



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

AI SLAMI ENTO Y DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA MOLECULAR DE LOS
CONSTITUYENTES QUÍMICOS PRESENTES EN LA ESPECIE VEGETAL
EUPHORBIA TANQUAHUETE SESSÉ & MOC.

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

L. Q. LUIS JESÚS ROMERO MORÁN

TUTOR

DR. EDUARDO GUILLERMO DELGADO LAMAS
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., enero de 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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: Dra. Rachel Mata Essayag

Vocal: Dr. Ricardo Reyes Chilpa

Vocal Dra. Laura Patricia Álvarez Berber

Vocal: Dr. Marcos Soto Hernández

Secretario: Dra. Nuria Esturau Escofet

Este trabajo se realizó en el laboratorio 1-C del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría del Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas.

L. Q. Luis J. Romero Morán
Sustentante

Dr. E. Guillermo Delgado Lamas
Tutor

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (becario 599417).

A la Coordinación y al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Química.

Al Dr. Guillermo Delgado Lamas, por darme la oportunidad de ser parte de su grupo de trabajo, y por su valiosa asesoría y apoyo durante mis estudios.

Al personal técnico del Instituto de Química: a la M. en C. Elizabeth Huerta Salazar, la Dra. María Isabel Chávez Uribe, al Dr. Rubén Luis Gaviño Ramírez de los laboratorios de Resonancia Magnética Nuclear. A la Q. F. B. María del Rocío Patiño Maya y a la Q. María de la Paz Orta Pérez del laboratorio de Espectroscopía y Polarimetría. A la Dra. María del Carmen García González, y al Dr. Francisco Javier Pérez Flores del laboratorio de espectrometría de masas. Al M. en C. Antonio Nieto Camacho y a la M. en C. María Teresa Ramírez Apan del laboratorio de pruebas biológicas.

A los miembros del jurado: Dra. Rachel Mata Essayag, Dr. Ricardo Reyes Chilpa, Dra. Laura Patricia Álvarez Berber, Dr. Ramón Marcos Soto Hernández y la Dra. Nuria Esturau Escofet, por invertir su valioso tiempo en la revisión de esta tesis.

A mis compañeros del laboratorio: Adriana Neira, Ariel Carreño, Fabiola López, Gabriela Salazar, Isabel Silva, José Luis González, Luann Martínez, Olivia Pérez, Verónica Egas y Yesica Cruz. Y un especial agradecimiento a José Luis Rodríguez Chávez, por haberme compartido una parte de su amplia experiencia en el laboratorio, y por sus invaluable consejos y sugerencias.

A Perla, porque solos llegaríamos más rápido, pero acompañados, más lejos.

*A mis padres, Arcelia y Luis,
por todo su apoyo, que sigue siendo infinito e incondicional.*

ABREVIATURAS

°C	grado Celsius
ATF	Acetato de tetradecanoil forbol
AcOEt	Acetato de etilo
AcOH	Ácido acético
C ₆ D ₆	benceno deuterado
CC	Cromatografía en Columna
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CH ₃ OH	Metanol
CHCl ₃	Cloroformo
<i>d</i>	Doblete
<i>dd</i>	Doble de dobles
<i>ddd</i>	Doble de doble de dobles
<i>dt</i>	Doble de triples
δ	Desplazamiento químico
DEPT	Aumento de distorsión sin transferencia de polarización (<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>)
HMBC	Correlación heteronuclear de múltiples enlaces (<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>).
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
<i>m</i>	Multiplete
Me ₂ CO	Acetona
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
p. f.	Punto de fusión
R. f.	Factor de retención (<i>Retention factor</i>).
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
<i>s</i>	Singlete
<i>t</i>	Triplete

ÍNDICE

Resumen y Abstract.....	10
1. Introducción.....	11
2. Antecedentes.....	13
2.1 Género <i>Euphorbia</i>	13
2.2 Uso medicinal tradicional de algunas plantas del género <i>Euphorbia</i>	13
2.3 Compuestos aislados de plantas del género <i>Euphorbia</i>	14
2.4 Triterpenoides aislados del género <i>Euphorbia</i>	17
2.5 Esquema biosintético de los triterpenoides aislados de <i>Euphorbia</i>	18
2.6 <i>Euphorbia tanquahuete</i>	21
3. Justificación y Objetivos.....	23
3.1 Justificación.....	23
3.2 Objetivos generales.....	23
3.3 Objetivos específicos.....	23
4. Resultados y discusión.....	25
4.1 Compuestos aislados.....	25
4.2 Análisis preliminar del látex.....	37
4.3 Evaluación preliminar de la actividad biológica de los extractos.....	38
5. Resumen y Conclusiones.....	42
6. Sección experimental.....	44
6.1 Colecta y procesamiento del material vegetal.....	44
6.2 Aislamiento de los constituyentes químicos.....	44
6.3 Caracterización.....	45
6.4 Compuestos aislados.....	46
Escualeno (19).....	46
1-Octacosanol (20).....	46
Eufol (18).....	46

Lupeol (21).....	47
Cicloeucaleanol (22).....	48
25,26,27- <i>trishnor</i> -3 β -hidroxieufan-24-al (23).....	48
Eufa-8,23-dien-3 β -25-diol (24).....	49
β -Sitosterol (15).....	49
7. Referencias.....	51
8. Anexo.....	55

Índice de esquemas

Esquema 1: Biosíntesis de lanosterol y eufol a partir de óxido de escualeno.....	19
Esquema 2: Biosíntesis de cicloartenol desde el catión protosterilo.....	20
Esquema 3: Pérdida de metilo en C-4 del esqueleto de cicloartano.....	20
Esquema 4: Introducción del metileno vinílico en la posición 24 en la biosíntesis de cicloeucaleanol.....	21

Índice de tablas

Tabla 1: Esqueletos diterpénicos aislados de distintas especies del género <i>Euphorbia</i>	15
Tabla 2: Actividad antiinflamatoria del eufol y de los extractos.....	38
Tabla 3: Actividad citotóxica (% de inhibición) del eufol y los extractos.....	39

Índice de figuras

Figura 1: Sesquiterpenoides aislados de <i>E. wangii</i> y <i>E. resinifera</i>	14
Figura 2: Tipos de esqueletos diterpénicos aislados de plantas del género <i>Euphorbia</i>	15
Figura 3: Estructuras moleculares de mebutato de ingenilo (7), resiniferatoxina (8) y terracinólida A (9).....	17
Figura 4: Estructura molecular de los compuestos antiquol B (10), 27- <i>nor</i> -3 β -hidroxicicloartan-25-ona (11), (22 <i>E</i>)-25,26,27- <i>trishnor</i> -3 β -hidroxicicloartan-22-en-24-al (12) y 25,26,27- <i>trishnor</i> -3 β -hidroxicicloartan-24-al (13).....	17

Figura 5: Estructuras moleculares de los compuestos β -amirina (14), β -sitosterol (15), 24-metilencicloartenol (16), cicloartenol (17), y eufol (18).....	18
Figura 6: Correlaciones en el HMBC del eufol (18).....	29
Figura 7: Correlaciones en el HMBC del cicloeucalenol (22).....	32
Figura 8: Correlaciones en el HMBC del 25,26,27- <i>trisinor</i> -3 β -hidroxieufan-24-al (23).....	34
Figura 9: Correlaciones en el HMBC del eufa-8,23-dien-3 β ,25-diol (24).....	36
Figura 10: Comparación de espectros: a) 18 aislado del látex, b) extracto del látex, y c) 18 aislado de hojas.....	38

Índice de espectros

Figura 11. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) del escualeno (19).....	55
Figura 12. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) del escualeno (19).....	56
Figura 13. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) del 1-octacosanol (20).....	57
Figura 14. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) del 1-octacosanol (20).....	58
Figura 15. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del eufol (18).....	59
Figura 16. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 400 MHz) del eufol (18).....	60
Figura 17. Espectros DEPT del eufol (18).....	61
Figura 18. Espectro HSQC del eufol (18).....	62
Figura 19. Espectro HMBC del eufol (18).....	63
Figura 20. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) del lupeol (21).....	64
Figura 21. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) del lupeol (21).....	65
Figura 22. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del cicloeucalenol (22).....	66
Figura 23. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) del cicloeucalenol (22).....	67
Figura 24. Espectros DEPT del cicloeucalenol (22).....	68
Figura 25. Espectro HSQC del cicloeucalenol (22).....	69
Figura 26. Espectro HMBC del cicloeucalenol (22).....	70
Figura 27. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del 25,26,27- <i>trisinor</i> -3 β -hidroxieufan-24-al (23).....	71
Figura 28. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) del 25,26,27- <i>trisinor</i> -3 β -hidroxieufan-24-al (23).....	72
Figura 29: Espectros DEPT del 25,26,27- <i>trisinor</i> -3 β -hidroxieufan-24-al (23).....	73

Figura 30. Espectro HSQC del 25,26,27- <i>trishnor</i> -3 β -hidroxieufan-24-al (23).....	74
Figura 31. Espectro HMBC del 25,26,27- <i>trishnor</i> -3 β -hidroxieufan-24-al (23).....	75
Figura 32. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del eufa-8,23-dien-3 β ,25-diol (24).....	76
Figura 33. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) del eufa-8,23-dien-3 β ,25-diol (24).....	77
Figura 34. Espectros DEPT del eufa-8,23-dien-3 β ,25-diol (24).....	78
Figura 35. Espectro HSQC del eufa-8,23-dien-3 β ,25-diol (24).....	79
Figura 36. Espectro HMBC del eufa-8,23-dien-3 β ,25-diol (24).....	80
Figura 37. Espectro RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) del β -sitosterol (15).....	81

RESUMEN

La especie vegetal *Euphorbia tanquahuete* es usada en la medicina popular en algunas partes de México principalmente para el tratamiento de fracturas óseas, y esta es la primera ocasión en que se informa la estructura de los metabolitos secundarios presentes en las hojas. En este estudio se aislaron y caracterizaron escualeno, 1-octacosanol, eufol, lupeol, cicloeucalenol, eufa-8,23-dien-3 β ,25-diol, 25,26,27-*trisor*-3 β -hidroxieufan-24-al y β -sitosterol. Esta es la primera ocasión en que se informa al 25,26,27-*trisor*-3 β -hidroxieufan-24-al como producto natural. El eufol es el principal constituyente químico del látex. Las actividades antiproliferativa (frente a algunas líneas celulares cancerosas) y antiinflamatoria del eufol y de los extractos de hojas, ramas y látex fueron evaluadas. Tanto el extracto acetónico de las ramas como el clorofórmico del látex mostraron actividad antiinflamatoria notoria. Los extractos orgánicos de las ramas mostraron actividad citotóxica. Las propiedades biológicas del eufol evaluadas en el presente trabajo indican que este constituyente no es el único responsable de las bioactividades observadas en los extractos. El perfil químico encontrado para esta especie es consistente con la quimiotaxonomía del género *Euphorbia*.

ABSTRACT

The plant species *Euphorbia tanquahuete* is used in folk medicine in some parts of Mexico mainly for the treatment of bone fractures and this is the first time that the structure of the secondary metabolites isolated from the leaves is informed. In this study were isolated and characterized squalene, 1-octacosanol, euphol, lupeol, cycloeucalenol, eupa-8,23-diene-3 β ,25-diol, 25,26,27-*trisor*-3 β -hydroxyeuphan-24-al and β -sitosterol. This is the first time that 25,26,27-*trisor*-3 β -hydroxyeuphan-24-al is informed as natural product. Euphol was the main chemical constituent from the latex. The antiproliferative (against sole cancer cell lines) and anti-inflammatory activities of euphol and the organic extracts of leaves, branches and latex were evaluated. Both the acetonic extract from the branches and the chloroformic extract from the latex displayed significant anti-inflammatory activity. The organic extracts from the branches showed antiproliferative activity. The biological properties of euphol evaluated in the present work indicated that this constituent is not the only responsible for the observed bioactivities of the extracts. The chemical profile found for this species is consistent with the chemotaxonomy of the genus *Euphorbia*.

