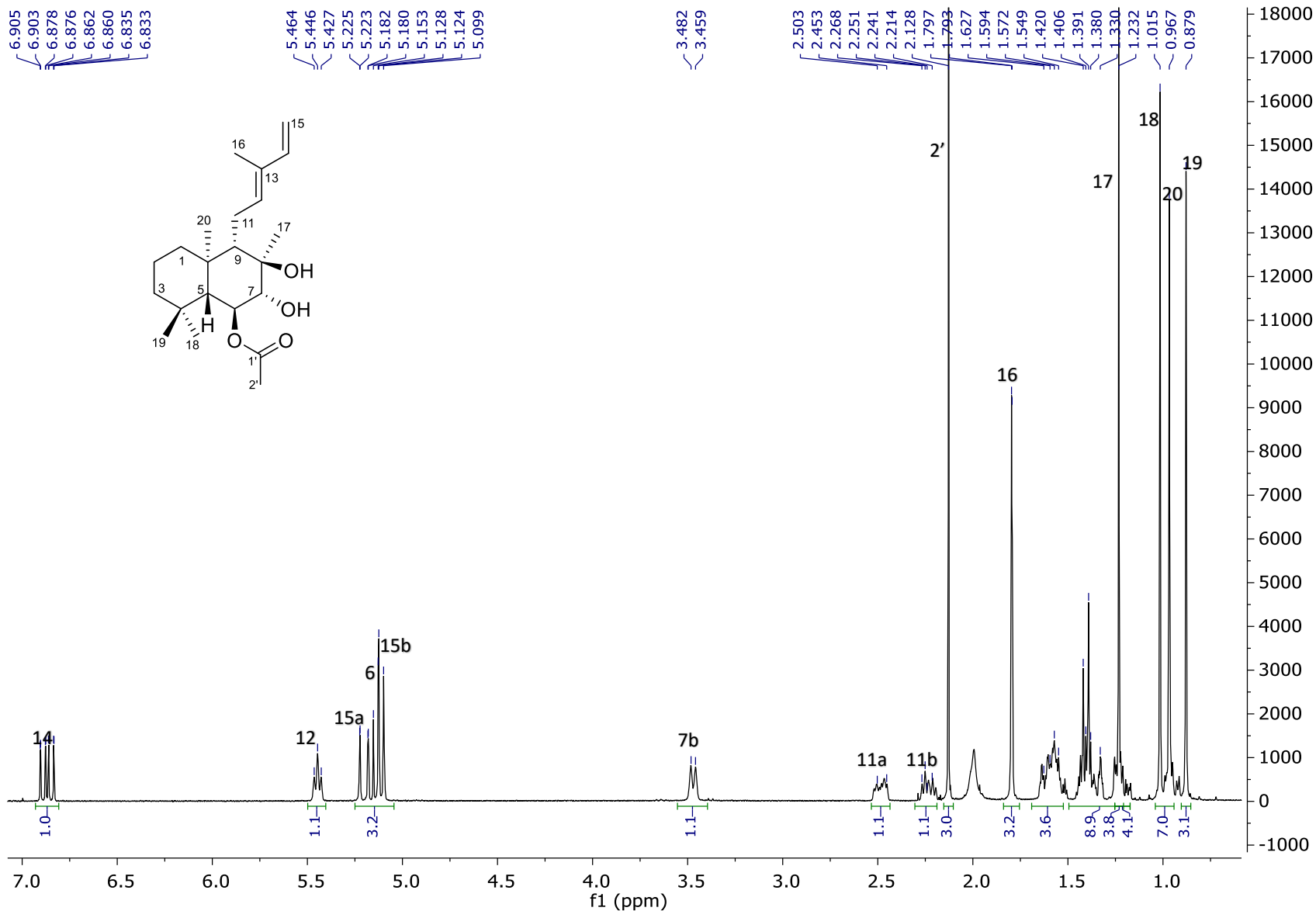
Spectro 49. HSQC (CDCl_3 , 100 MHz) de tonantzitlolona (**38**)



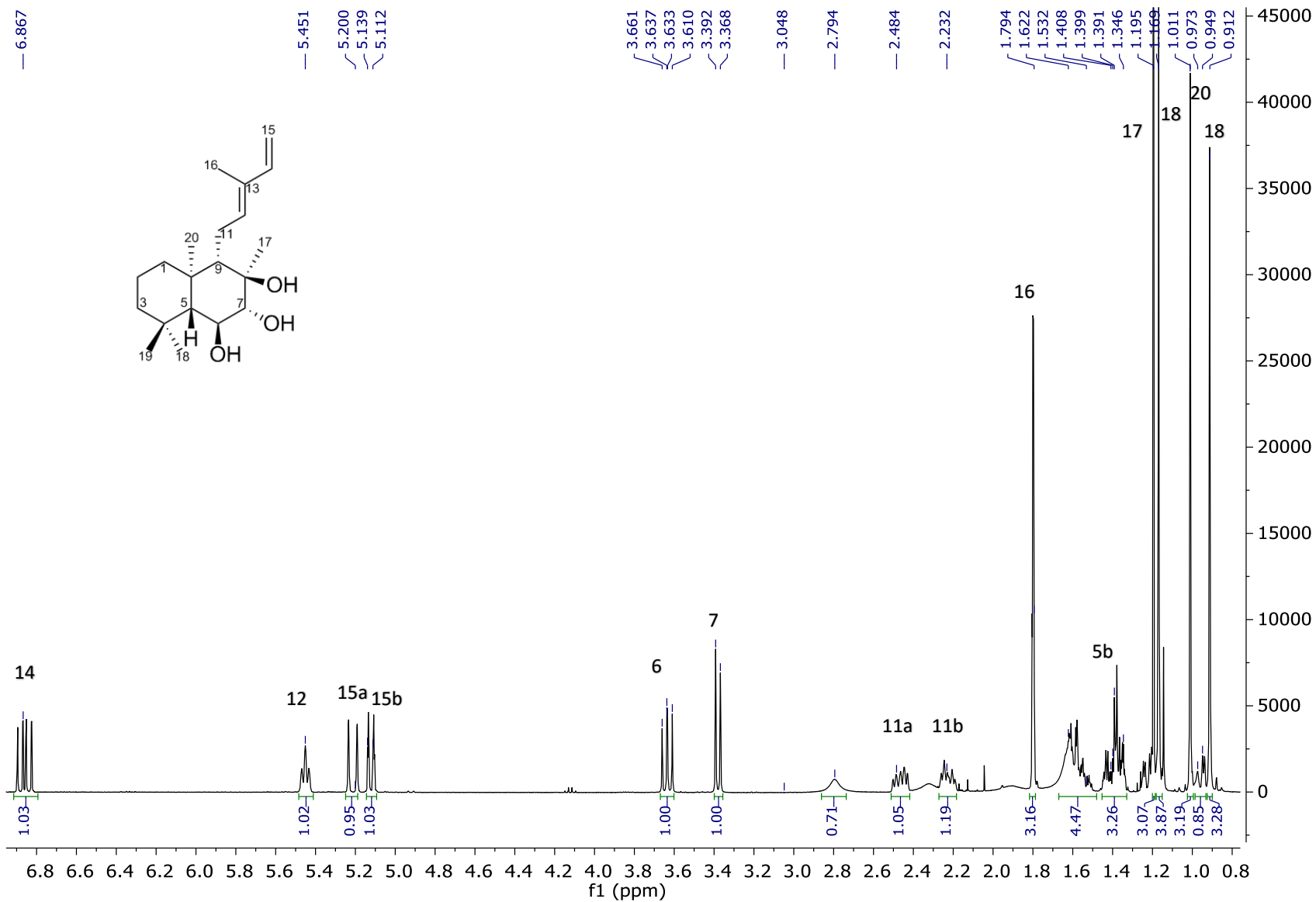
Espectro 50. HMBC (CDCl₃, 100 MHz) de tonantzitlolona (**38**)



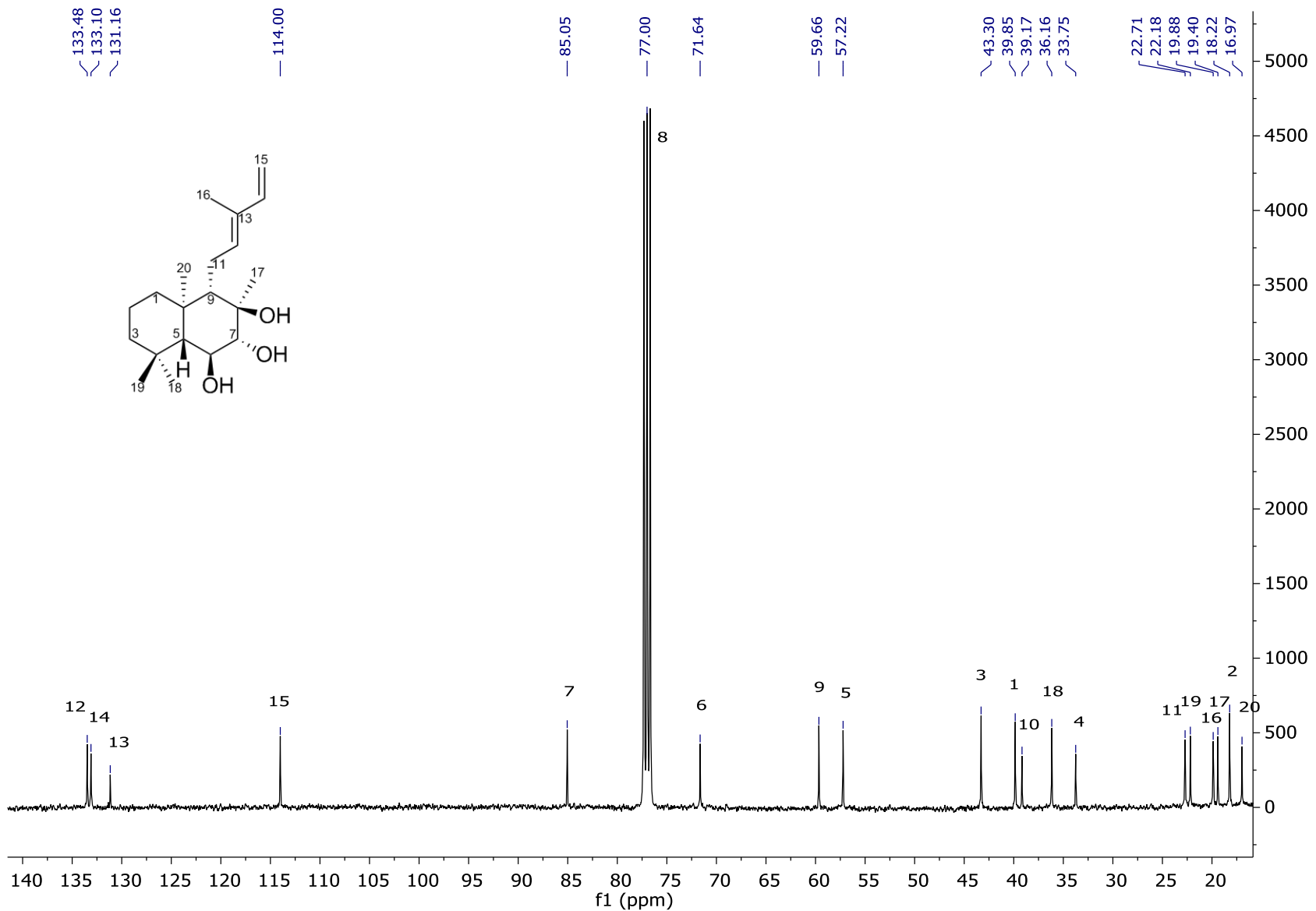
Espectro 51. RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) de 6-O-acetylaustroinulina (**69**)