1. INTRODUCCIÓN

Desde que se tiene registro, las plantas han sido empleadas por el ser humano como fuente de alimento, herramientas, pigmentos, materias primas, pero además como fuente de remedios para padecimientos que han acompañado al ser humano desde tiempos remotos.

Aunque no se sabe con certeza en qué momento los humanos comenzaron a usar plantas con fines medicinales, hay evidencia reciente que sugiere que el *Homo neanderthalensis*, especie de homínido que llegó a convivir con el ser humano, ya hacía uso medicinal de plantas hace más de 40,000 años.¹⁻³

A lo largo de la historia distintas culturas alrededor del mundo han registrado el uso de plantas con fines terapéuticos. Los registros más antiguos se remontan al año 2600 a. C., en tablillas de arcilla encontradas en Mesopotamia donde se menciona el uso de varias plantas, entre ellas *Papaver somniferum*, planta de la cual Friedrich Setürner aisló la morfina, un alcaloide que junto con sus derivados hoy tienen un uso importante como analgésicos.

La cultura egipcia cuenta con registros farmacéuticos en el Papiro de Ebers, que data del año 1500 a. C.; en este documento se reporta el uso de alrededor de 700 preparaciones medicinales, la gran mayoría a base de plantas. En la antigua Grecia hubo también registro del uso de plantas con fines medicinales, por parte de personajes como el filósofo y naturalista Teofrasto alrededor del año 300 a. C., o Dioscórides, quien hizo una extensa recopilación del uso medicinal de plantas. Quizá el ejemplo más representativo en la cultura griega sea el uso de la corteza del sauce (*Salix alba*) para tratar la fiebre. Hoy se sabe que la corteza de este árbol contiene salicina, compuesto que fue la inspiración para la síntesis del ácido acetilsalicílico.

Por otra parte, las culturas de la América prehispánica hicieron amplio uso de las especies vegetales que tenían a su alcance, tal es el caso de las hojas del arbusto de la coca (*Erythroxylon coca*) usado en América del Sur en la región de los Andes como estimulante. Más tarde en la historia de América, la corteza del árbol de la quina (*Cinchona* spp.) fue un remedio muy apreciado en Europa y el resto del mundo como tratamiento para la malaria, un padecimiento que ha afectado al ser humano desde tiempos remotos.

En la actualidad el descubrimiento de sustancias con actividad farmacológica importante continúa. Fármacos como el paclitaxel aislado del árbol *Taxus brevifolia*, o la artemisinina aislada de *Artemisia annua*, tienen actividad destacada como tratamiento para el cáncer y contra cepas resistentes de malaria, respectivamente.

Es importante hacer notar que el descubrimiento de los principios activos presentes en plantas con uso medicinal ha llevado al desarrollo de nuevos fármacos, que poseen mayor eficacia y/o menos efectos secundarios. Como ejemplos pueden mencionarse los siguientes. A partir de la morfina aislada del opio se han desarrollado otros fármacos como la oxicodeona y la heroína, además de medicamentos cuya estructura fue inspirada en la morfina como el fentanilo o el dextrometorfano. En el caso de la quinina, aislada de la corteza del árbol de la quina, sirvió de base para el desarrollo de los antimaláricos mefloquina y cloroquina. La efedrina aislada del arbusto *Ephedra sinica*, de uso ancestral en China, fue inspiración para fármacos como la pseudo-efedrina, el salbutamol y otros.

La búsqueda de nuevos productos naturales con actividad farmacológica continúa siendo importante, prueba de ello es el hecho de que un buen porcentaje de nuevos compuestos activos son productos naturales, o derivados sintetizados a partir de un producto natural, o en su caso, compuestos sintetizados que imitan la estructura molecular de un producto natural. Numéricamente, se sabe que en el periodo 1981 – 2002, cerca del 70 % de los agentes antiinfecciosos (antivirales, antibacterianos, antifúngicos), y 64 % en el caso de fármacos para el tratamiento del cáncer, son derivados de, o inspirados en productos naturales.^{4,5}

Así, la línea de investigación referente a la investigación de los constituyentes químicos presentes en la naturaleza, es particularmente relevante en los países poseedores de biodiversidad como México. Siguiendo el tipo de investigación que ha llevado al descubrimiento de compuestos con actividad biológica en fuentes naturales, en este trabajo se realizó el aislamiento y caracterización de los constituyentes químicos presentes en las partes aéreas de la especie vegetal *Euphorbia tanquahuete* Sessé & Moc. Se sabe que esta especie tiene uso medicinal tradicional principalmente para tratar fracturas óseas,⁶ por lo que se justifica el estudio de los constituyentes químicos presentes en esta planta.

2. ANTECEDENTES

2.1 Género *Euphorbia*

Dentro de la familia Euphorbiaceae se encuentra el género *Euphorbia* que es uno de los más grandes del reino vegetal con más de 2000 especies registradas. Incluye plantas con morfología muy variada, árboles, hierbas, arbustos, e incluso suculentas que parecen pertenecer a la familia Cactaceae.

Una característica de este género es la producción de látex debido a que posee células laticíferas. El contenido de triterpenoides en el látex ha demostrado tener valor diagnóstico en la clasificación taxonómica de las especies de *Euphorbia*, debido a que distintos especímenes colectados en distintos lugares y bajo distintas condiciones, presentan un perfil triterpénico relativamente invariable para un taxón determinado.⁷

2.2 Uso medicinal tradicional de algunas plantas del género *Euphorbia*

Las plantas del género *Euphorbia* tienen reportado usos medicinales en varias partes del mundo, principalmente en Asia. Tal es la importancia medicinal de algunas plantas de este género que cinco especies usadas para tratar edemas, gonorrea, migraña y verrugas, tienen un registro oficial de su uso en la farmacopea china: *E. pekinensis*, *E. kansui*, *E. lathyris*, *E. humifusa*, y *E. maculata*.⁸

En México se sabe del uso medicinal tradicional de algunas especies del género *Euphorbia*, como es el caso de *E. hirta*, *E. macropus*, *E. pulcherrima*, *E. prostrata* y *E. umbellulata* en el estado de Morelos.⁶ El libro “Plantas Medicinales del Herbario IMSS” incluye además otras doce especies de *Euphorbia*: *E. angusta*, *E. anychioides*, *E. dentata*, *E. furcillata*, *E. heterophylla*, *E. lathyris*, *E. laticifolia*, *E. leucocephala*, *E. maculata*, *E. pulcherrima*, *E. schlechtendalii*, *E. serpens* y *E. thymifolia*.⁹ Esta información muestra la importancia de este grupo de plantas en la medicina tradicional.

Aun con el aprecio que tienen estas especies por su uso tradicional, es pertinente subrayar que varias carecen de estudios químicos. Para el caso de *E. hirta* existen estudios que corroboran su actividad antibiótica y antiinflamatoria.¹⁰

2.3 Compuestos aislados de plantas del género *Euphorbia*

Se han realizado varios estudios de los constituyentes químicos a plantas del género *Euphorbia*, lo que ha llevado al descubrimiento de numerosos compuestos. Estos pueden agruparse en sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos y flavonoides, entre otros.

En el caso de los sesquiterpenoides, se han aislado el eufanginol (**1**), ciclocariofila-4-en-8-ol (**2**), 4 β ,5 α -epoxy-4,5-dihidrocariofilen-14-ol (**3**) y clovandiol (**4**) de *E. wangii*.¹¹ Mientras que de *E. resinifera* se aislaron los sesquiterpenoides euforbiósidos A (**5**) y B (**6**).¹² La **Figura 1** muestra la estructura molecular de los compuestos **1** – **6**.

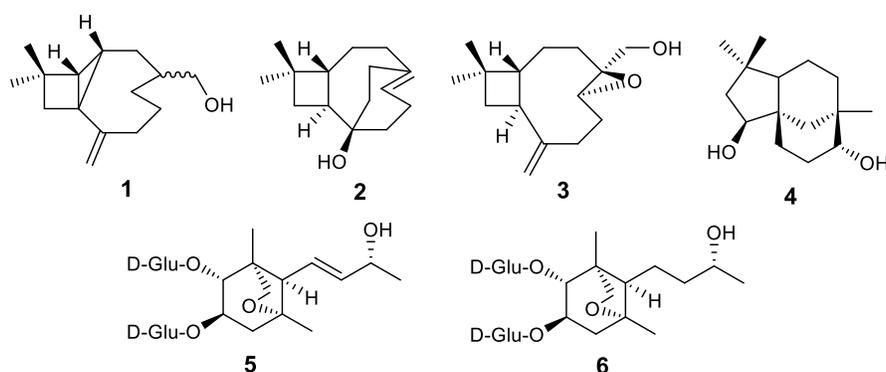


Figura 1. Sesquiterpenoides aislados de *E. wangii* y *E. resinifera*.

Los diterpenos son los compuestos que han sido aislados con mayor frecuencia de especies del género *Euphorbia*. Hasta 2008 habían sido aislados más de 650 diterpenoides de plantas de este grupo.¹³ En el periodo de 2008 a 2012 fueron aislados más de 200 nuevos diterpenoides de estas plantas.¹⁴ Entre los esqueletos de diterpenos aislados de *Euphorbia* se encuentran los de rosano, abietano, atisano, kaurano, casbano, jatrofano, latirano, mirsinano, premirsinano, ciclomirsinano, pepluano, dafnano, ligliano, ingenano (**Figura 2**).

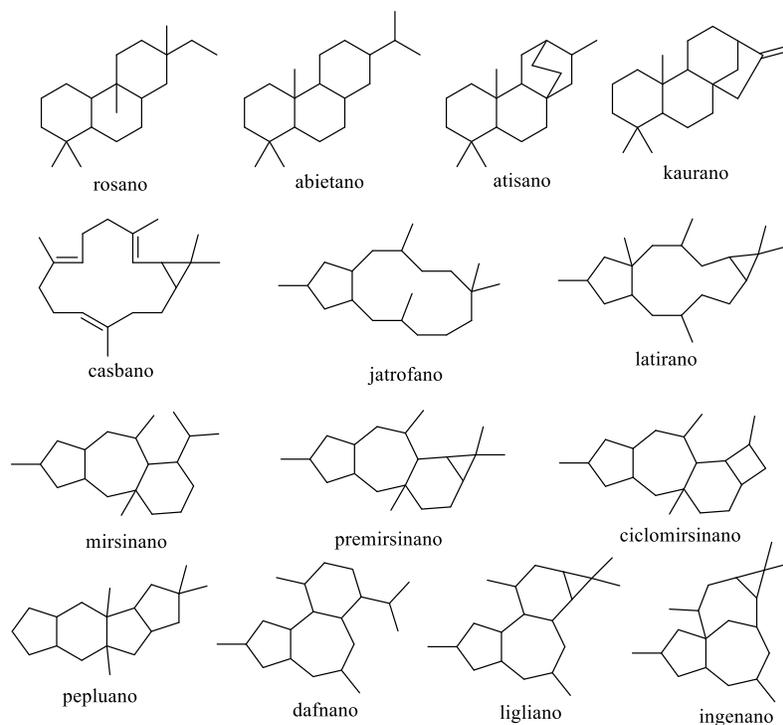


Figura 2. Tipos de esqueletos diterpénicos aislados de plantas del género *Euphorbia*.

La **Tabla 1** es una adaptación de la publicada por Vasas y colaboradores¹⁴, la cual resume algunas especies de *Euphorbia* a partir de las cuales se han aislado distintos esqueletos diterpénicos.

Tabla 1. Esqueletos diterpénicos aislados de distintas especies del género *Euphorbia*.