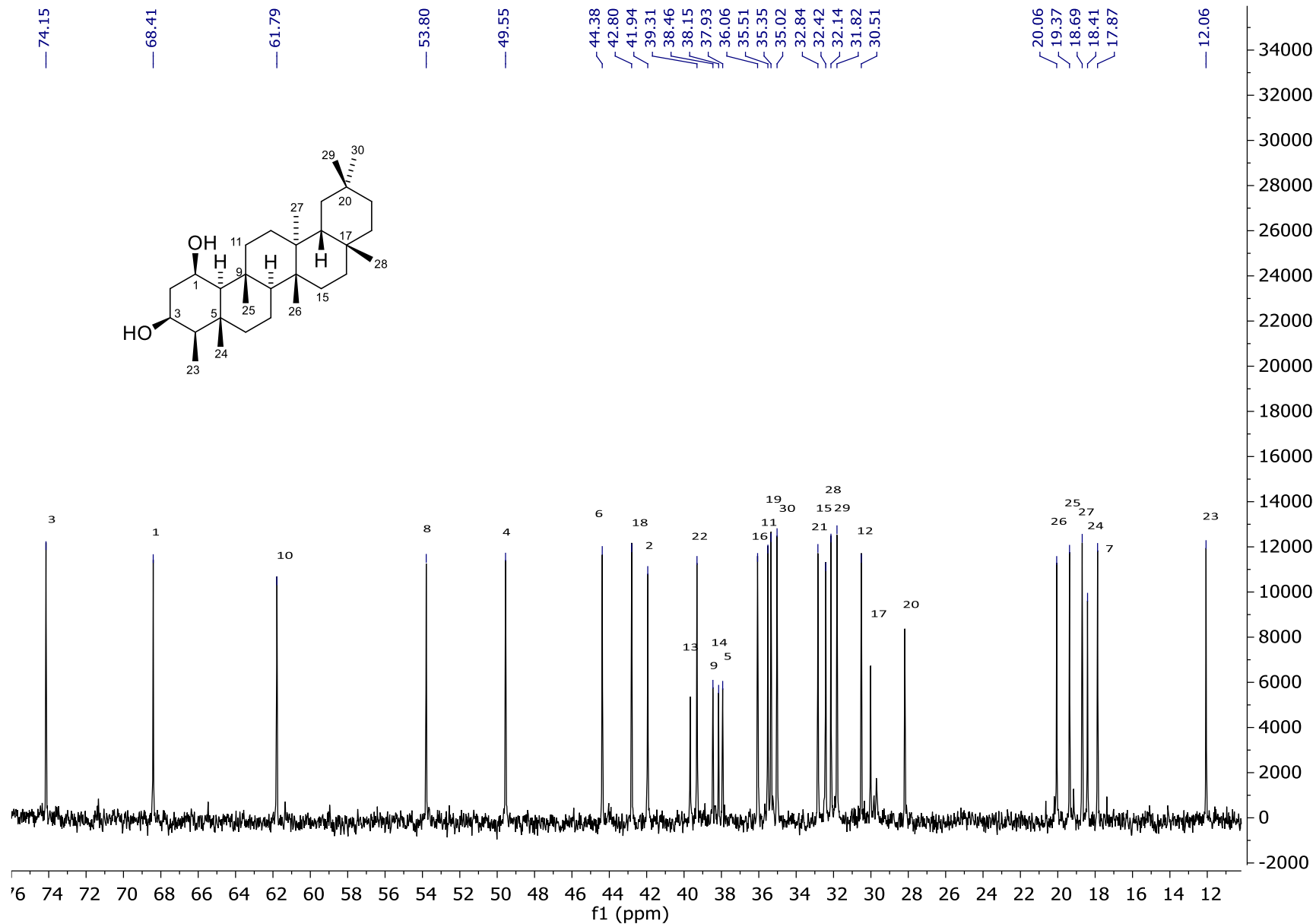
Espectro 52. RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) de 6-O-acetilaustroinulina (**69**)



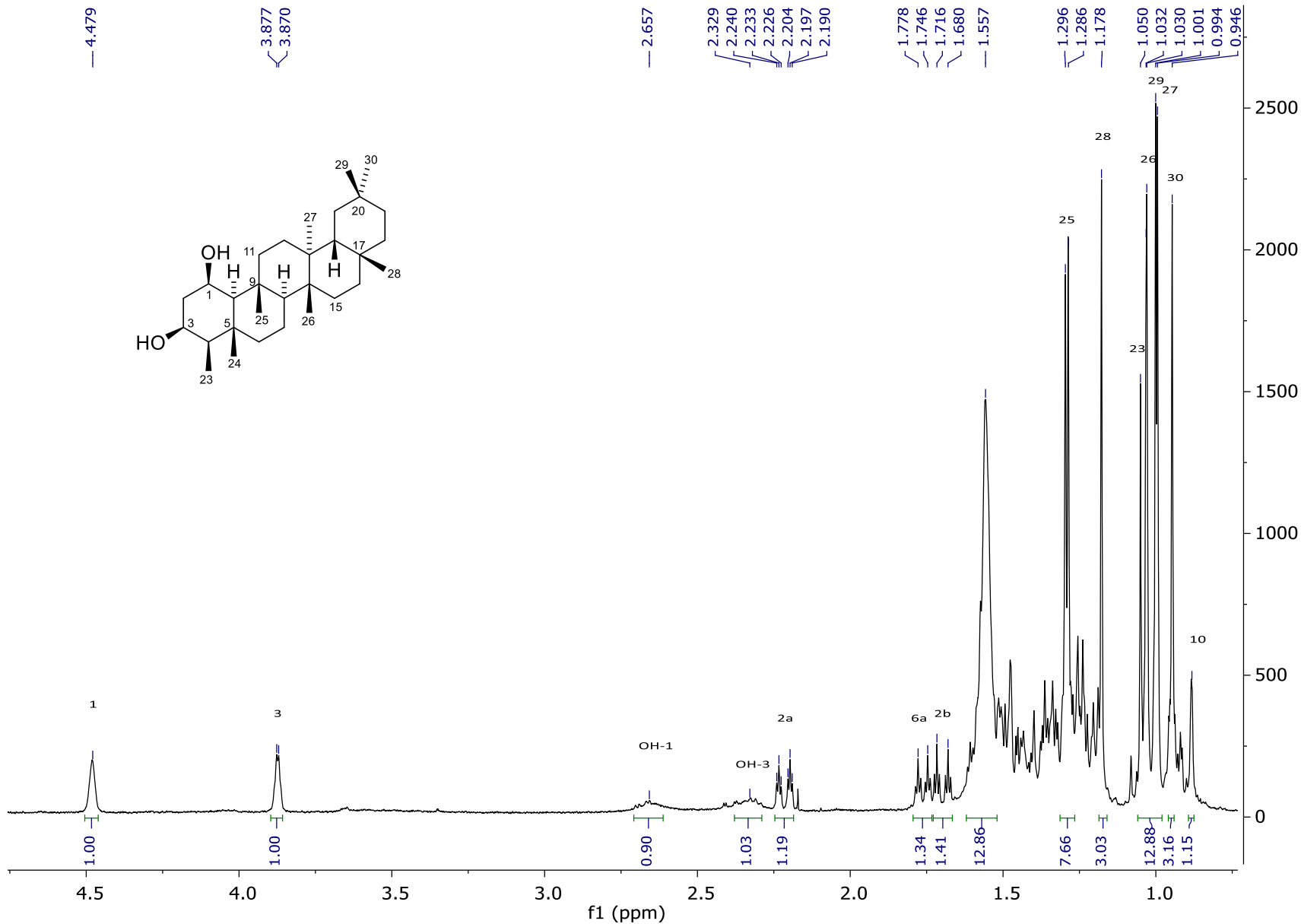
Espectro 53. RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) de austroinulina (**70**)