Tipo de esqueleto	Especies
Rosano	<i>E. ebracteolata</i>
ent-abietano	<i>E. fischeriana</i> <i>E. formosana</i> <i>E. guyoniana</i> <i>E. nerifolia</i> <i>E. retusa</i>
ent-kaurano	<i>E. fisheriana</i> <i>E. hirta</i> <i>E. nerifolia</i>
casbano	<i>E. pekinensis</i>
jatrofano	<i>E. bungei</i> <i>E. dendroides</i> <i>E. esula</i> <i>E. guyoniana</i>

	<i>E. helioscopia</i>
	<i>E. kansui</i>
	<i>E. peplus</i>
	<i>E. sororia</i>
	<i>E. tuckeyana</i>
latirano	<i>E. aellenii</i>
	<i>E. bungei</i>
	<i>E. helioscopia</i>
	<i>E. kansuensis</i>
	<i>E. lactea</i>
	<i>E. lagascae</i>
	<i>E. lathyris</i>
	<i>E. laurifolia</i>
	<i>E. micractina</i>
	<i>E. nerifolia</i>
	<i>E. prolifera</i>
	<i>E. royleana</i>
mirsinano	<i>E. aellenii</i>
	<i>E. falcata</i>
	<i>E. macroclada</i>
	<i>E. prolifera</i>
tigliano	<i>E. aellenii</i>
	<i>E. cornigera</i>
	<i>E. fischeriana</i>
	<i>E. grandicornis</i>
	<i>E. macroclada</i>
ingenano	<i>E. caducifolia</i>
	<i>E. cornigera</i>
	<i>E. esula</i>
	<i>E. kansui</i>
	<i>E. laurifolia</i>
	<i>E. splendida</i>

Entre los diterpenos aislados de euforbias puede destacarse el mebutato de ingenilo (**7**), aislado de *E. peplus*. Este compuesto fue aprobado en el 2012 por la oficina de Administración de Alimentos y Drogas (FDA, por sus siglas en inglés) como tratamiento para la queratosis actínica. De igual forma puede destacarse el compuesto resiniferatoxina (**8**), aislado de *E. resinifera*, que tiene potencial como analgésico de larga duración y actualmente se encuentra en fases II y III de pruebas clínicas.¹⁵ De *E. terracina* han sido aislados siete nuevos diterpenos: las terracinólidas A – G.^{16,17} En la **Figura 3**.se muestran las estructuras moleculares de los compuestos **7** y **8**, y de la terracinólida A (**9**).

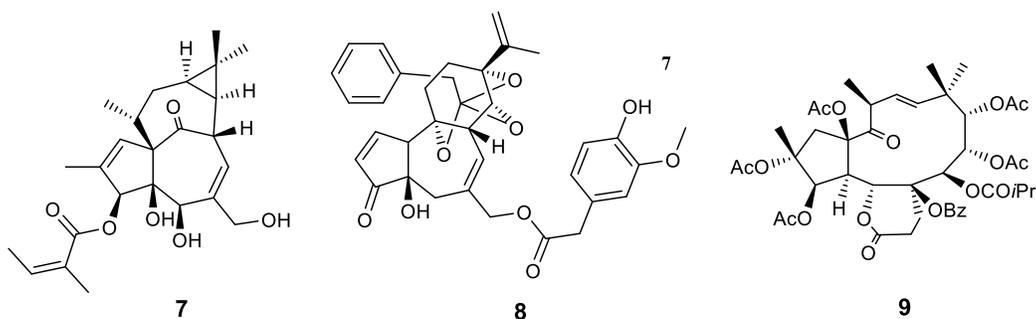


Figura 3. Estructuras moleculares de mebutato de ingenilo (7), resiniferatoxina (8) y tetracínólida A (9).

2.4 Triterpenoides aislados del género *Euphorbia*

Se han aislado triterpenoides tetracíclicos y pentacíclicos de plantas de este género. Entre los triterpenoides más destacados se encuentran el antiquol B (10) aislado de *E. antiquorum*, compuesto con un esqueleto poco usual de *abeo*-eufano, en el cual el metilo que en el esqueleto de eufano se encuentra en posición 10, se ubica en la posición 9.¹⁸

Cabe mencionar también los derivados tipo *nor* de triterpenos, reportados por primera vez en este género aislados de *E. portlandica* como son 27-*nor*-3 β -hidroxicicloartan-25-ona (11), (22*E*)-25,26,27-*trisor*-3 β -hidroxicicloartan-22-en-24-al (12) y 25,26,27-*trisor*-3 β -hidroxicicloartan-24-al (13)¹⁹ (ver **Figura 4**).

El extracto hexánico de *E. hirta* posee actividad antiinflamatoria y de él han sido aislados los compuestos β -amirina (14), β -sitosterol (15) y 24-metilencicloartenol (16), cuya estructura se aprecia en la **Figura 5**. Estos compuestos poseen actividad antiinflamatoria significativa.¹⁰

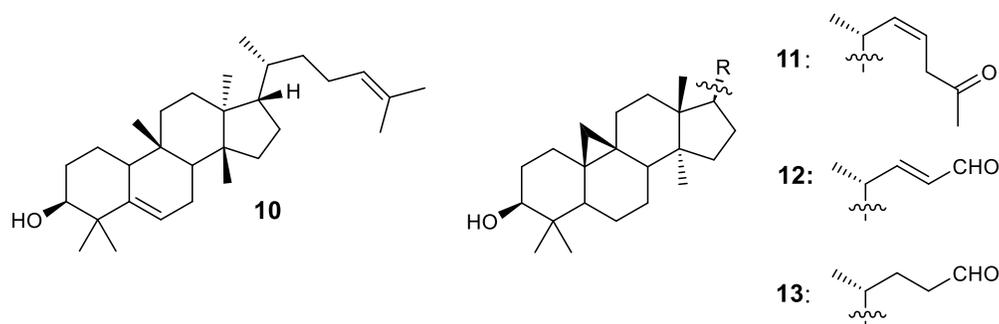


Figura 4. Estructura molecular de los compuestos antiquol B (10), 27-*nor*-3 β -hidroxicicloartan-25-ona (11), (22*E*)-25,26,27-*trisor*-3 β -hidroxicicloartan-22-en-24-al (12) y 25,26,27-*trisor*-3 β -hidroxicicloartan-24-al (13).

Del látex de *E. esula* y *E. uralensis* se determinó por cromatografía de gas-líquido (CGL) la presencia de los triterpenoides 24-metilencicloartenol (**16**), cicloartenol (**17**) y eufol (**18**) (**Figura 5**), además de otros cuatro triterpenoides no identificados. Cabe mencionar que la CGL permitió determinar que el perfil cromatográfico era invariable para una especie determinada aun con muestras de distintas poblaciones que crecieron bajo condiciones distintas, lo que permitió determinar la utilidad taxonómica del perfil cromatográfico del látex.⁷

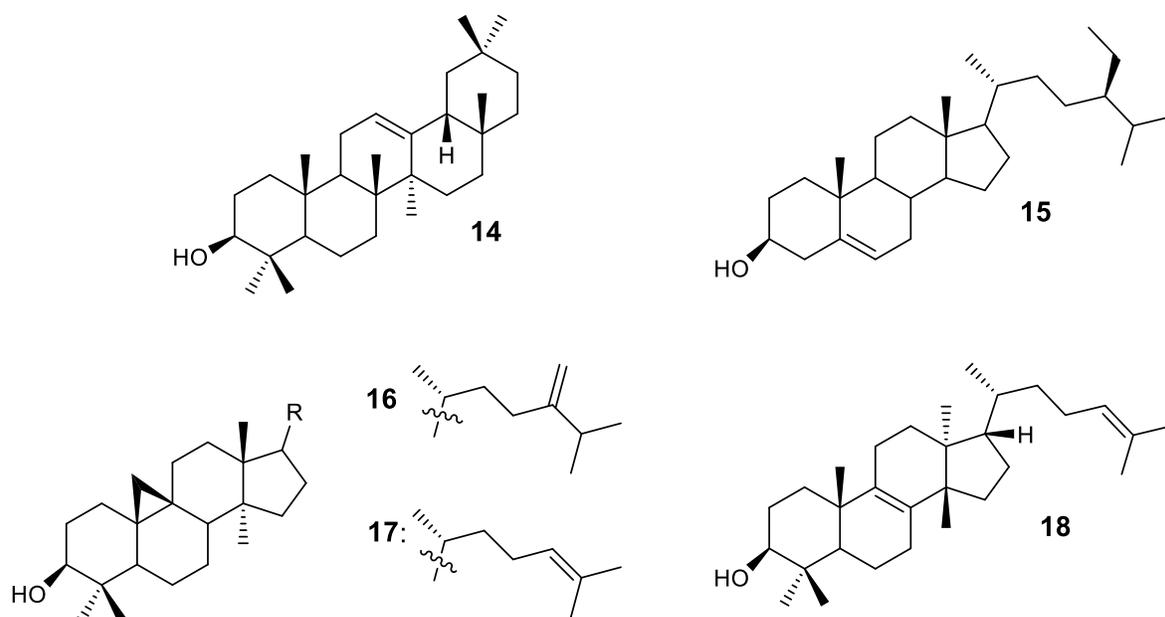


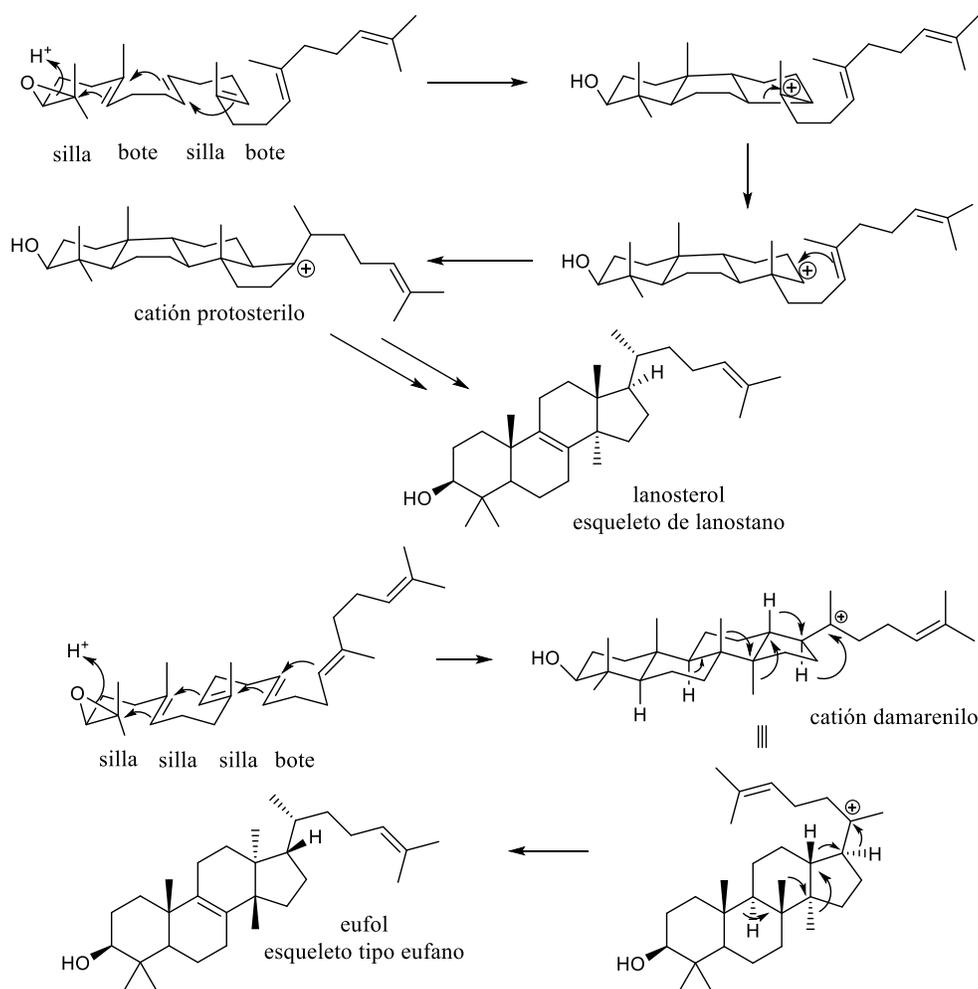
Figura 5. Estructuras moleculares de los compuestos β-amirina (**14**), β-sitosterol (**15**), 24-metilencicloartenol (**16**), cicloartenol (**17**), y eufol (**18**).

En particular, el compuesto **16** es un triterpenoide presente en varias plantas de este género, pues además de *E. esula*, *E. hirta* y *E. uralensis*, ha sido aislado de *E. clementei*²⁰, *E. peplus*²¹, *E. myrsinites*²², *E. aleppica*²³, *E. portlandica*¹⁹, *E. segetalis*²⁴ y *E. pubescens*²⁵.