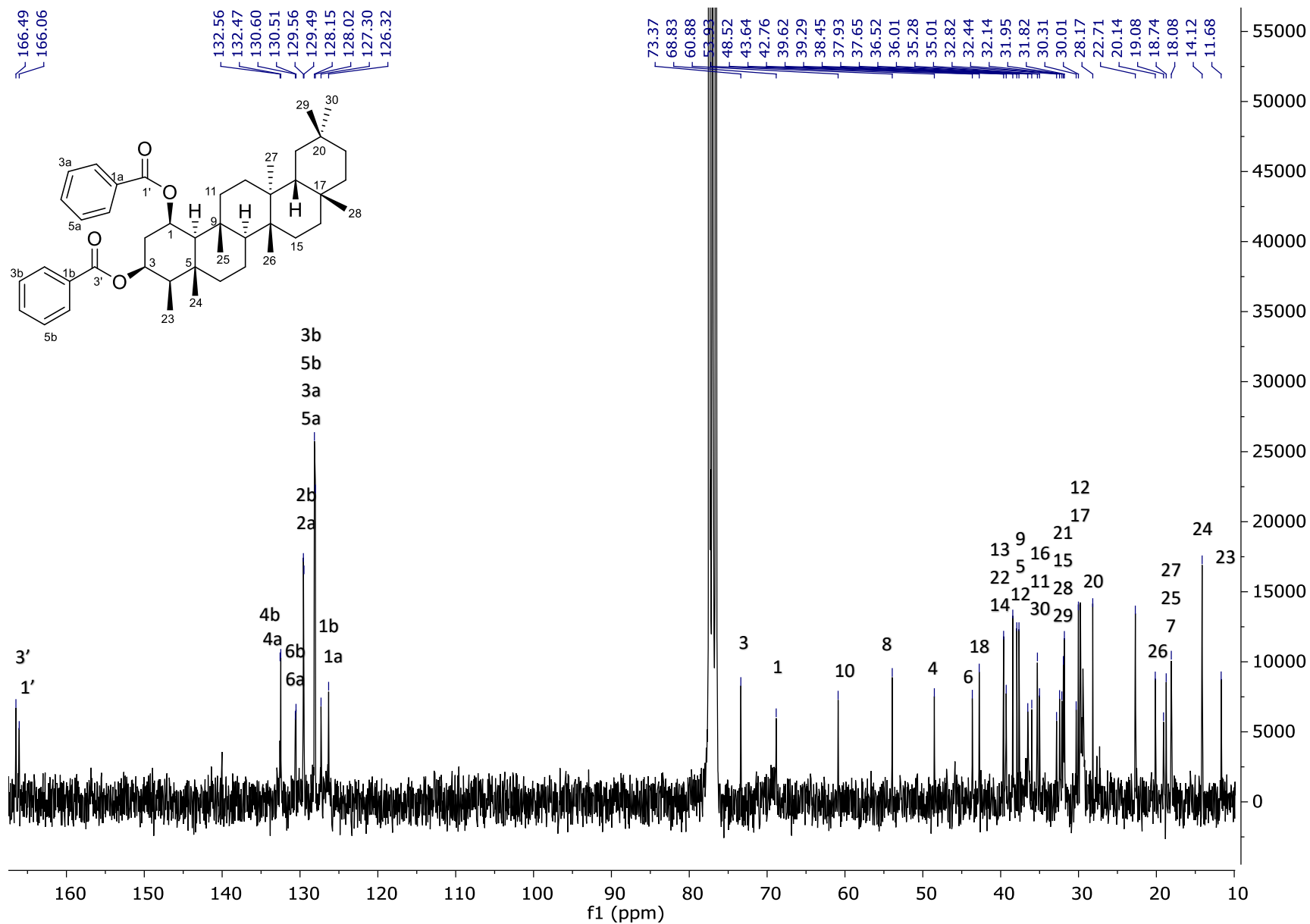
Espectro 54. RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) de austroinulina (**70**)



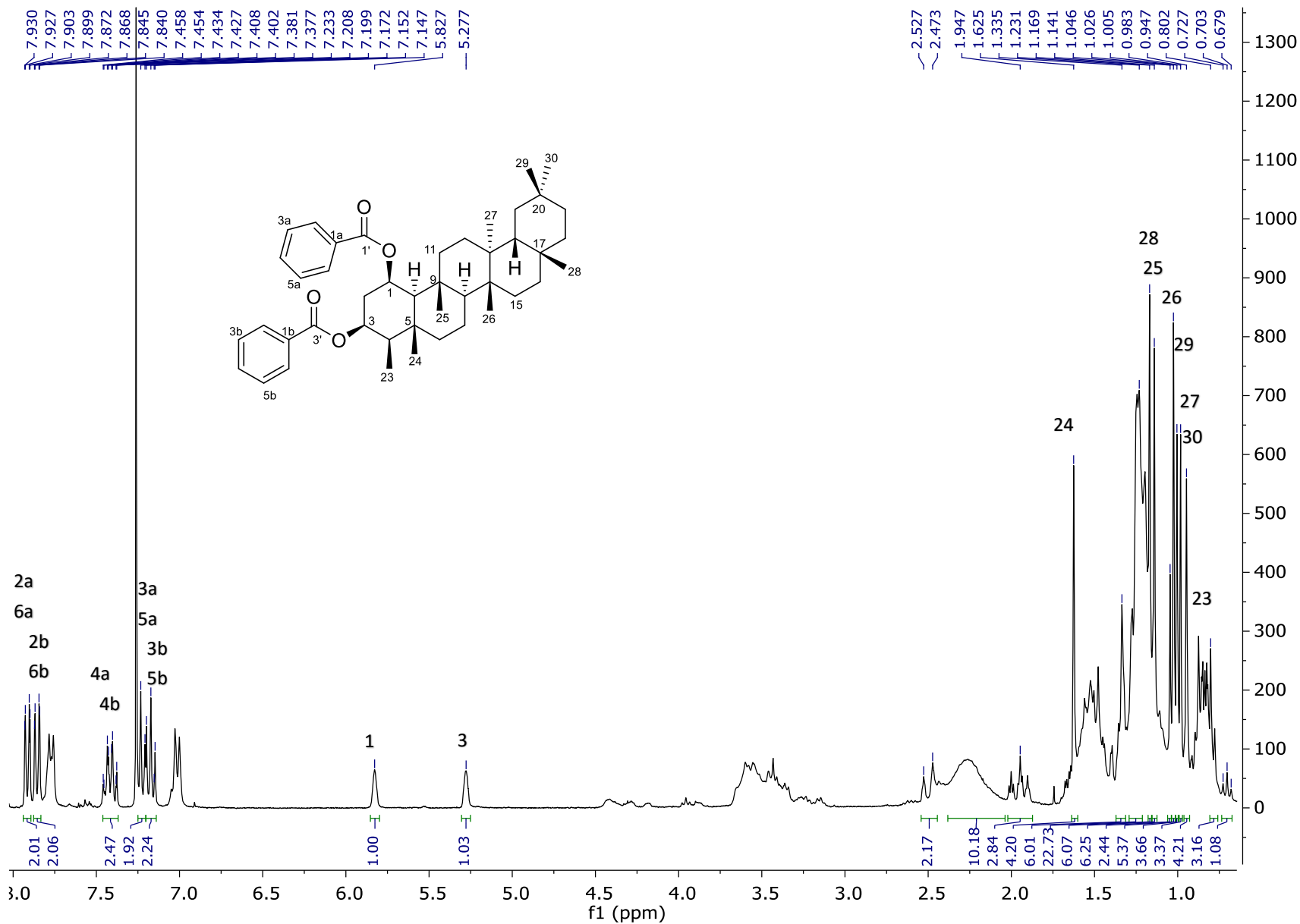
Espectro 55. RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) de 1β,3β-dihydroxifriedelano (82)



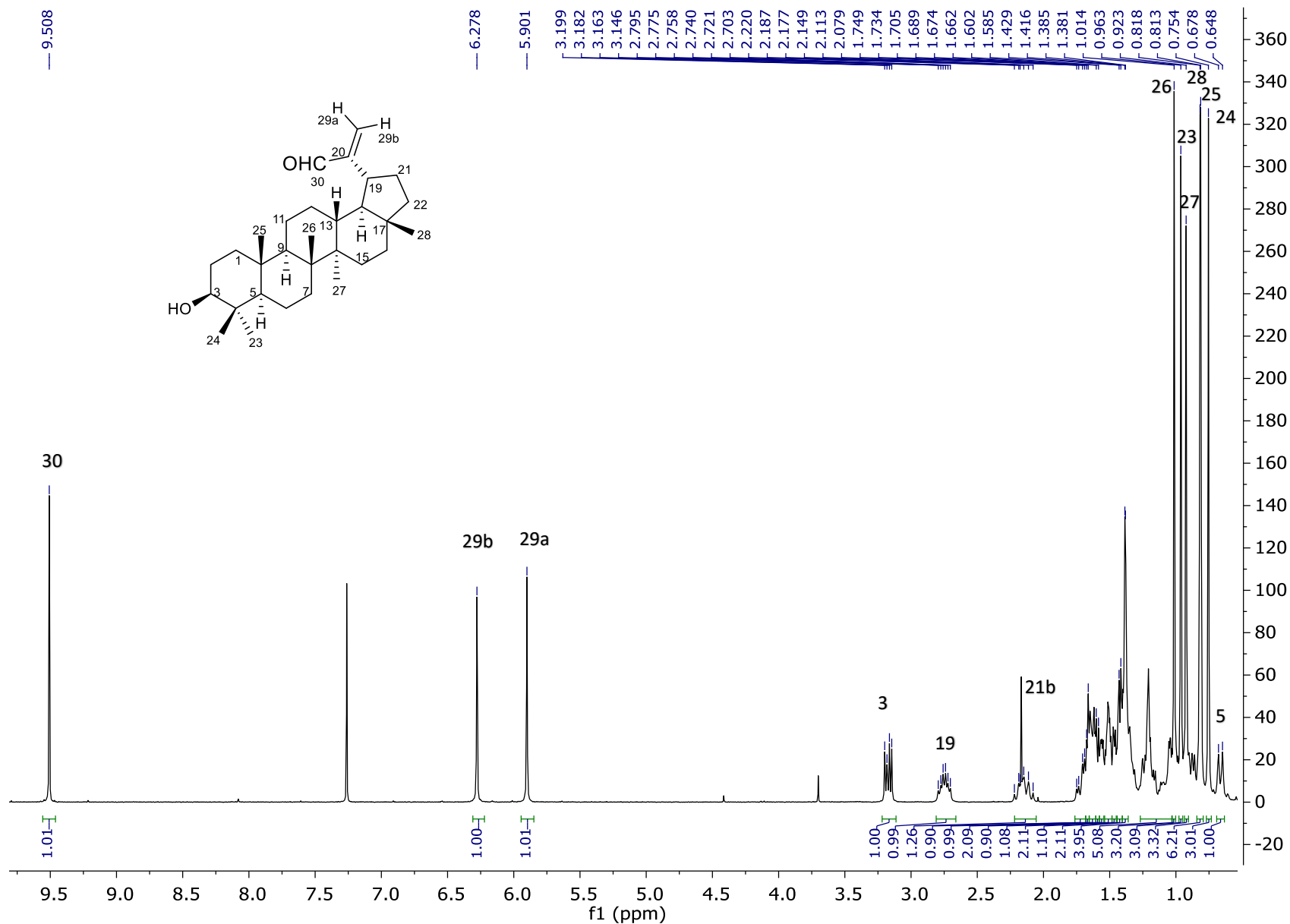
Espectro 56. RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) de 1β,3β-dihydrofriedelano (**82**)