2.5 Esquema biosintético de los triterpenoides aislados de *Euphorbia*

Los triterpenos con esqueleto de eufano fueron aislados inicialmente de plantas del género *Euphorbia*, de donde proviene el nombre de dicho esqueleto. La biosíntesis del eufol es similar a la del lanosterol, a partir de óxido de escualeno. La diferencia se encuentra en el

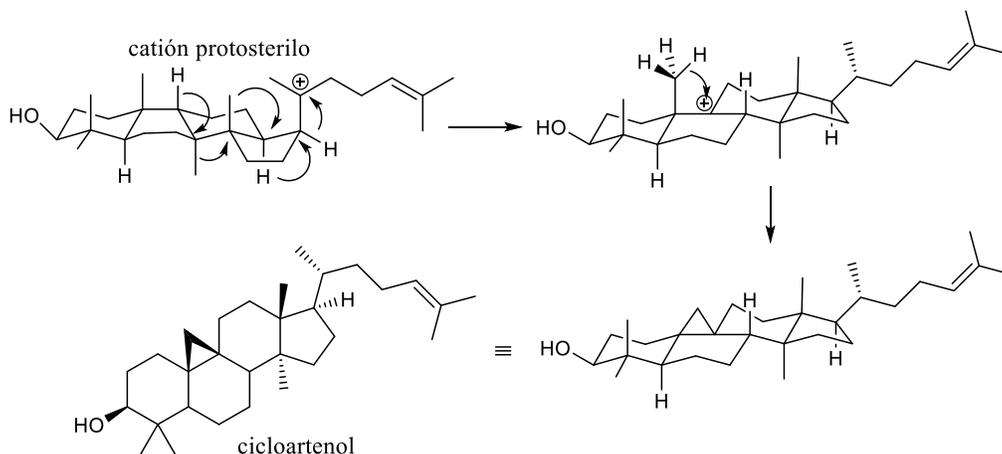
tipo de plegamiento que toma el óxido de escualeno favorecido por diferentes ciclasas: mientras que en la biosíntesis del esqueleto de lanostano el óxido de escualeno toma una conformación de tipo silla-bote-silla-bote, en la biosíntesis del esqueleto de tipo eufano la conformación adoptada es silla-silla-silla-bote. Esta ciclización conduce en el caso del lanostano a la formación del catión protosterilo, mientras que para el eufano al catión damarenilo. El catión damarenilo sufre una secuencia de migraciones de hidrógeno y de metilos que llevan finalmente a la pérdida del protón en la posición 9 para formar la olefina tetrasustituida del esqueleto de eufano (**Esquema 1**). Resulta evidente que el eufol es un diastereómero del lanosterol.



Esquema 1. Biosíntesis de lanosterol y eufol a partir de óxido de escualeno.

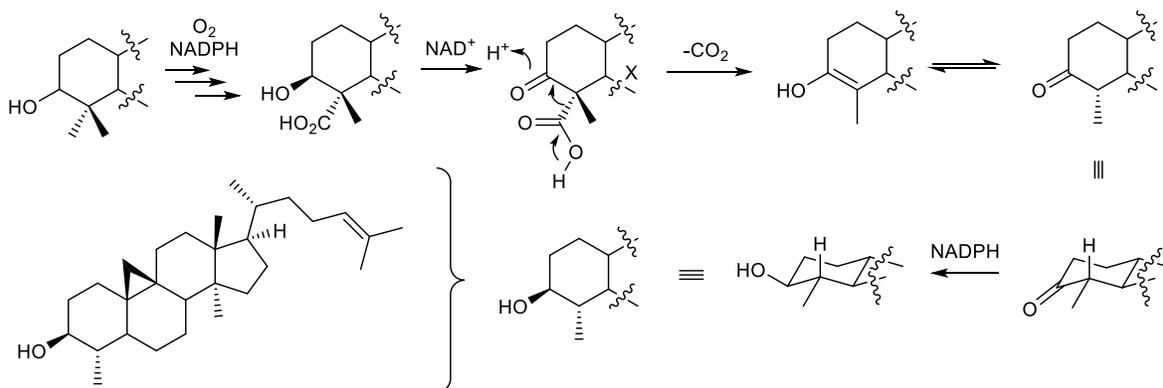
En las plantas, el cicloartenol es el intermediario biosintético del colesterol y otros esteroides. La biosíntesis del cicloartenol es idéntica a la del lanosterol con el catión protosterilo como

intermediario, difiriendo en que en el cicloartenol no hay pérdida del hidrógeno H-9, sino que hay formación de un anillo de ciclopropilo generado por pérdida de hidrógeno y ataque del metilo 19 al carbocatión formado en 9 por migración de hidrógeno (**Esquema 2**).



Esquema 2. Biosíntesis de cicloartenol desde el catión protosterilo.

Por ejemplo, la biosíntesis del cicloeucalenol, esteroide aislado de *E. clementei*, involucra la pérdida de un metilo en C-4 del esqueleto de cicloartano, así como la adición del metileno vinílico en C-24, como se ilustra en el siguiente esquema biosintético:

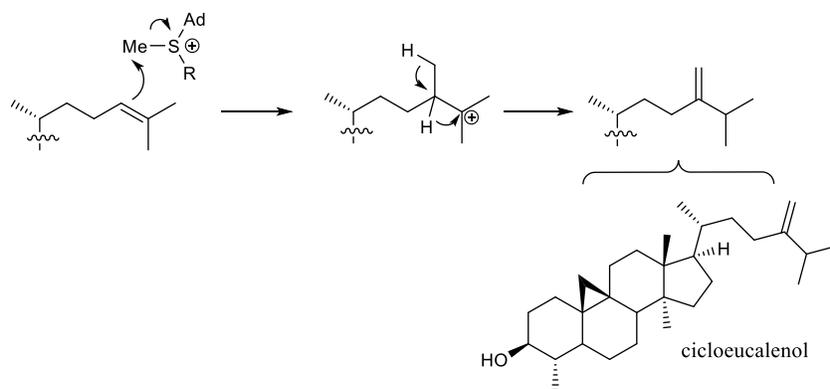


Esquema 3. Pérdida de uno de los metilos en C-4 para generar el esqueleto de cicloartano.

La literatura reporta que es el metilo con orientación alfa el que sufre una oxidación hasta ácido carboxílico, posteriormente el hidroxilo de la posición 3 es oxidado a la cetona correspondiente formándose así un β -cetoácido que permite la descarboxilación, perdiéndose de esta forma el metilo. El enol que se genera en este proceso se equilibra por tautomería

ceto-enólica dejando al metilo (que inicialmente estaba en orientación beta), en la orientación alfa (más estable, **Esquema 3**). La cetona es reducida al alcohol, y es sabido que este proceso está mediado por el complejo enzimático esterol 4 α -metil oxidasa.

La introducción del metileno vinílico de la posición 24 de la cadena lateral está mediada por las transformaciones biosintéticas que se muestran en el **Esquema 4**.



Esquema 4. Introducción del metileno vinílico en la posición 24 en la biosíntesis de cicloeucaleanol.

La olefina trisustituida de la cadena lateral es metilada por *S*-adenosil metionina (SAM) en la posición 24 formando un carbocatión terciario en la posición 25, lo que facilita una migración de hidrógeno de 24 a 25 y una subsecuente pérdida de hidrógeno que finalmente genera al cicloeucaleanol con el metileno vinílico en 24 (**Esquema 4**).

2.6 *Euphorbia tanquahuete*

Euphorbia tanquahuete Sessé & Moc., es el nombre científico aceptado para la planta conocida comúnmente como pegahueso, palo amarillo, palo de oro, etc. Es una especie



endémica de México perteneciente a la familia de las euforbiáceas. Otros sinónimos son *E. elastica* Altam. & Rose; *E. fulva* Stapf; *Euphorbiodendron fulvum* (Stapf) Millsp.²⁶ Es un árbol distribuido hacia la zona centro-sur del país, con reportes de su presencia en Estado

de México, Guanajuato, Guerrero^{27,28}, Jalisco, Michoacán, Morelos⁶, Oaxaca²⁹, Puebla, Querétaro y Zacatecas.



Se ha reportado que el látex que produce esta especie se emplea en la medicina tradicional principalmente en el tratamiento de fracturas óseas.^{6,27,30} También se reporta su uso para tratar “fríos” y torceduras. En el estado de Guerrero se sabe que las parteras utilizan el látex de esta planta para “sacar el frío de la cadera” después del parto.²⁸ Un estudio preliminar del látex de *E. tanquahuete* reporta al β -sitosterol y lupeol como constituyentes químicos de este material.³⁰ No existen reportes de estudios químicos de otras partes de esta especie.

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

3.1 Justificación

Euphorbia tanquahuete es empleada tradicionalmente en algunas entidades mexicanas para el tratamiento de fracturas óseas. El uso medicinal que se le atribuye a esta planta justifica su estudio químico, con el fin de aislar y caracterizar estructuralmente a los metabolitos secundarios. Una vez determinada la estructura molecular, es posible evaluar ciertas propiedades biológicas (por ejemplo, anti-inflamatoria o analgésica) que eventualmente puedan correlacionarse con el uso tradicional.

A la fecha solo existe un estudio preliminar de *E. tanquahuete*, que está limitado al látex que produce esta planta y en el cual solo fueron aislados dos compuestos, lupeol y β -sitosterol. Esto justifica la realización de estudios adicionales de otras partes de la planta, como partes aéreas (hojas y ramas), con el fin de conocer la estructura molecular de los constituyentes químicos presentes.

Por otro lado, el estudio de este vegetal tiene interés desde el punto de vista quimiotaxonómico, puesto que los antecedentes que existen para las plantas pertenecientes a la familia Euphorbiaceae, y específicamente del género *Euphorbia*, muestran que las plantas de este género tienen una amplia diversidad de compuestos que pueden ayudar a la clasificación taxonómica.

3.2 Objetivos generales

- Realizar el estudio químico de las partes aéreas de la especie *Euphorbia tanquahuete*.
- Generar conocimiento científico acerca de los constituyentes químicos presentes en esta planta.

3.3 Objetivos específicos

- Aislar los constituyentes químicos presentes en la especie *Euphorbia tanquahuete*.
- Compilar la información química y biológica de esta especie en particular y de especies del género *Euphorbia*.
- Caracterizar los compuestos aislados mediante el análisis de los datos obtenidos mediante técnicas espectrométricas y espectroscópicas, y sus propiedades físicas.

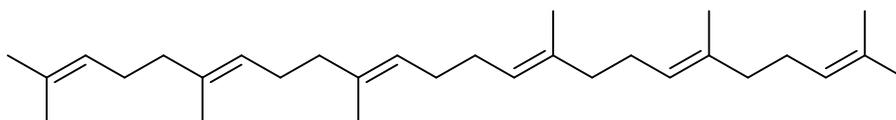
- Evaluar preliminarmente algunas propiedades biológicas de las sustancias puras y de los extractos, en particular, la actividad citotóxica y antiinflamatoria.
- Contextualizar los resultados obtenidos en el ámbito de la investigación en productos naturales.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Compuestos aislados

Se aislaron ocho compuestos químicos del extracto de hojas de *E. tanquahuete*. Mediante el análisis de sus datos físicos, espectroscópicos y espectrométricos estos se identificaron, en orden de polaridad creciente, como escualeno (**19**), 1-octacosanol (**20**), eufol (**18**), lupeol (**21**), cicloeucalenol (**22**), 25,26,27-trisnor-3 β -hidroxieufan-24-al (**23**), eufa-8,23-dien-3,25-diol (**24**) y β -sitosterol (**15**). A continuación se describirá su determinación estructural, indicando la fracción a partir de la cual fueron aislados.

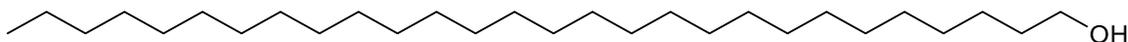
Escualeno (**19**)



En las fracciones de menor polaridad del extracto (fracción B) se detectó la presencia de una mancha homogénea en CCF. La aplicación de los procedimientos descritos en la parte experimental llevó al aislamiento del compuesto **19**, de acuerdo a las evidencias que se describen a continuación. El espectro de RMN de ^1H (**Figura 11**, Anexo) presentó un multiplete ancho en δ_{H} 5.11, que puede atribuirse a hidrógenos vinílicos. Presentó también un multiplete ancho en δ_{H} 2.04, atribuible a metilenos. En δ_{H} 1.68 se observó un singulete atribuible a metilos vinílicos. En δ_{H} 1.60 se observó otro singulete también atribuible a metilos vinílicos. La integración de estas cuatro señales mostró que tenían intensidades relativas de 1, 3.33, 1 y 3, respectivamente. El espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 12**, Anexo) presentó 15 señales, un número de átomos de carbono múltiplo de 5 sugiere que el compuesto es un terpenoide. Seis de las 15 señales están en la región de carbonos sp^2 (δ_{C} 135.25, 135.04, 131.38, 124.57, 124.46, 124.43) lo que indicaba la presencia de al menos tres enlaces dobles, y sugiere que el multiplete en δ_{H} 5.11 del espectro de ^1H corresponde a por lo menos tres hidrógenos vinílicos con mismo desplazamiento químico, esto concordaba con la relación de intensidad 1:1 entre esta señal y la de δ_{H} 1.68, atribuible a metilo. Esto llevó a asignar nuevas intensidades relativas de 3, 9.99, 3, y 9, respectivamente. Estas intensidades relativas sugerían la presencia de 25 hidrógenos en la estructura molecular del compuesto, atribuibles

a tres hidrógenos vinílicos (δ_H 5.11), cinco metilenos (δ_H 2.04), un metilo (δ_H 1.68) y tres metilos con mismo desplazamiento (δ_H 1.60). Esto sugería que el compuesto era una poliolefina de 15 carbonos con varios metilos, sin embargo, el hecho de que tres hidrógenos vinílicos tuvieran mismo desplazamiento químico, así como que tres metilos tuvieran también mismo desplazamiento químico, solo puede ser explicado con una molécula que tenga simetría estructural. Adicionalmente, ninguna estructura con 15 átomos de carbono puede poseer simultáneamente los tres enlaces dobles que sugiere el espectro de ^{13}C , cinco metilenos y únicamente cuatro metilos manteniendo simetría estructural. Se pensó en la posibilidad de que las 15 señales en el espectro de ^{13}C se debían a 30 átomos de carbono distribuidos en una molécula simétrica, lo que implica multiplicar por dos las intensidades relativas, quedando en 6, 20, 6 y 18, atribuibles respectivamente a 6 hidrógenos vinílicos, 10 metilenos, 2 metilos con mismo desplazamiento, y 6 metilos con mismo desplazamiento. El compuesto químico que posee estas características es el escualeno, un triterpenoide acíclico cuyo número de metilos, metilenos y enlaces dobles es concordante con los datos que muestran los espectros de RMN 1H . Se corroboró la estructura propuesta para **19** por comparación de los datos obtenidos con los datos espectroscópicos reportados para el escualeno.³¹ Dado que esta sustancia es el precursor biogenético de los triterpenos, este hallazgo sugirió la presencia de triterpenoides como metabolitos secundarios de esta especie vegetal.

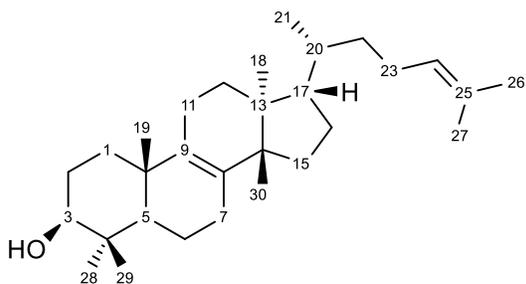
1-Octacosanol (**20**)



Al tener la fracción H disuelta en mezcla de hexano/AcOEt, se observó la precipitación de un sólido incoloro que fue aislado por recristalizaciones sucesivas con mezcla de estos mismos disolventes. En el espectro de RMN de 1H de este compuesto (**Figura 13**, Anexo) se observó un triplete en δ_H 3.63 característico de un metileno unido a oxígeno, un multiplete en δ_H 1.56, atribuible a metilenos. Se observó también un singulete ancho y muy intenso en δ_H 1.26, que podía atribuirse a múltiples metilenos con mismo desplazamiento químico, lo que indicaba que el compuesto poseía una cadena alifática larga. En δ_H 0.88 se observó otro triplete que podía ser asignado a un metilo unido a metileno. Con base en esto, a la integral de la señal en δ_H 0.88 se le asignó una intensidad relativa de 3, lo que dejó las intensidades

relativas de los desplazamientos δ_H 3.63, 1.56 y 1.26 en 2, 3 y 50, respectivamente. El espectro de IR mostró la señal característica de un grupo hidroxilo en 3263 cm^{-1} . Estos datos sugieren que el compuesto **20** es un alcohol lipídico, presumiblemente el 1-octacosanol ($\text{C}_{28}\text{H}_{58}\text{O}$) con base en el número de hidrógenos observados en el espectro, principalmente por los 50 hidrógenos de 25 metilenos en δ_H 1.26. El espectro de RMN ^{13}C (**Figura 14**, Anexo) mostró señales en δ_C 14.03, 22.68, 25.80, 29.35, 29.46, 29.63, una señal muy intensa en δ_C 29.70 de los 25 metilenos, y otra señal para el carbono base de oxígeno en δ_C 63.12. El espectro de masas mostró los iones en m/z 409 [$\text{M}^+ - \text{H}$] y 392 [$\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$] que son consistentes con la masa del 1-octacosanol (410 g mol^{-1}).

Eufol (**18**)



El análisis por CCF de la fracción H indicó la presencia de un compuesto aislable que se reconocía como una mancha naranja al revelar con solución de sulfato cérico amoniacal. Se procedió a realizar un fraccionamiento secundario de esta muestra, lo que llevó al aislamiento de un compuesto cuyo análisis espectroscópico corresponde a la estructura **18** como se discute a continuación. La espectroscopía de IR mostró la señal ancha característica de un estiramiento O-H de alcohol en 3312 cm^{-1} . La RMN de ^1H (**Figura 15**, Anexo) muestra el perfil de un triterpenoide, ya que la mayor parte de las señales se encuentran a campo alto. En particular, fueron identificables la presencia de 8 señales intensas en δ_H 0.75, 0.80, 0.85, 0.87, 0.95, 1.00, 1.60 y 1.68 asignables a 8 metilos; un doble de dobles de oximetino en δ_H 3.24; y un triplete de hidrógeno vinílico en δ_H 5.09.

Efectivamente, el espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 16**, Anexo) confirmó que se trataba de un triterpeno al presentar 30 señales, confirmando también la presencia de un carbono unido a oxígeno (δ_C 79.00) y revelando la presencia de cuatro carbonos con hibridación sp^2 (δ_C 134.01, 133.54, 130.86 y 125.20) que pueden atribuirse a dos enlaces dobles.

Los experimentos de RMN DEPT-90 y DEPT-135 (**Figura 17**, Anexo) corroboran la existencia de los 8 metilos evidenciados en el espectro de RMN de ^1H , y revelan la presencia de 10 metilenos, 5 metinos y 7 carbonos cuaternarios, a partir de lo cual se deduce la fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$. Adicionalmente, estos experimentos determinaron que uno de los enlaces dobles es tetrasustituido, mientras que el otro es trisustituido, lo que es concordante con la presencia de solo un hidrógeno vinílico en el espectro de RMN de ^1H .

El experimento HSQC (**Figura 18**, Anexo) permitió relacionar las señales de metilo, la del metino de la posición 3, y la del hidrógeno vinílico del espectro de RMN de ^1H con sus señales correspondientes en el espectro de RMN de ^{13}C .

Por otra parte, el espectro de HMBC (**Figura 19**, Anexo) permitió identificar la correlación entre el metino de la posición 3 con los dos metilos de la posición 4 soportados sobre un carbono cuaternario. Esta evidencia concuerda con la presencia del anillo A de un triterpeno. Por otra parte, se observó la correlación de los dos metilos de la posición 4 con el metino de la posición 5 que tendría un triterpeno, y a su vez la correlación de este metino con un metilo sobre carbono cuaternario, atribuible a un metilo en la posición 19, característico también de triterpenos. Además, la correlación de este metilo de la posición 19 con un carbono disustituido de olefina ($\delta_{\text{C}} 134.03$) es evidencia de que uno de los enlaces dobles se encuentra en el anillo B. Por otro lado, se observó la correlación de los singuletes de metilos en $\delta_{\text{H}} 1.68$ y 1.60 con dos carbonos olefínicos en $\delta_{\text{C}} 130.86$ y 125.20 , este último soportando al único hidrógeno vinílico que aparece como triplete en $\delta_{\text{H}} 5.09$ en el espectro de RMN de ^1H , lo que sugiere que ambos metilos son geminales sobre el carbono de $\delta_{\text{C}} 130.86$. Estas correlaciones determinaron por eliminación que el carbono sp^2 restante con desplazamiento en $\delta_{\text{C}} 133.54$, es el que forma el enlace doble en el anillo B con el carbono de desplazamiento en $\delta_{\text{C}} 134.03$ y que este enlace es endocíclico. Por otra parte, dos metilos con desplazamientos en $\delta_{\text{H}} 0.75$ y 0.88 correlacionan con los mismos dos carbonos cuaternarios, lo que sugiere que los carbonos cuaternarios que los soportan están separados por un enlace. Estas características son las de los metilos de las posiciones 13 y 14 en las se fusionan los anillos C y D en un triterpeno tetracíclico. Adicionalmente, únicamente el metilo de $\delta_{\text{H}} 0.88$ correlaciona con el carbono olefínico de $\delta_{\text{C}} 133.54$, lo que apoya la hipótesis de que este metilo se encuentra en la fusión de los anillos C y D, cerca del enlace doble endocíclico del anillo B. Estas correlaciones se representan de forma gráfica en la **Figura 6**. Las evidencias son consistentes

con el triterpeno tetracíclico denominado eufol. La espectrometría de masas de impacto electrónico confirmó la fórmula $C_{30}H_{50}O$ al mostrar el ion molecular en m/z 426. Los triterpenos con esqueleto de eufano como el eufol, son comunes en plantas del género *Euphorbia*, y la comparación de los datos obtenidos con datos espectroscópicos reportados para el eufol confirman que se trata del mismo compuesto.^{32,33} La espectrometría de masas de impacto electrónico confirmó la fórmula $C_{30}H_{50}O$ al mostrar el ion molecular en m/z 426.

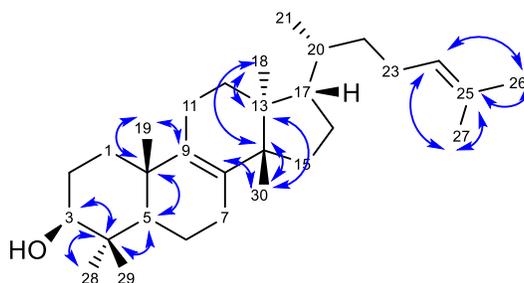
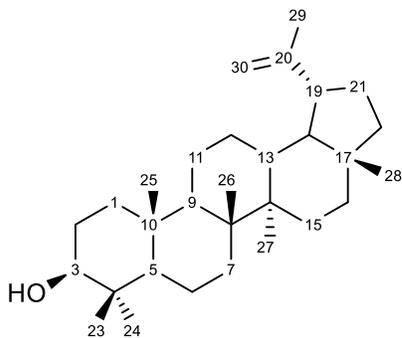


Figura 6. Correlaciones en el HMBC del eufol.