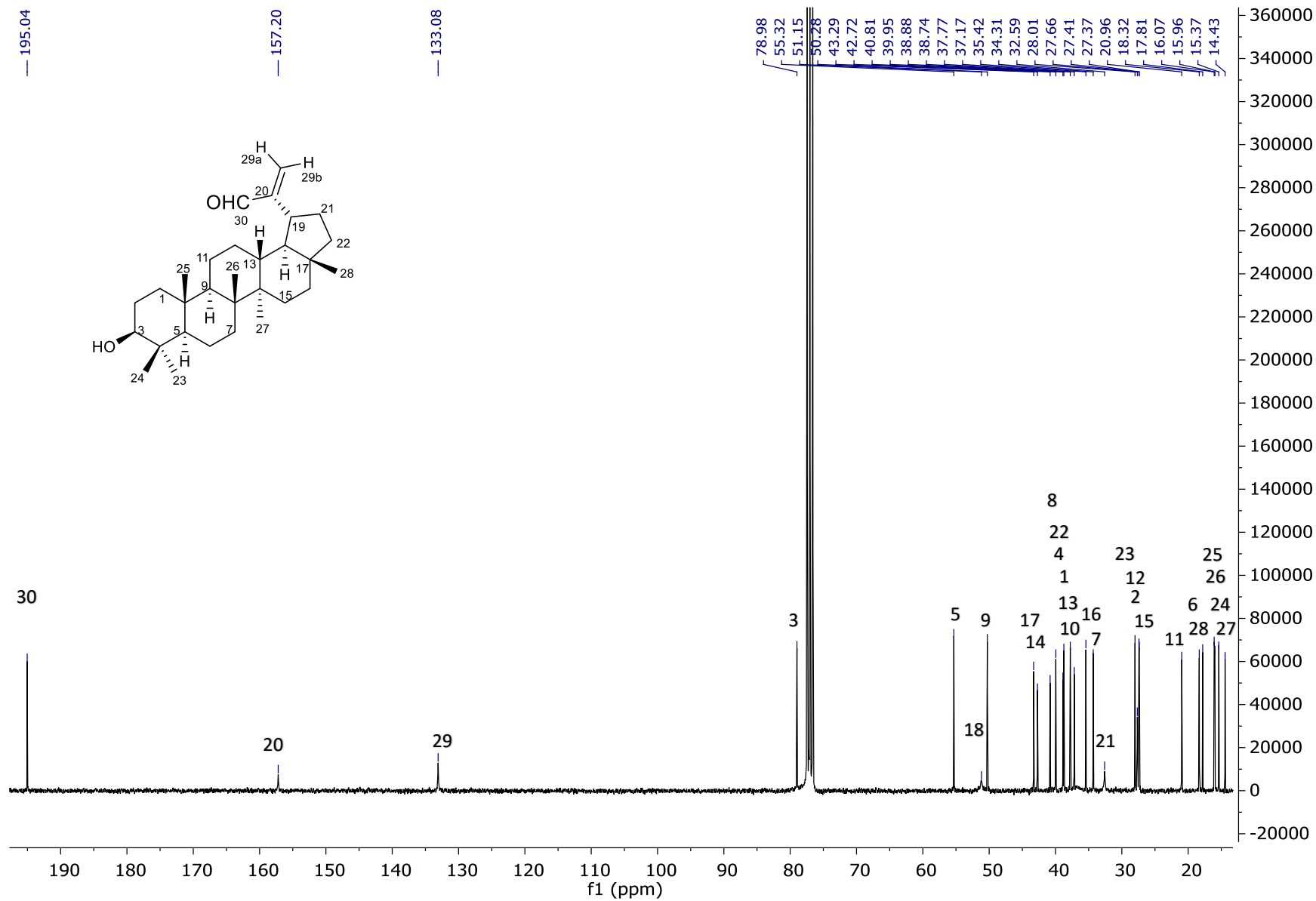
Espectro 57. RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) de 1β,3β-dibenzoiloxifriedelano (**102**)



Espectro 58. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de 1 β ,3 β -dibenzoiloxifriedelano (**102**)



Espectro 59. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) de alh ido derivado de 19βH-lupeol (103)



Espectro 60. RMN ^{13}C (CDCl₃, 75 MHz) de alh ido derivado de 19βH-lupeol (103)



January 9, 2017.

Ms. Ref. No.: JMCS16153

Title: "Tonantzitlolone A and other cytotoxic constituents of *Sapium macrocarpum* (Euphorbiaceae)."

Author(s): Fernando Novillo, Verónica Rosero, María Isabel Chávez, Simón Hernández-Ortega, Esteban M. Martínez and Guillermo Delgado*.

Subject: Editorial Decision, Accepted for publication.

Journal of the Mexican Chemical Society

Prof. Guillermo Delgado
Institute of Chemistry
Universidad Nacional Autónoma de México
Mexico City
delgado@unam.mx

Dear Prof. Delgado,

I am pleased to inform that the manuscript JMCS16153, by Fernando Novillo, Verónica Rosero, María Isabel Chávez, Simón Hernández-Ortega, Esteban M. Martínez and Guillermo Delgado*, has been accepted to be published in the *Journal of the Mexican Chemical Society*. The editorial process of your Manuscript has not finished, the next step is the galley proofs of your Manuscript before its publication for which we will contact you soon.

Thank you for considering the *Journal of the Mexican Chemical Society* as the publishing medium for your scientific contribution.

The *Journal of the Mexican Chemical Society* looks forward to receive more interesting manuscripts from you and your colleagues.

Sincerely yours,

Dr. Ignacio González Martínez
Editor-in-Chief
Journal of the Mexican Chemical Society

Tonantzitlolone A and other cytotoxic constituents of *Sapium macrocarpum* (Euphorbiaceae)

Fernando Novillo,^{1,2} Verónica Rosero,^{1,2} María Isabel Chávez,¹ Simón Hernández-Ortega,¹ Esteban M. Martínez,³ Guillermo Delgado*¹

¹ Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito Exterior, Ciudad Universitaria. Coyoacán 04510. Ciudad de México, México. delgado@unam.mx ; tel.: +5255-5622-4446

² Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Central del Ecuador. Francisco Viteri s/n y Gato Sobral. Quito-Ecuador.

³ Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria. Coyoacán 04510. Ciudad de México, México.

Abstract: *Sapium macrocarpum* (Euphorbiaceae) is a tropical tree located mainly in the southern part of Mexico and in Central America, and it is used in the Mayan traditional medicine for the treatment of several skin diseases. The dichloromethane-MeOH extract of the aerial parts displayed cytotoxic activity against certain cancer cell lines. Lupeol (**1**), lupenone (**2**), sitostenone (**3**), β -sitosterol (**4**), stigmasterol (**5**), sitosteryl β -D-glucopyranoside (**6**) and the rare diterpene tonantzitlolone A (**7**) were characterized from this extract. The structural analysis allowed the ¹H NMR reassignments for H-12 α and H-12 β , and for H-13 α and H-13 β of tonantzitlolone A (**7**). The cytotoxic activity of compounds **1-3**, **6** and **7** was evaluated against selected cancer cell lines. Compounds **3**, **6** and **7** displayed clear activity against K562 (leukemia). This is the first report on the chemical constituents of *S. macrocarpum*, and points out that this species is an additional source of tonantzitlolone A. Compound **7** has only been reported previously from species of the *Stillingia*, *Sebastiania* and *Sapium* genera, which belong to the Hippomaninae subtribe of the family Euphorbiaceae.

Keywords: sitostenone; diterpenes; flexibilane; Euphorbiaceae; NMR reassignments, cytotoxicity.