Lupeol (21)

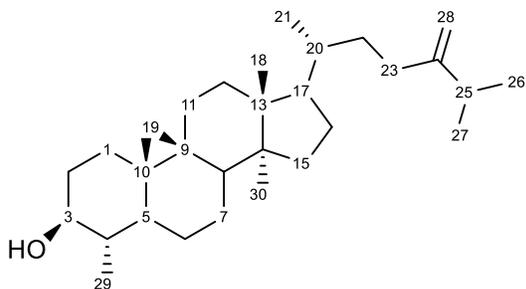


Durante el fraccionamiento secundario de la fracción H, se detectó otro compuesto con R_f muy similar al del eufol. Esto se notó en primera instancia debido al color distinto que adquirirían las manchas traslapadas en CCF después de unos minutos de revelar con solución de sulfato cérico amoniacal. Tanto el compuesto **18** (eufol) como el compuesto **21** (lupeol) revelan de color naranja inicialmente. Al transcurrir unos minutos la parte de la mancha correspondiente a **18** se torna gris/café, mientras que la del compuesto **21** adquiere una coloración rosa/morado intenso. El análisis del espectro de RMN 1H corroboró la presencia de una mezcla **18/21** en una proporción aproximada de 3:1. Mediante cromatoplaaca analítica semipreparativa (eluida 4 veces con mezcla hexano/AcOEt 9:1) se logró el aislamiento del

compuesto **21** en cantidad apropiada para obtener su espectro de RMN ^1H . Este espectro tenía el perfil característico de un triterpeno con varias señales en campo alto (**Figura 20**, Anexo). Destacaron dos señales en la región de hidrógenos vinílicos en δ_{H} 4.69 y 4.57 cuyas intensidades relativas guardaban una relación 1:1. La diferencia en Hz entre ambas señales es demasiado grande (36 Hz) como para ser la constante de acoplamiento de un doblete, por lo que se consideraron como dos singuletes atribuibles a un hidrógeno cada uno. En δ_{H} 3.19 se observó un doble de dobles, cuya intensidad relativa también guardaba una relación 1:1 con los singuletes mencionados antes, por lo que es atribuible al oximetino de la posición 3 característico de un triterpeno. En δ_{H} 2.38 se observó un doble de triple cuya intensidad relativa también guardaba una relación 1:1 con los singuletes vinílicos. Se observaron 5 singuletes intensos atribuibles a metilos debido a que guardaban una relación 1:3 con los singuletes de la región de vinílicos, además de un singulete muy intenso en δ_{H} 0.97 que guardaba una relación 1:6 con los singuletes vinílicos, por lo que es atribuible a dos metilos con mismo desplazamiento químico.

El espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 21**, Anexo) mostró 29 señales (dos señales traslapadas), lo que apoyaba la hipótesis de que el compuesto **21** es un triterpeno. Adicionalmente, el espectro de RMN de ^{13}C reveló la presencia de solo un enlace doble por los desplazamientos en δ_{C} 150.96 y 109.31. Estos datos espectroscópicos son característicos del lupeol, en particular los singuletes en δ_{H} 4.69 y 4.57, el triple de dobles en δ_{H} 2.38, los desplazamientos de los metilos, y las dos señales de carbono sp^2 con desplazamientos en δ_{C} 150.96 y 109.31 en el espectro de ^{13}C . La comparación de estos datos espectroscópicos con los reportados en la literatura y los disponibles en el grupo de trabajo a partir de una muestra auténtica, corroboraron que el compuesto **21** es lupeol.

Cicloeucaleanol (**22**)



La continuación del fraccionamiento secundario de la fracción H hizo posible la obtención de fracciones cuyo análisis por CCF permitió la detección de otro compuesto con un Rf ligeramente menor al de **18** y **21** (ver la parte experimental). Este fue aislado mediante cromatoplaaca analítica semipreparativa. El espectro de RMN ^1H (**Figura 22**, Anexo) mostró el perfil característico de un triterpeno con casi todas las señales en campo alto. Destacaron en primera instancia dos señales en la región de vinílicos (δ_{H} 4.72 y 4.67), la diferencia en los desplazamientos químicos, y sus intensidades relativas sugerían que la estructura poseía dos enlaces dobles trisustituídos, o bien una olefina terminal. Se observaron dos dobletes en δ_{H} 0.39 y 0.14, cuyas intensidades relativas guardan una relación 1:1 entre ellos y con los singuletes de la región de vinílicos. Estos dobletes con desplazamientos químicos a campo alto son característicos de los hidrógenos de un metileno de ciclopropilo. En δ_{H} 3.21 se observó un multiplete asignable a un oximetino característico de la posición 3 de triterpenos, esta señal también guardaba en su intensidad relativa una proporción 1:1 con las señales descritas hasta ahora. Se observó la presencia de 6 señales (δ_{H} 0.89, 0.90, 0.97, 0.98, 1.02 y 1.03) asignables a metilos puesto que cada uno guardaba relación 1:3 con las señales anteriormente descritas. Cuatro de estas señales eran dobletes. Un heptuplete en δ_{H} 2.24 que guarda una relación de intensidad relativa 1:1 con los singuletes vinílicos, y es asignable al metino de un grupo isopropilo, lo que sugiere la presencia de este grupo en la estructura molecular del compuesto.

El análisis del espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 23**, Anexo) mostró 30 señales, lo que apoyaba la hipótesis de que el compuesto **22** es un triterpenoide. Además, el espectro de RMN de ^{13}C determinó la presencia de únicamente un doble enlace en la estructura molecular, puesto que solo hay dos carbonos en la región sp^2 (δ_{C} 157.08 y 106.08). Los experimentos DEPT-90 y DEPT-135 (**Figura 24**, Anexo) corroboraron la presencia de 6 metilos, además de mostrar que la estructura tenía 12 metilenos (uno de ellos vinílico en δ_{C} 106.08), 7 metinos y 5 carbonos cuaternarios. Estas asignaciones concordaban con la estructura molecular de un triterpeno tetracíclico.

El espectro HSQC (**Figura 25**, Anexo) permitió correlacionar los dos singuletes de δ_{H} 4.72 y 4.67 únicamente con el carbono de δ_{C} 106.08, lo que confirmaba que estos singuletes correspondían a dos hidrógenos geminales en una olefina terminal. También se correlacionó al metino de δ_{H} 3.21 con el carbono unido a oxígeno en δ_{C} 76.74. Los metilos se

correlacionaron con sus átomos de carbono correspondientes y se correlacionó el heptuplete de δ_H 2.24 con el metino en δ_C 33.98. Se determinó que los dobletes en δ_H 0.39 y 0.14 están en el mismo metileno con desplazamiento en δ_C 27.40, que fue asignado al metileno de ciclopropilo.

El espectro de HMBC (**Figura 26**, Anexo) permitió determinar la correlación entre el metino de la posición 3 con solo un metilo que aparece como doblete en δ_H 0.98, por lo que se deduce que está soportado sobre un metino en la posición 4. Esto establecía que el anillo A del triterpenoide únicamente tenía un metilo en dicha posición. El metino y metilo de la posición 4 correlacionaron con un metino atribuible al de la posición 5. Este último metino a la vez mantiene correlación con un carbono cuaternario que es atribuible al carbono de la posición 10, puesto que este correlaciona también con los hidrógenos del metileno de ciclopropilo visto en el espectro de RMN de 1H . Esta información indica la presencia del grupo ciclopropilo en el anillo B. Por otro lado, los dos metilos con singuletes en δ_H 0.97 y 0.90 correlacionan con los mismos dos carbonos cuaternarios (δ_C 49.07 y 45.52), por lo que son asignables a las posiciones 13 y 14 del esqueleto de cicloartano. Dos de los metilos que aparecen como dobletes en δ_H 1.02 y 1.03, tienen las mismas correlaciones, específicamente, correlacionan con el carbono sp^2 cuaternario (δ_C 157.08), y con un carbono en δ_C 33.98 que fue asignado por HMBC al heptuplete de δ_H 2.24. Esta información permitió determinar que estos metilos forman parte del grupo isopropilo, y que este grupo está enlazado a la olefina terminal a través del carbono sp^2 cuaternario. La representación gráfica de las correlaciones del HMBC se muestran en la **Figura 7**. Toda esta información condujo a una estructura similar a la del compuesto 24-metilencicloartenol (que no fue aislado en este trabajo), pero con un grupo metilo menos en la posición 4. Dicha estructura está reportada en la literatura como cicloeucalenol. Al comparar los datos obtenidos con los datos espectroscópicos reportados³⁴ se confirmó que **22** es cicloeucalenol.

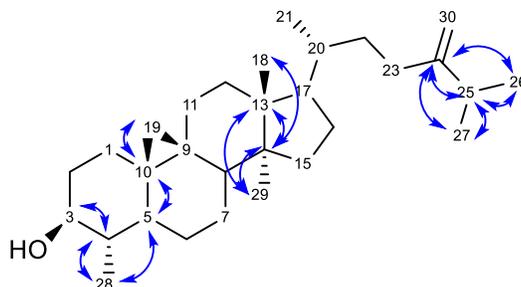
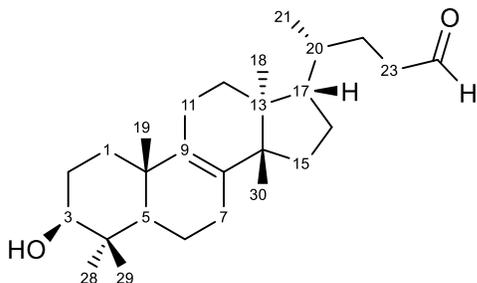


Figura 7. Correlaciones en el HMBC del cicloeucalenol (**22**).

25,26,27-trisnor-3 β -hidroxieufan-24-al (**23**)



Al continuar el fraccionamiento secundario de la fracción H se detectó por CCF una mancha de color naranja rojizo al revelar con solución de sulfato cérico amoniacal. Mediante cromatoplaaca analítica semipreparativa se aisló el compuesto **23**. El espectro de RMN de ^1H (**Figura 27**, Anexo) mostró un perfil similar al de los triterpenos recién descritos, en particular, las señales atribuibles a grupos metilo tienen los mismos desplazamientos que el compuesto **18** (δ_{H} 0.80, 0.85, 0.88, 0.95 y 1.00) salvo por la señal en δ_{H} 0.78 que está 0.3 ppm a campo más bajo, lo que sugiere que este compuesto también tiene un esqueleto tetracíclico de eufano. Destaca el hecho de que carece de dos señales de los grupos metilo geminales de la posición 25, que sí están presentes en la cadena lateral del compuesto **18**, lo que indica la ausencia de estos dos metilos o que estos grupos están funcionalizados. A igual que **18**, el compuesto **23** tiene un doble de dobles en δ_{H} 3.24 que puede asignarse al oximetino de la posición 3, a cuya integral se asignó una intensidad relativa de 1. A campo bajo destaca un triplete asignable a un hidrógeno de aldehído (δ_{H} 9.78). El espectro de IR confirmó la presencia de un grupo carbonilo en la estructura con una señal en 1709 cm^{-1} además de las señales de características de un grupo OH (3462 y 1024 cm^{-1}).

El espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 28**, Anexo) muestra 27 señales, una de ellas en δ_{C} 203.10, lo que es consistente con la presencia de un grupo aldehído; se observa también el carbono base oxígeno en δ_{C} 78.97, mientras que en δ_{C} 134.07 y 133.38 aparecen las señales correspondientes a los dos carbonos cuaternarios de la olefina endocíclica, lo que apoya la aseveración de que este compuesto tiene un esqueleto de eufano.

El experimento DEPT-90 (**Figura 29**, Anexo) muestra la presencia de 5 metinos en la estructura, mientras que el DEPT-135 (**Figura 29**) muestra señales para 6 metilos (dos metilos menos que **18**), 10 metilenos, y se deducen 6 carbonos cuaternarios. Estos datos

indican que la cadena lateral tiene tres carbonos menos que el compuesto **18**, lo que puede explicarse por la falta del carbono de la posición 25 y los metilos geminales unidos a él.

Las correlaciones encontradas en el experimento HSQC (**Figura 30**, Anexo) confirmaron que la señal de δ_H 9.78 del espectro de 1H , se corresponde con la señal en δ_C 203.10 del espectro de ^{13}C , y que las señales de metilos entre el espectro de RMN de 1H y RMN de ^{13}C se corresponden de la misma forma que en **18**.