Resumen: *Sapium macrocarpum* (familia Euphorbiaceae) es un árbol localizado en la parte central de México y en Sudamérica, el cual es usado en la medicina tradicional Maya para el tratamiento de diversas enfermedades de la piel. El extracto de diclorometano-metanol de las partes aéreas de esta especie mostró actividad inhibitoria de la proliferación de ciertas células cancerosas humanas. Lupeol (**1**), lupenona (**2**), sitostenona (**3**), β -sitosterol (**4**), estigmasterol (**5**), β -D-glucopiranosido de sitosterilo (**6**) y el diterpeno relativamente raro tonantzitlolona A (**7**) fueron caracterizados de este extracto. El análisis estructural de la tonantzitlolona A (**7**) permitió la reasignación de las señales de RMN ¹H de H-12 α y H-12 β , y de H-13 α y H-13 β . La actividad citotóxica de los compuestos **1-3**, **6** y **7** fue evaluada frente a las líneas celulares cancerosas selectas. Los compuestos **3**, **6** y **7** mostraron actividad clara contra K562 (leucemia). Este es el primer reporte sobre los constituyentes químicos de *S. macrocarpum*, encontrando que esta especie constituye una fuente adicional de tonantzitlolona A. El compuesto **7** ha sido aislado de los géneros *Stillingia*, *Sebastiania* y *Sapium*, los cuales pertenecen a la subtribu Hippomaninae de la familia Euphorbiaceae.

Palabras clave: sitostenona; diterpenos; flexibilano; Euphorbiaceae; reasignaciones de RMN, citotoxicidad.

Introduction

Sapium is a cosmopolitan genus of the Euphorbiaceae plant family which includes 23 accepted names of species, consolidated from 254 former names of synonyms. Several species of this genus have been used in traditional medicine in several parts of the world for treating wounds, snake bites, and skin-related diseases, among other ailments [1,2]. From *Sapium* species collected in Asia, phenolic compounds were identified as constituents of *S. insigne* [3,4], *S. sebiferum* [5,6]; phorbol esters were identified as secondary metabolites of *S. indicum* [7,8] and *S. insigne* [3,9]; and the alkaloid bukittinggine and triterpenes were identified as constituents of *S. baccatum* [10-12]. Among species collected in the American continent, terpenoids have been isolated from *S. rigidifolium* [13] and *S. haemospermum* [14], and coumarins from *S. sebiferum* [15].

S. macrocarpum is a tree native mainly to the southern part of Mexico and Central America. It is used in Mayan traditional medicine to cure skin infections, and particularly, for treating warts [16]. It has not been chemically analyzed previously, but some phytotoxic compounds have been isolated from an endophytic fungus of this species [17]. Here we report the chemical constituents isolated from an extract of the aerial parts of *S. macrocarpum*, which displayed cytotoxicity in selected tumor cell lines. We identified tonantzitlolone A (**7**), an uncommon diterpene with a flexibilane skeleton, together with a series of known compounds, and determined their cytotoxicities.

Results and Discussion

The ^{13}C NMR spectrum of compound **1** showed 30 signals which were defined by DEPT experiments. The results showed seven methyl groups, eleven methylenes (one vinylic methylene), six methines (one oxymethine), and six quaternary carbons. The ^1H NMR spectrum displayed six singlets for methyl groups between δ_{H} 1.03 and δ_{H} 0.76, and one methyl group at δ_{H} 1.68; the latter signal belonged to an isopropenyl fragment, consistent with the presence of the vinylic methylene mentioned above. These NMR data were identical to those reported for lupeol (**1**) [18], and a direct comparison with an authentic sample confirmed its structure. The less polar fractions of the chromatogram provided a white solid. Its ^{13}C NMR spectrum also displayed 30 signals that included a carbonyl group of a ketone (δ_{C} 218.40) and signals with chemical shifts similar to those for **1**, but did not show the oxymethine observed for **1** (δ_{C} 79.02). The EIMS

showed a molecular ion at m/z 424 in agreement with the molecular formula $C_{30}H_{48}O$. The ^{13}C NMR data and its physical constants were identical to those reported for lupenone (**2**), confirming its structure [19]. Four structurally related compounds were isolated, whose 1H and ^{13}C NMR data indicated the presence of four tertiary methyls, three secondary methyls and one primary methyl, characteristic for phytosterols. Sitostenone (**3**) [20,21], β -sitosterol (**4**), stigmasterol (**5**) [22] and β -sitosteryl β -D-glucopyranoside (**6**) [23] were characterized. The identities of these compounds were confirmed by comparing their 1H and ^{13}C NMR data and their physical constants with those published in the literature, and with authentic samples available in our laboratory.

The molecular formula of $C_{26}H_{40}O_7$ for metabolite **7**, was established from the analysis of its NMR and EIMS data. The ^{13}C NMR spectra (Table 1) exhibited 26 carbon signals, which comprised seven methyl groups (three tertiary, two secondary, one primary and one vinylic), four methylenes, nine methines (four bonded to oxygen, three olefinic, and two aliphatic), and six non-protonated carbons (two carbonyls, one olefinic, one aliphatic, one bonded to oxygen, and one bonded to two oxygens). The presence of a methyl senecioate fragment ($C_6H_9O_2$) was established by the ^{13}C and 1H NMR signals assigned (by HMBC analysis) to an ester carbonyl (δ_C 166.58) bonded to the olefinic methine (δ_C 113.86, δ_H 5.70) of a trisubstituted double bond (δ_C 162.97), having an ethyl (δ_C 33.88, δ_H 2.17; δ_C 11.83, δ_H 1.07) and a methyl group (δ_C 18.99, δ_H 2.16) as the other substituents. Therefore, this compound was a diterpene with five degrees of unsaturation bonded to a methyl senecioate fragment. The presence of a β,γ -unsaturated- α -methyl ketone fragment was deduced from the ^{13}C and 1H NMR signals of a ketone (δ_C 211.30) bonded to a methine (δ_H 3.34, according to HMBC correlation), which was further linked to a methyl group (δ_C 16.00, δ_H 1.12, HMBC and COSY correlations) and to a *trans* disubstituted double bond (δ_C 126.81, δ_H 5.24; δ_C 140.07, δ_H 5.86). In addition, the remaining 1H and ^{13}C NMR signals, particularly those for two aliphatic methylenes, three oxymethines, and one hemiketal carbon, were consistent with the presence of a δ -lactol and a tetrahydrofuran in the diterpene skeleton. The NMR data were almost identical to those reported for tonantzitlolone (**7**, named so after the Aztec goddess Tonantzin, by Dr. X. A. Domínguez), a metabolite previously isolated from *Stillingia sanguinolenta*, an endemic plant used traditionally in northern Mexico [24]. However, a number of inconsistencies in the reported 1H NMR assignments were detected, particularly those for the H-12 α and H-12 β , and the H-13 α and H-13 β [25-27]. The correct assignments are shown in Table 1. These assignments were based on the analysis of the coupling constants between the hydrogens

of the tetrahydrofuran ring, which indicated that the observed $J_{12\alpha,13\beta} = 0$ (not informed in references 24-27) was in agreement with the E_2 arrangement of the conformational itinerary of an oxolane ring [28]. Consequently, some reported NOESY correlations should also be corrected according to the new assignments. For instance, the NOESY crosspeak between H-14 (δ_H 3.77) and the signal at δ_H 2.45 informed by Lima [26], was not detected, instead, a correlation between H-14 and H-13 β (δ_H 1.77) was clearly observed. Some minor inconsistencies were due to the use of different numbering systems for the macrocycle, in addition to the fact that one of the first structures published was later corrected [29]. Selected relevant NOESY correlations are illustrated in the X-ray structure depicted in Figure 1(a), since the conformation determined by X-ray analysis (*vide infra*) was in agreement with the H-H dihedral angles deduced from the J_{H-H} 1H NMR coupling constants. Some fragments of this compound were previously synthesized [30], the total synthesis has also been completed [24,31], and its absolute configuration has been established [32], as depicted in formula 7.

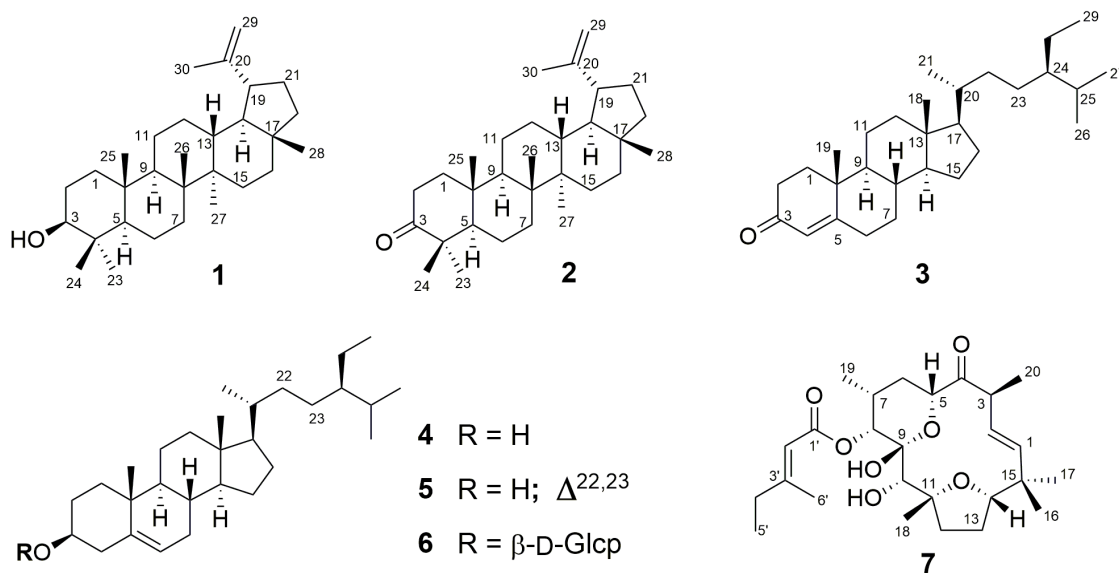


Table 1. ¹H (400 MHz) and ¹³C NMR (100 MHz) data of **7** (δ in ppm, *J* in Hz, CDCl₃)

Position	δ _H , m	<i>J</i> (Hz)	δ _C	NOESY	HMBC (H → C)
1	5.86, d	<i>J</i> _{1,2} 15.2	140.07	13α, 3, 17	C2, C3, C14, C15, C17
2	5.24, dd	<i>J</i> _{1,2} 15.2, <i>J</i> _{2,3} 9.6	126.81	16, 3, 5	C3, C4, C15
3	3.34, dq	<i>J</i> _{2,3} 9.6, <i>J</i> _{3,20} 6.8	49.53	20	C1, C2, C4, C20
4			211.30		
5	4.63, dd	<i>J</i> _{5,6α} 12, <i>J</i> _{5,6β} 2.9	74.14	6β, 7	C4, C6
6α	1.39, ddd	<i>J</i> _{6α,6β} 13.5, <i>J</i> _{6α,7} 13.0	28.82	19, 6β	C5, C8, C19
6β	1.85, ddd	<i>J</i> _{6β,7} 3.2		19, 6α, 5, 7	
7	2.34, dddq	<i>J</i> _{7,8} 2.6, <i>J</i> _{7,19} 6.9	29.05	5, 8, 6β, 19	C6, C19
8	4.90, d	<i>J</i> _{7,8} 2.6	73.17	10, 7, 19	C6, C19, C9
9			97.14		
10	3.43, s		78.20	12α, 8, 18	C9, C12, C18
11			87.65		
12α	2.45, dd	<i>J</i> _{12α,12β} 12.5, <i>J</i> _{12α,13α} 7.5, <i>J</i> _{12α,13β} 0.0	37.35	12β, 13α, 10	C13, C18
12β	1.54, ddd	<i>J</i> _{12β,13β} 7.5		18, 13β, 12α	
13α	2.05, dddd	<i>J</i> _{13α,13β} 12.5, <i>J</i> _{12β,13α} 12.5, <i>J</i> _{13α,14} 12.5	28.06	13β, 12α, 1	C12
13β	1.77, ddd	<i>J</i> _{12β,13β} 7.5, <i>J</i> _{12α,13β} 0.0 <i>J</i> _{13β,14} 5.0		17, 12β, 13α, 14	
14	3.77, dd		88.89	13β, 16, 17, 12β, 18	C1, C12, C13, C16, C17
15			38.73		
16	1.14, s		25.09	17, 14, 2, OH-9	C1, C14, C15, C17
17	0.91, s		25.44	16, 13β, 14	C1, C14, C15, C16
18	1.38, s		28.11	12β, 10, OH-9	C10, C11, C12

19	0.85, d	$J_{7,19}$ 6.9	17.01	7, 6 β , 6 α	C6, C7, C8
20	1.12, d,	$J_{3,20}$ 6.8	16.00	3	C2, C3, C4
1'	-		166.58	-	
2'	5.70, q,	$J_{2,6'}$ 1.2	113.86	5', 4'	C4', C6'
3'	-		162.97	-	
4'	2.17, q,	$J_{4,5'}$ 7.2	33.88	5'	C2', C5', C6'
5'	1.07, t	$J_{4,5'}$ 7.7	11.83	4'	C4'
6'	2.16, d,	$J_{2,6'}$ 1.2	18.99	5'	C2', C4'
OH-9	5.66, s		-	5, 10,18	C8, C9, C10
OH-10	3.10, s		-	-	-

An X-ray analysis of compound **7** confirmed the molecular connectivity and the absolute configuration. In addition, we could identify two intramolecular hydrogen bonds: one between OH-9 and the tetrahydrofuranic oxygen, and the second between OH-10 and the pyranil oxygen (Figure 1(b)). On the basis of these findings, the structure of **7** could be considered to have some rigidity, which further supported the observed ^1H - ^1H NMR coupling constants, consistent with the conformation of the metabolite in the solid state. The absolute configuration for this compound was the same as that obtained for a compound isolated from *Stillingia lineata* (Euphorbiaceae) in the search of antichikunguya agents; and thus, compound **7** was renamed by Grondin et al. as tonantzitlolone A [27], since Kirshning et al. previously characterized an structural variant with difference in the ester side chain, named tonantzitlolone B [25].

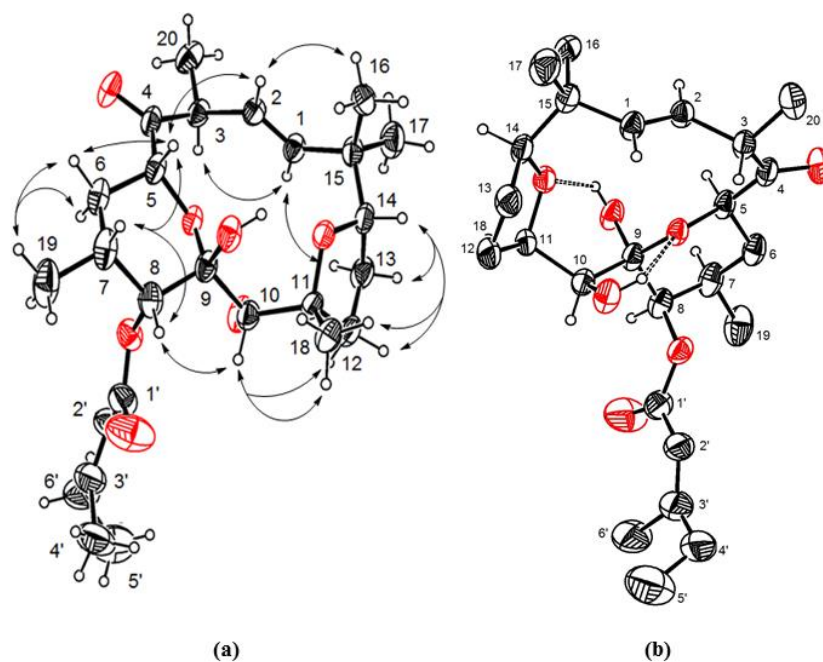


Figure 1. (a) Selected NOESY correlations of tonantzitlolone A (**7**) using the drawing derived of the X-ray analysis. (b) X-ray crystal structure of tonantzitlolone A (**7**) indicating the intramolecular hydrogen bonds (by broken lines).

The inhibitory activities of the extract of *Sapium macrocarpum* and of compounds **1-3**, **6**, and **7** were tested against U251, PC-3, K562, HCT-15, MCF-7, and SKLU-1 human tumor cell lines using the protein-binding dye sulforhodamine B (SRB) microculture assay to measure cell growth [33]. The results revealed that the extract (at 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$) and the assayed compounds (at 50 μM) displayed differential activity (Table 2). Lupeol (**1**) exhibited clear activity against PC-3 cells, and all the natural compounds (**1-3**, **6** and **7**) were active against the leukemia cell line (K562). β -Sitosteryl β -D-glucopyranoside (**6**) displayed the highest activity in the K562 cell line (77% of inhibition), consistent with results with other leukemia cells (CEM/ADR5000) [34]. However, evaluations of these pure compounds against other tumor cell lines indicated inhibitory activities below 40%. Sitostenone (**3**) was previously reported to possess anti-proliferation and anti-tyrosinase activities in melanoma cells [35]. The activities displayed by tonantzitlolone A (**7**) were similar to those reported previously for tonantzitlolones B-F [36]. Recently, tonantzitlolone A (**7**)

was identified as a potent anti-tumor agent in renal cancer cells as a PKC activator [37], and as a cytostatic compound on tumor cells, inducing monoastral half-spindle formation [38].

Table 2. Cytotoxic activities (% of inhibition) of the extract and isolated products from *S. macrocarpum* (50 µg / mL for the extract, 50 µM for pure compounds, DMSO as vehicle).

Sample	Human tumor cell lines					
	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1
CH ₂ Cl ₂ -MeOH (1:1) Extract	17.5	59.8	96.5	45.3	39.5	44.6
1	27.3	50.7	48.8	10.4	22.3	13.0
2	8.3	12.1	53.2	9.1	8.2	28.9
3	1.5	18.4	66.1	2.8	11.6	25.9
6	11.9	32.6	77.0	12.6	2.6	27.7
7	29.2	36.8	64.5	32.1	38.1	27.6
Etoposide ^a	91.1 ^b	51.4 ^c	60.2 ^c	80.8 ^c	56.8 ^c	81.7 ^c

^a Positive control. ^b Concentration at 10µM. ^c Concentration at 31µM

Conclusion

In our search for bioactive natural products, we found that the extract of *S. macrocarpum* (collected in the State of Chiapas, Mexico), a plant used in Mayan traditional medicine for the treatment of warts [16], displayed inhibitory activity toward some cancer cell lines. This species had not been previously analyzed, and in the present chemical investigation we characterized compounds **1-7**. The ¹H NMR analysis of the secondary metabolite **7** allowed the reassignments of the tetrahydrofuran hydrogens. Tonantzitlolone A (**7**) was previously isolated from a Mexican population of *Stillingia sanguinolenta* (collected in the State of Nuevo León) [25], and later from *Sebastiania macrocarpa* (from the Brazilian State of Ceará) [26], and from *Stillingia lineata* (from La Reunion Island, Indian Ocean, France) [27]. The cytotoxic evaluations of the chemical

constituents showed activity and selectivity for some cell lines, although the extract displayed in some cases higher activity, may be due to synergistic interactions. The best cytotoxicities were found with tonantzitlolone A (**7**) and sitostenone (**3**), which showed clear activity against a leukemia cell line. The cytotoxicity results for tonantzitlolone A (**7**) were comparable to those found for tonantzitlonones B-F in a previous study [36]. It is interesting to note that flexibilane diterpenes have been characterized from *Stillingia*, *Sebastiania* and *Sapium* species; all these genera belong to the Hippomaninae subtribe, tribe Hippomaneae, subfamily Euphorbioideae of the family Euphorbiaceae [39].