El espectro de HMBC (**Figura 31**, Anexo) mostró que los metilos del compuesto **23** tienen las mismas correlaciones que en el compuesto **18**, lo que confirma que ambos compuestos tienen esqueleto de eufano, y solo son estructuralmente distintos en la cadena lateral. Por otro lado, el triplete de aldehído en δ_H 9.78 solo tiene una correlación débil con un metileno en (δ_C 40.94). Esto indica que el grupo aldehído se encuentra en la cadena lateral, específicamente en la posición 24. Estas correlaciones se representan de forma gráfica en la **Figura 8**. Con esta información se dedujo la estructura propuesta, la cual al ser buscada en la literatura se encontró reportada como un producto de la ozonólisis del acetyl derivado de **18**³² por lo que este es el primer reporte de **23** como un producto natural. Cabe mencionar que existen reportes de triterpenos tetracíclicos con un grupo aldehído en la posición 24³⁵, sin embargo, estos tienen un esqueleto base de cicloartano y no de eufano como en el caso de **23**.

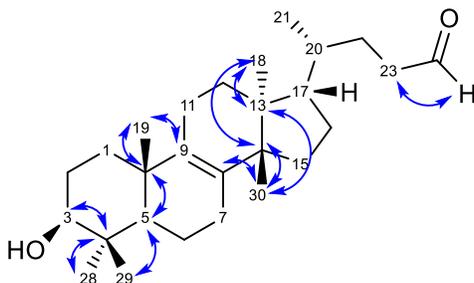
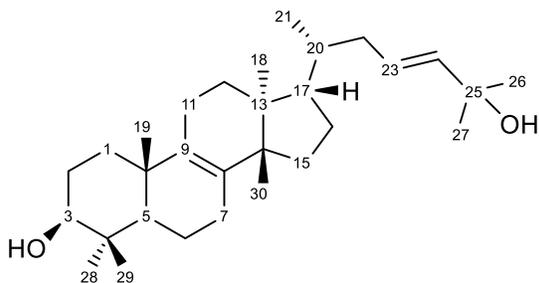


Figura 8. Correlaciones en el HMBC del 25,26,27-trisnor-3β-hidroxiuefan-24-al (**23**).

Eufa-8,23-dien-3 β ,25-diol (**24**)



Al proseguir con el fraccionamiento secundario de la fracción H se detectó la presencia de otro compuesto por CCF. Este fue aislado mediante cromatoplaaca analítica semipreparativa y posteriormente se obtuvieron sus espectros de RMN. El espectro de RMN ^1H (**Figura 32**, Anexo) mostró el perfil característico de un triterpeno. Se notó en primera instancia la presencia de 6 señales asignables a metilos con los mismos desplazamientos químicos que los del compuesto **18** (δ_{H} 1.00, 0.95, 0.88, 0.82, 0.80 y 0.78), lo que sugiere que **24** también es un triterpeno tetracíclico con esqueleto de eufano. Adicionalmente, el espectro de **24** tiene un singulete más intenso en δ_{H} 1.31, la intensidad relativa de esta señal guarda una relación 2:1 con los singuletes asignados a metilo, lo que sugiere que este singulete corresponde a dos metilos con mismo desplazamiento químico. Destacó un multiplete en δ_{H} 5.58 cuya intensidad guarda relación 2:1 con el doble de dobles de δ_{H} 3.24, lo que indica que dicha multiplicidad corresponde a dos hidrógenos vinílicos con mismo desplazamiento.

El espectro de RMN ^{13}C (**Figura 33**, Anexo) mostró 30 señales y reveló la presencia de cuatro carbonos vinílicos correspondientes a dos enlaces dobles, dos de estos carbonos tenían los mismos desplazamientos que los de la olefina endocíclica **18**, lo que apoya los indicios de que **24** también tiene esqueleto de eufano. En este espectro también se observó la presencia de dos carbonos unidos a oxígeno en δ_{C} 78.98 y 70.74, sugiriendo una estructura con dos grupos hidroxilo.

Los espectros DEPT-90 y DEPT-135 (**Figura 34**, Anexo) confirmaron la presencia de 8 metilos, 9 metilenos y 6 metinos, dos de estos metinos son vinílicos (δ_{C} 139.24 y 125.69) lo que indica la presencia de una olefina disustituida. Además, se dedujeron 7 carbonos cuaternarios, uno de ellos correspondiente al carbono de base de oxígeno en δ_{C} 70.74.

El espectro HSQC (**Figura 35**, Anexo) mostró la misma correlación que el compuesto **18** para los metilos en δ_{H} 1.00, 0.95, 0.88, 0.82, 0.80 y 0.78 con sus respectivos átomos de carbono, sin embargo, los metilos en δ_{H} 1.31 correlacionaron con los carbonos en δ_{C} 29.87 y

29.92. Además, este espectro confirmó que el multiplete en δ_H 5.58 corresponde a la señal traslapada de dos protones en dos átomos de carbono sp^2 distintos (δ_C 139.25 y 125.69). El espectro HMBC (**Figura 36**, Anexo) mostró las mismas correlaciones que **18** y **23** para los metilos con desplazamientos en δ_H 1.00, 0.95, 0.88, 0.82, 0.80 y 0.78, lo que confirma que **24** también es un triterpeno tetracíclico de tipo eufano. Por otro lado, los dos metilos con desplazamientos en δ_H 1.31 correlacionaron entre ellos (δ_C 29.87 y 29.92) lo que sugiere que estaban unidos al mismo carbono, además ambos correlacionan con el carbono sp^2 de δ_C 139.25 y con el carbono cuaternario base de oxígeno de δ_C 70.74. Esta información indica que el carbono de δ_C 70.74 está enlazado a los dos metilos de δ_H 1.31, a un grupo hidroxilo y al enlace doble conformado por los carbonos de δ_C 125.69 y 139.25. Estas correlaciones están representadas de forma gráfica en la **Figura 9**. Con esto se determinó que la diferencia entre **24**, **23** y **18** se encuentra únicamente en la cadena lateral del esqueleto de eufano. Al buscar en la literatura compuestos con la misma estructura molecular que la que se determinó para **24**, se encontró que este compuesto ya había sido aislado anteriormente de otra especie de *Euphorbia*³⁶, y también de una planta de otra familia³⁷, y está reportado con el nombre eufa-8,23-dien-3 β ,25-diol. La comparación de los datos espectroscópicos obtenidos con los reportados permitió determinar que **24** es el compuesto eufa-8,23-dien-3 β ,25-diol. No fue posible determinar la configuración de este enlace doble a partir de las constantes de acoplamiento (J) de los protones vinílicos, pues estos aparecen como un multiplete traslapado en δ_H 5.58 en el espectro obtenido en $CDCl_3$, sin embargo, al obtener el espectro de RMN de 1H en benceno deuterado (C_6D_6) (tal como se encontró en la literatura³⁷) fue posible detectar un doblete correspondiente al hidrógeno vinílico de la posición 24, con una J igual a 15.6 Hz, este valor de J es característico del acoplamiento entre dos hidrógenos vinílicos en disposición *trans*, lo que confirmaba la configuración *trans* del enlace doble.

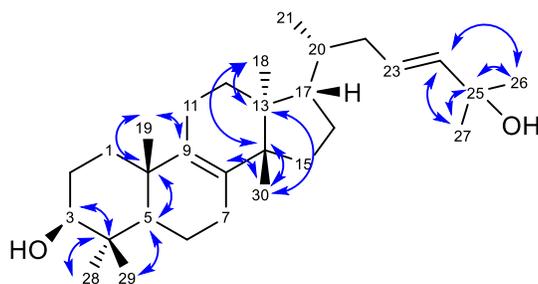
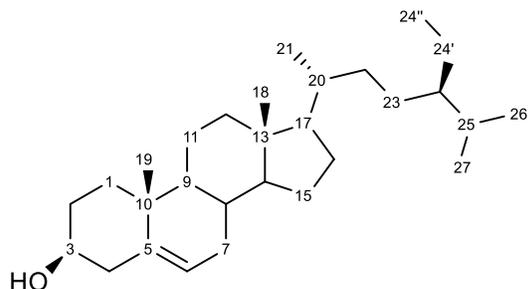


Figura 9. Correlaciones en el HMBC del eufa-8,23-dien-3 β ,25-diol (**24**).

β -Sitosterol (**15**)



En la fracción I se detectó por CCF la presencia de un compuesto que aparece como una mancha de color rojo vino al aplicar sobre la placa solución de sulfato cérico amoniacal. El fraccionamiento secundario y terciario por CC, además de cristalizaciones sucesivas de acetato de etilo/hexano permitieron el aislamiento del compuesto **15**. El espectro de RMN ^1H de **15** (**Figura 37**, Anexo) presentó el perfil de un triterpenoide. Destacó un doblete en δ_{H} 5.28 y se observó también una multiplicidad en δ_{H} 3.52 asignable a un oximetino característico de la posición 3 de triterpenoides. Las intensidades de estas señales tienen una relación 1:1 entre ellas. A campo más alto se observaron singuletes en δ_{H} 1.01, 0.92, 0.84, 0.82, 0.80 y 0.68, asignables a metilos puesto que cada uno guardaba una relación 3:1 con el multiplete de δ_{H} 3.52. Estas señales y sus desplazamientos son característicos del β -sitosterol. La comparación del espectro de RMN ^1H de **15** con datos espectroscópicos de muestras auténticas disponibles en el laboratorio permitieron determinar que se trataba del mismo compuesto.

4.2 Análisis preliminar del látex

Una parte del látex de *E. tanquahuete* fue extraída con CHCl_3 . Mediante CCF de este extracto contra una muestra pura de **18** aislada de las hojas, se determinó que el mayor constituyente del extracto era un compuesto con mismo Rf que **18**. Una porción de este extracto (15 mg) fue tomada para obtener el espectro de RMN de ^1H . Las únicas señales que el espectro mostraba claramente eran las señales características de los metilos de un esqueleto de eufano (δ_{H} 1.68, 1.61, 1.00, 0.95, 0.87, 0.80 y 0.75), un doble de dobles ancho en δ_{H} 3.24 y una señal ancha en δ_{H} 5.09. Esta información sugiere que el principal constituyente químico del látex es el compuesto **18**, aunque podría estar constituido además por una mezcla de triterpenoides

con esqueleto de eufano con varios desplazamientos químicos similares. La **Figura 5** muestra una comparación de los espectros los espectros de **18** aislado del látex (a), del extracto del látex con CHCl₃ (b) y de **18** aislado de las hojas (c), los tres obtenidos en CDCl₃ a 300 MHz, a excepción de c que fue obtenido a 400 MHz.

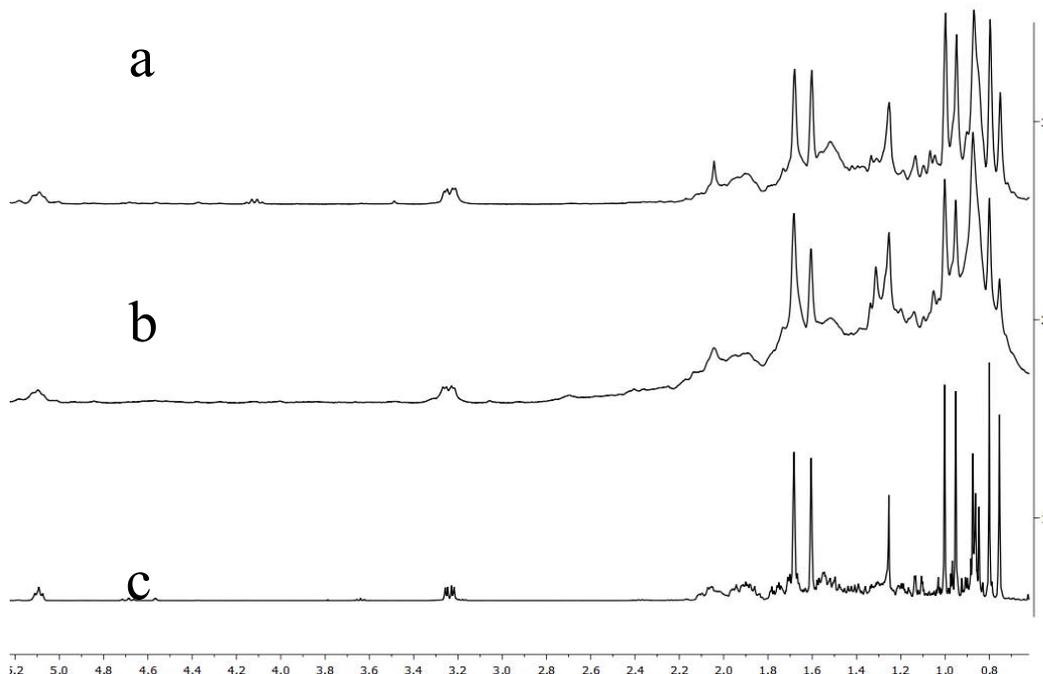


Figura 10. Comparación de espectros: a) **18** aislado del látex, b) extracto del látex, y c) **18** aislado de hojas.