Experimental

General Experimental Procedures

Analytical TLC was carried out on precoated silica gel 60 F₂₅₄ sheets (Merck), and revealed with cerium ammonium sulfate (1%) in sulfuric acid 2N. For preparative chromatography (PLC) were used glass plates (20 x 20 cm) on precoated silicagel 60 F₂₅₄, 2mm (Merck). Column chromatography (CC) was performed using silica gel (230-400 mesh). All solvents were dried and distilled before use. Melting points were determined on a Fisher Johns apparatus (Cole Parmer) and are uncorrected. ¹H (400 MHz), ¹³C (100.0 MHz), and 2D NMR spectra (in CDCl₃) were obtained on Bruker Avance III NMR 400 spectrometer. Chemical shifts were expressed in parts per million (δ) relative to TMS as internal standard. EIMS were taken in a JEOL JMS-AX 505 HA. Analysis by X-ray diffraction was performed using a Bruker D8 Venture automatic diffractometer with a CCD area detector at 173(2) K using Helios multilayer mirror Cu K α radiation ($\lambda = 1.54178\text{\AA}$).

Plant material, extraction and isolation

The aerial parts of *S. macrocarpum* Müll. Arg. was collected in Arriaga district, in the state of Chiapas, Mexico, in 2007. Prof. Esteban M. Martínez identified the plant material and a voucher specimen (39273 Esteban M. Martínez) was deposited in the collection of the National Herbarium (MEXU), Instituto de Biología, UNAM.

Aerial parts of *S. macrocarpum* (leaves and branches, 1.1 kg) were dried, powdered and extracted three times at room temperature with a mixture of CH₂Cl₂–methanol (1:1), and a residue (41 g) was obtained after evaporating the solvent under reduced pressure. Part of this residue (38 g) was adsorbed in a 1:1 mixture of celite and silica gel (30 g) and chromatographed over a silica gel column eluted with hexane–EtOAc mixtures of increasing polarity, yielding 130 eluates which were joined in eight main fractions (A-H), according to TLC analyses. Fraction D (124 mg) was subjected to column chromatography over silica gel with hexane–EtOAc gradient system, to give a fraction that was further purified by preparative TLC eluted with a mixture of hexane–EtOAc (85:15), yielding lupenone (**2**, 15 mg). (R_f 0.69, hexane–EtOAc, 85:15). EIMS *m/z* (% rel): 424 (M⁺, 6), 355 (4), 313 (4), 245 (3), 232 (4), 205 (100), 189 (30), 109 (60), 95 (58), 69 (45), 67 (47). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 4.63 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-29b), 4.50 (1H, dd, *J* = 2.6, 1.4 Hz, H-29a), 2.35 (1H, m, H-19), 1.62 (3H, s, H-30), 1.50 (1H, s, H-2b), 1.37 (1H, s, H-11), 1.00 (3H, s, CH₃-26), 0.96 (6H, s, CH₃-23, CH₃-27), 0.81 (3H, s, CH₃-25), 0.79 (3H, s, CH₃-24), 0.73 (3H, s, CH₃-28). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 218.4 (C-3), 151.1 (C-20), 109.6 (C-29), 55.1 (C-5), 49.9 (C-9), 48.4 (C-18), 48.1 (C-19), 47.5 (C-4), 43.2 (C-17), 43.1 (C-14), 40.9 (C-8), 40.1 (C-22), 39.8 (C-1), 38.3 (C-13), 37.0 (C-10), 35.7 (C-16), 34.3 (C-2), 33.7 (C-7), 29.9 (C-21), 27.6 (C-15), 26.8 (C-23), 25.3 (C-12), 21.6 (C-11), 21.2 (C-24), 19.8 (C-6), 19.5 (C-30), 18.2 (C-28), 16.1 (C-25), 15.9 (C-26), 14.6 (C-27).

Fraction E (170 mg) was subjected to silica gel column chromatography using a hexane–EtOAc gradient to afford 92 fractions. Subfractions E₂₇–E₃₀ (20 mg) were combined and subjected to preparative TLC to yield tonantzitolone A (**7**, 8 mg) as colorless crystals (from acetone). R_f 0.59 (hexane–EtOAc, 85:15), mp 172–173 °C. EIMS *m/z* (% rel): 464 (M⁺, 25), 446 (29), 364 (12), 350 (10), 180 (25), 126 (25), 97 (100), 69 (65). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) and ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz), see Table 1. Subfractions E₃₈–E₄₇ were combined and the residue (29 mg) was subjected to preparative TLC to yield sitostenone (**3**, 9 mg). R_f 0.42, hexane:EtOAc 85:15. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 5.72 (1H, s, H-4), 1.18 (3H, s, H-19), 0.92 (3H, d, *J* = 8 Hz, H-21), 0.85 (3H, s, H-29), 0.83 (3H, d, *J* = 4 Hz, H-26), 0.81 (3H, s, H-27), 0.71 (3H, s, H-18). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 199.91 (C-3), 171.9 (C-5), 123.9 (C-4), 56.7 (C-1), 56.2 (C-14), 56.0 (C-17), 54.0 (C-9), 45.97 (C-24), 42.5 (C-13), 39.8 (C-12), 38.8 (C-10), 36.3 (C-20), 35.8 (C-8), 34.1 (C-22), 34.0 (C-7), 33.1 (C-6), 32.2 (C-2), 29.3 (C-23), 28.4 (C-16), 26.2 (C-25), 24.3 (C-15), 23.21 (C-28), 21.2 (C-11), 19.97 (C-27), 19.2 (C-19), 18.9 (C-21), 17.54 (C-26), 12.1 (C-18, C-29).

Fraction F (440 mg) was rechromatographed over silica gel using hexane-EtOAc elution system to obtain 35 eluates. Subfractions F₁₂-F₁₈ (64 mg) were combined and rechromatographed over silica gel eluting with hexane-EtOAc gradient system, and some fractions were joined and further purified by preparative TLC to yield lupeol (**1**, 19 mg). R_f 0.40 (hexane-EtOAc, 85:15). From subfractions F₂₄-F₂₉ was obtained a solid that was characterized by ¹H NMR as a 4.3:1 mixture of β-sitosterol (**4**) and stigmasterol (**5**) (72 mg), R_f 0.26, hexane-EtOAc, 85:15. Sequential recrystallizations from acetone-di-*isopropyl* ether-hexane allowed the purification of the compounds.

From fraction H was obtained a solid which was purified by repeated recrystallizations from methanol-CH₂Cl₂-di-*isopropyl* ether, affording a white amorphous solid that was characterized by its spectroscopic constants and by chromatographic comparison with an authentic sample as β-sitosteryl-β-D-glucopyranoside (**6**, 38 mg). R_f 0.31, CH₂Cl₂-MeOH, 9:1 [23].

Cytotoxicity Assay

The cytotoxicity of pure compounds was determined against a number of tumor cells by proliferation assay using the colorimetric method of the sulforhodamine B (SRB, protein binding dye). Cell lines of human tumors, central nervous system (U251), prostate (PC-3), leukemia (K562), colon (HCT-15), breast (MCF-7) and lung (SKLU) were provided by the National Cancer Institute (USA). Colored solutions were extracted and optical densities were read on an Ultra Reader of Microplate (Elx 808, Bio-Tek Instruments, Inc.) at wavelength of 515 nm.

X-ray crystallographic analysis of **7**

X-ray structural analysis was achieved on a Bruker D8 Venture automatic diffractometer with a CCD area detector at 173(2) K using helios multilayer mirror Cu K α radiation ($\lambda = 1.54178\text{\AA}$). The structure was solved by direct methods and refined by full-matrix least-squares on F^2 using the program SHELXS-2014 (Bruker, 2014). The crystal data can be summarized as follows: empirical formula C₂₆H₄₀O₇; formula weight 464.58 amu; colorless prism, crystal system orthorhombic, crystal size 0.278 x 0.175 x 0.098 mm, space group $P 2_1 2_1 2_1$, $Z = 4$, $a = 10.1588(2)\text{\AA}$, $b = 10.2763(2)\text{\AA}$, $c = 25.2894(6)\text{\AA}$, $V = 2640.08(10)\text{\AA}^3$, $D_{\text{calcd}} 1.171\text{ Mg/m}^3$; $F(000) = 1012$; $\mu = 0.681\text{ m}\mu^{-1}$; 19338 collected reflections ($3.49^\circ \leq \theta \leq 68.27^\circ$), $-11 \leq h \leq 12$, $-12 \leq k \leq 7$, $-30 \leq l \leq 30$; 4827 independent reflections ($R_{\text{int}} = 0.0615$); goodness-of-fit on F^2 is

1.148, final R indices for $I > 2\sigma(I)$, $R_1 = 0.066$, $wR_2 = 0.174$, R indices for all data $R_1 = 0.0777$, $wR_2 = 0.1873$; refining 331 parameters and 83 restraints; the largest difference peak and hole was 0.359 and -0.232 e.Å⁻³; completeness to θ (25.24°) 99.8%, absorption correction was not applied. Selected crystallographic data are available as supplementary material of this article. Complete crystallographic data were deposited at the CCDC, deposition number 1432773. These data can be obtained free of charge via <http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html>.

Acknowledgments: The authors thank SENESCYT (Ecuador), CONACYT (México-288423), UNAM (DGAPA PAPIIT IG 200514), and Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, UNAM, for financial support. We also thank María Teresa Ramírez Apan, María de los Ángeles Peña González, Rocío Patiño, Antonio Nieto Camacho, Luis Velasco, Javier Pérez Flores (Instituto de Química de la UNAM) for technical assistance. This work is dedicated to Dr. Héctor Rasgado-Flores (Rosalind Franklin University of Medicine and Science, Chicago, USA) on the occasion of his musical composition “Suite of the Elements” written for the International Year of Chemistry (2011).

References

1. Al Muqarrabun, L.M.R.; Ahmat, N.; Aris, S.R.S. A review of the medicinal uses, phytochemistry and pharmacology of the genus *Sapium*. *J. Ethnopharmacol.* **2014**, *155*, 9-20.
2. The Plant List. <http://www.theplantlist.org/> (accessed on 19 / 11 / 2016).
3. Devkota, H.P.; Basnet, P.; Yahara, S. Diterpene esters and phenolic compounds from *Sapium insigne* (Royle) Benth. ex Hook fil. *Chem. Pharm. Bull.* **2009**, *57*, 1289-1291.
4. Devkota, H.P.; Basnet, P.; Yahara, S. A new phenolic compound, 4-dehydrochebulic acid-1,6-dimethyl ester from *Sapium insigne* leaves. *J. Nat. Med.* **2010**, *64*, 191-193.
5. Huang, S.; Fujioka, T.; Yoshida, M.; Ishimaru, K. A new chalcone glycoside from *Sapium sebiferum*. *J. Nat. Med.* **2007**, *61*, 339-341.
6. Fu, R.; Zhang, Y.; Guo, Y.; Chen, F. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of Chinese tallow tree leaves. *Ind. Crops Prod.* **2015**, *76*, 374-377.
7. Taylor, S.E.; Gafur, M.A.; Choudhury, A.K.; Evans, F.J. Nitrogen-containing Phorbol Derivatives of *Sapium indicum*. *Phytochemistry* **1981**, *20*, 2749-2751.
8. Chumkaew, P.; Karalai, C.; Ponglimanont, C.; Chantrapromma, K. Antimycobacterial Activity of Phorbol Esters from the Fruits of *Sapium indicum*. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 540-543.
9. Liu, H.B.; Zhang, H.; Yu J.H.; Xu C.H.; Ding, J.; Yue, J.M. Cytotoxic Diterpenoids from *Sapium insigne*. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 722-727.

10. Arbain, D.; Byrne, L.T.; Cannon, J.R.; Patrick, V.A.; White, A.H. (-)-Bukittinggine, the Major Alkaloid of *Sapium baccatum*. Crystal Structure and Absolute Configuration of Bukittinggine Hydrobromide. *Aust. J. Chem.* **1990**, *43*, 185-190.
11. Ahmed, Y.; Sohrab, Md.H.; Al-Reza, S.M.; Tareq, F.S.; Hasan, C.M.; Sattar, M.A. Antimicrobial and cytotoxic constituents from leaves of *Sapium baccatum*. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48*, 549-552.
12. Al Muqarrabun, L.M.R.; Ahmat, N.; Aris, S.R.S.; Norizan, N.; Shamsulrijal, N.; Yusof, F.Z.M.; Suratman, M.N.; Yusof, M.I.M.; Salim, F. A new triterpenoid from *Sapium baccatum* (Euphorbiaceae). *Nat. Prod. Res.* **2014**, *28*, 1003-1009.
13. Siems, K.; Jakupovic, J.; Castro, V.; Poveda, L. Rigidol, an unusual diterpene from *Sapium rigidifolium*. *Phytochemistry* **1993**, *33*, 1465-1468.
14. Woldemichael, G.M.; Lugo, M.T.G.; Franzblau, S.G.; Wang, Y.; Suarez, E.; Timmermann, B.N. Mycobacterium tuberculosis growth inhibition by constituents of *Sapium haemospermum*. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 598-603.
15. Yang, P.; Kinghorn, A.D. Coumarin constituents of the chinese tallow tree (*Sapium sebiferum*). *J. Nat. Prod.* **1985**, *48*, 486-488.
16. Flores, J.S.; Vermont-Ricalde, R. The Secretions and Exudates of Plants Used in Mayan Traditional Medicine. *J. Herbs Spices Med. Plants* **1996**, *4*, 53-59.
17. García-Méndez, M. C.; Macías-Ruvalcaba, N. A.; Lappe-Oliveras, P.; Hernández-Ortega, S.; Macías-Ruvalcaba, M. L. Phytotoxic Potential of Secondary Metabolites and Semisynthetic Compounds from Endophytic Fungus *Xylaria feejeensis* Strain SM3e-1b Isolated from *Sapium macrocarpum*. *J. Agr. Food Chem.* **2016**, *64*, 4255-4263.
18. Burns, D.; Reynolds, W.F.; Buchanan, G.; Reese, P.B.; Enriquez, R.G., Assignment of ¹H and ¹³C spectra and investigation of hindered side-chain rotation in lupeol derivatives. *Magn. Reson. Chem.* **2000**, *38*, 488-493.
19. Carpenter, R.C.; Sotheeswaran, S.; Sultanbawa, M.U.S. ¹³CNMR studies of some Lupane and Taraxerane Triterpenes. *Org. Magn. Reson.* **1980**, *14*, 462-465.
20. Greca, M. D.; Monaco, P.; Previtera, L. Stigmasterols from *Typha latifolia*. *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 1430-1435.
21. Prachayasittikul, S.; Suphamong, S.; Worachartcheewan, A.; Lawung, R.; Somsak Ruchirawat, S.; Prachayasittikul, V. Bioactive Metabolites from *Spilanthes acmella* Murr. *Molecules* **2009**, *14*, 850-867.
22. Kongduang, D.; Wungsintaweekul, J.; De-Eknamkul, W. Biosynthesis of β-sitosterol and stigmasterol proceeds exclusively via the mevalonate pathway in cell suspension cultures of *Croton stellatopilosus*. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 4067-4072.
23. Kim, D. K.; Lim, J. P.; Kim, J. W.; Park, H. W.; Eun, J. S. Antitumor and Antiinflammatory Constituents from *Celtis sinensis*. *Arch. Pharm. Res.* **2005**, *28*, 39-43.
24. Jasper, C.; Wittenberg, R.; Quitschalle, M.; Jakupovic, J.; Kirschning, A. Total synthesis and elucidation of the absolute configuration of the diterpene tonantzitlolone. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 479-482.

25. Dräger, G.; Jeske, F.; Kunst, E.; Lopez, E. G.; Sanchez, H. V.; Tschritzis, F.; Kirschning, A.; Jakupovic, J. Tonantzitlolone and other Diterpenes from *Stillingia sanguinolenta*. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 5020–5026.
26. Lima, M.A.A.; Lima, J.Q.; Arriaga, A. M. C.; Andrade-Neto, M.; Santiago, G.M.P.; Bezerra, B.P.; Fereira, Y.S.; Veras, H.N.H.; Braz-Filho, R. Constituintes Químicos de *Sebastiania macrocarpa* Muell. Arg. (Euphorbiaceae). *Quim. Nova* **2009**, 32, 348-353.
27. Techer, S.; Girard-Valenciennes, E.; Retailleau, P.; Neyts, J.; Guéritte, F.; Leyssen, P.; Litaudon, M.; Smadja, J.; Grondin, I. Tonantzitlolones from *Stillingia lineata* ssp. *lineata* as potential inhibitors of chikungunya virus. *Phytochemistry Lett.* **2015**, 12, 313-319.
28. Napolitano, J. G.; Gavín, J. A.; García, C.; Norte, M.; Fernández, J. J.; Hernández Daranas, A. On the Configuration of Five-Membered Rings: A Spin–Spin Coupling Constant Approach. *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 6338 – 6347.
29. Dräger, G.; Jeske, F.; Kunst, E.; Lopez, E.G.; Sanchez, H.V.; Tschritzis, F.; Kirschning, A.; Jakupovic, J. Tonantzitlolone and other Diterpenes from *Stillingia sanguinolenta*. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 6128.
30. Wittenberg, R.; Beier, C.; Dräger, G.; Jas, G.; Jasper, C.; Monenscheina, H.; Kirschning, A. Towards the total synthesis of tonantzitlolone, preparation of key fragments and the complete carbon backbone. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 4457-4460.
31. Jasper, C.; Adibekian, A.; Busch, T.; Quitschalle, M.; Wittenberg, R.; Kirschning, A. Total Synthesis of Cyclic Diterpene Tonantzitlolone Based on a Highly Stereoselective Substrate-Controlled Aldol Reaction and Ring-Closing Metathesis. *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 8719-8734.
32. Busch, T.; Schuster, H.; Kirschning, A. Determination of the absolute configuration of the diterpene tonantzitlolone B. *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 5273-5275.
33. Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A.; Gray-Goodrich, M.; Campbell, H.; Mayo, J.; Boyd, M. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **1991**, 83, 757-766.
34. El-Readi, M.Z.; Hamdan, D.; Farrag, N.; El-Shazly, A.; Wink, M. Inhibition of P-glycoprotein activity by limonin and other secondary metabolites from *Citrus* species in human colon and leukaemia cell lines. *Eur. J. Pharm.* **2010**, 626, 139-145.
35. Chu, C.W.; Liu, C.M.; Chung, M.I.; Chen, C.Y. Biofunctional Constituents from *Michelia compressa* var. *lanyuensis* with Anti-Melanogenic Properties. *Molecules* **2015**, 20, 12166-12174.
36. Olivon, F.; Palenzuela, H.; Girard-Valenciennes, E.; Neyts, J.; Pannecouque, C.; Roussi, F., Grondin, I.; Leyssen, P.; Litaudon, M.; Antiviral Activity of Flexibilane and Tigliane Diterpenoids from *Stillingia lineata*. *J. Nat. Prod.* **2015**, 78, 1119-1128.
37. Sourbier, C.; Scroggins, B.T.; Mannes, P.Z.; Liao, P.J.; Siems, K.; Wolf, D.; Beutler, J.A.; Linehan, W.M.; Neckers, L. Tonantzitlolone cytotoxicity toward renal cancer cells is PKC θ - and HSF1-dependent. *Oncotarget* **2015**, 6, 29963-29974.

38. Pfeffer, T. J.; Sasse, F.; Schmidt, Ch. F.; Lakämper, S.; Kirshning, A.; Scholz, T. The natural diterpene tonantzitlolone A and its synthetic enantiomer inhibit cell proliferation and kinesin-5 function. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *112*, 164-170.
39. Martínez-Gordillo, M.; Jiménez-Ramírez, J.; Cruz-Durán, R.; Juárez-Arriaga, E.; García, R.; Cervantes, A.; Mejía-Hernández, R. Los Géneros de la Familia Euphorbiaceae en México. *An. Inst. Biol. UNAM* **2002**, *73*, 155-281.