4.3 Evaluación preliminar de la actividad biológica de los extractos

Se evaluó preliminarmente la actividad antiinflamatoria del eufol (**18**) y de los extractos de hojas y ramas de *E. tanquahuete* en el modelo de edema auricular murino. Los resultados se muestran en la **Tabla 2**

Tabla 2. Actividad antiinflamatoria del eufol y de los extractos.

Muestra ^a	Edema (mg) ±DS	Inhibición (%) ± DS
Eufol ^b	11.57±0.89*	33.27±5.16*
Ext. hojas, ^c CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH 1:1	10.67	34.48
Ext. ramas, hexano	9.10±1.23	26.61±9.91
Ext. ramas, acetona ^b	5.13±2.09**	70.38±12.07**
Ext. ramas, ^d CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH 1:1	12.37±0.74*	24.13±4.57*
Ex.t latex, CHCl ₃ ^e	1.53±0.27	87.63±2.20

(**Tabla 2**) Vía de administración tópica. ^aDosis: Eufol 1 μmol /oreja, extractos 1 mg/oreja. Control: ^b CHCl_3 (11.57 \pm 0.89 mg), ^c CH_3OH (16.28 mg), ^dacetona (12.37 \pm 0.74 mg), ^e CHCl_3 (12.40 \pm 1.91). Los datos representan la media de tres repeticiones con el error estándar de la media. Los resultados se analizaron mediante una prueba de *Dunnet*, los valores de $p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.01$ (**) se consideran como diferencia significativa con respecto al control.

La **Tabla 2** muestra los porcentajes de inhibición de la inflamación del eufol, del extracto de hojas con mezcla $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 1:1, y de los dos extractos de ramas (acetona y $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 1:1). Todas las muestras presentaron una actividad antiinflamatoria, siendo el extracto con acetona el que presentó la mayor actividad antiinflamatoria con un 70 % de inhibición de la inflamación. El eufol y los extractos con mezcla $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 1:1 presentaron una actividad antiinflamatoria comparable con un porcentaje en la inhibición de la inflamación en un rango de entre 24 y 34 %.

Se evaluó también la actividad antiproliferativa de células cancerosas preliminar del eufol y los extractos de hojas, ramas y látex. La **Tabla 3**, muestra los porcentajes de inhibición del crecimiento del compuesto 18 y de los extractos de hojas, ramas y látex en algunas líneas celulares cancerosas humanas y una línea no cancerosa de riñón de mono.

Tabla 3. Actividad citotóxica (% de inhibición) del eufol y los extractos.

Muestra	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1	COS7
Eufol	NC	NC	26.9	2.18	36.62	4.9	NC
Ext. hojas $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 1:1	52.31	43.6	74.63	34.5	62.45	58.35	--
Ext. ramas, hexano	100	100	100	100	100	100	100
Ext. ramas, acetona	100	100	94.7	90.3	92.02	97.73	48.61
Ext. ramas $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 1:1	85.3	100	86.84	55.73	81.77	75.04	75.2
Ext. látex CHCl_3	63.7	100	100	33.0	46.7	99.5	19.3

NC: no citotóxico. Concentración: 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (extractos), 50 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ eufol; vehículo: DMSO. Líneas celulares cancerosas humanas: U251: glía de sistema nervioso central; PC-3: próstata; K562: leucemia; HCT-15: colon; MCF-7: pecho; SKLU-1: pulmón; COS7: línea celular no cancerosa de riñón de mono.

El extracto hexánico de ramas mostró un 100 % de la inhibición de la proliferación para todas las líneas evaluadas. Cabe mencionar que este extracto también presentó un 100 % de inhibición para una línea celular no cancerosa (COS7: línea celular no cancerosa de riñón de mono). La clara actividad antiproliferativa del extracto hexánico podría atribuirse a la presencia de compuestos poco polares como los triterpenos que fueron aislados de las hojas en este trabajo.

El extracto acetónico de ramas mostró una alta actividad antiproliferativa, con un 100 % de inhibición del crecimiento celular para las líneas celulares cancerosas de glías (U251) y próstata (PC-3), y más del 90 % de inhibición para las líneas de leucemia (K562), colon (HCT-15), pecho (MCF-7), y pulmón (SKLU-1). Para el caso de este extracto, presentó solo una actividad moderada para la línea celular no cancerosa COS7 (48.61 % de inhibición).

El extracto de ramas con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 1:1 presentó también una clara actividad antiproliferativa, aunque esta fue menor a la de los extractos con hexano y acetona. Los porcentajes de inhibición para este extracto están entre 75 y 100 % (75.2 para la línea celular no cancerosa COS7) teniendo el porcentaje más bajo para la línea celular de cáncer de colon HCT-15 con un 55.73 % de inhibición.

Por otro lado, el extracto de hojas con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 1:1 presentó una actividad antiproliferativa moderada, menor a la de los tres extractos de ramas. El mayor porcentaje de inhibición del crecimiento lo presentó en la línea celular de leucemia K562 con 74.63 %. El menor porcentaje se presentó en la línea celular de cáncer de próstata PC-3 con un 43.6 % de antiproliferación celular.

El compuesto **18** presentó un bajo porcentaje de inhibición del crecimiento celular en algunas líneas celulares cancerosas (26.9 % en leucemia K562, 2.18 % en colon HCT-15, 36.62 % en pecho MCF-7 y 4.9 % en pulmón SKLU-1), y ninguna actividad en otras (glía U251, próstata PC-3 y células sanas de riñón de mono COS-7). Estos resultados no se corresponden con la alta actividad antiproliferativa que presentó el extracto hexánico de ramas, en la que se presume que hay eufol, por lo que la actividad de dicho extracto no se debe únicamente a la presencia de este compuesto, o bien podría deberse a un efecto sinérgico entre este compuesto y otros presentes en el extracto.

El extracto del látex con CHCl_3 presentó un 100 % de inhibición de la proliferación en las líneas celulares cancerosas de próstata (PC-3) y leucemia (K562). Mientras que para la línea celular cancerosa de pulmón (SKLU-1) presentó 99.5 % de inhibición de la proliferación. Para las líneas celulares de glías (U251), colon (HCT-15) y pecho (MCF-7) presentó porcentajes entre 33 y 63.7 %. El porcentaje más bajo lo presentó para la línea celular no cancerosa de riñón de mono (COS-7) con un 19.3 % de inhibición de la proliferación. Aunque mediante CCF y RMN de ^1H se determinó que el principal componente del extracto del látex

es el compuesto **18**, no puede atribuirse la actividad antiproliferativa únicamente a **18** por sí mismo, por los resultados ya discutidos arriba para este compuesto.

5. RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se aislaron ocho compuestos de las hojas de *E. tanquahuete*: escualeno (**19**), 1-octacosanol (**20**), eufol (**18**), lupeol (**21**), cicloeucalenol (**22**), 25,26,27-*trisinor*-3 β -hidroxieufan-24-al (**23**), eufa-8,23-dien-3 β ,25-diol (**24**) y β -sitosterol (**15**).

La presencia de los compuestos **18** – **20** y **22** – **24** se reporta por primera vez en esta especie vegetal. Los compuestos **21** y **15** se reportan por primera vez en las hojas de esta especie, aunque ya habían sido reportados anteriormente en el látex que produce esta planta. El compuesto **23** se reporta por primera ocasión como un producto natural.

La presencia de estos compuestos es concordante con los resultados obtenidos para otras especies de *Euphorbia*, puesto que los compuestos **18**, **23** y **24** son triterpenoides con esqueleto de eufano, cuya presencia ha sido informada previamente en especies de este género.¹³ Por otra parte, los compuestos **21**, **22** y **15** han sido aislados no solo en el género *Euphorbia* sino también en otros géneros de la familia Euphorbiaceae.³⁸

Mediante CCF y RMN de ¹H se determinó que el compuesto **18** es el principal constituyente químico del látex de *E. tanquahuete*. Por tanto, los resultados obtenidos son consistentes con el perfil taxonómico generalmente para las especies pertenecientes al género *Euphorbia*.

El compuesto **18** presentó una baja actividad antiproliferativa en ciertas líneas celulares cancerosas, con porcentajes de inhibición entre 2 y 32.62, mientras que para otras líneas celulares no presentó actividad citotóxica. La actividad antiinflamatoria de **18** fue moderada, con un 33.27 % de inhibición de la inflamación.

El extracto de hojas de *E. tanquahuete* con CH₂Cl₂/CH₃OH 1:1 presentó actividad antiinflamatoria moderada con 34.48 % de inhibición de la inflamación, y se encontró el porcentaje de inhibición de la proliferación celular entre 43 y 74 %, para las líneas celulares mencionadas anteriormente.

Los extractos orgánicos de ramas mostraron clara actividad citotóxica en las líneas celulares evaluadas, y en el caso del extracto acetónico, también tuvo actividad antiinflamatoria notable.

El extracto clorofórmico del látex mostró clara actividad citotóxica en algunas de las líneas celulares evaluadas, y también mostró una actividad antiinflamatoria notable. Estos resultados son consistentes con el uso que se le da al látex en el tratamiento de fracturas óseas puesto que esta condición viene acompañada de inflamación. Aunque el compuesto **18** es el

principal constituyente químico del látex, la actividad biológica de este extracto no puede ser atribuida únicamente a este compuesto por sí solo.

6. SECCIÓN EXPERIMENTAL

6.1 Colecta y procesamiento del material vegetal

El material vegetal de *Euphorbia tanquahuete*, constituido por hojas, fue colectado por el grupo de investigación el 1 de octubre de 2014, en el Parque “El Texcal”, localizado en el municipio de Jiutepec, Estado de Morelos (No. de Colecta 2999). La planta fue identificada como *Euphorbia fulva* (sinónimo de *E. tanquahuete*) por la Mtra. Clara Hilda Ramos (Instituto de Biología, UNAM). Una muestra de la planta fue depositada en el Herbario Nacional de México (MEXU) con el número de registro 1394140.³⁹

El material vegetal seco (633.8 g) constituido por hojas que fueron secadas a la sombra, fue triturado y posteriormente se le realizó una extracción por percolación, usando como disolvente de extracción una mezcla de diclorometano/metanol en proporción 1:1. Se obtuvo un extracto (97 g) después de evaporar todo el disolvente a presión reducida.

El material vegetal constituido por ramas (3.9 kg) fue molido. Inicialmente se tomaron tres muestras (1g cada una), una de ellas fue extraída con hexano, otra fue extraída con acetona, y la última muestra fue extraída con mezcla $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 1:1 (en los tres casos, 10 mL, 24 h, tres veces). La comparación de los extractos obtenidos por su perfil en CCF permitió concluir que el mejor procedimiento para realizar la extracción a nivel preparativo es extraer el material vegetal completo usando primero hexano (13 L, > 24 h, 3 veces), obteniéndose el residuo (39 g) después de evaporar el disolvente. El material vegetal fue posteriormente extraído con una mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 1:1 (13 L, > 24 h, 3 veces).

Una porción del látex (214 mg) fue disuelta en CHCl_3 , la disolución fue filtrada para eliminar material insoluble. El filtrado fue transferido a un embudo de separación, y se realizó una partición con agua y disolución saturada de NaCl. La parte orgánica se secó sobre NaSO_4 anhidro, y se evaporó el disolvente obteniéndose un residuo resinoso amarillo (190 mg) del cual se tomó una porción (15 mg) para realizar experimentos de RMN de ^1H .

6.2 Aislamiento de los constituyentes químicos

El extracto de las hojas (96 g) fue adsorbido en aproximadamente la misma masa de sílica gel, posteriormente fue sometido a un fraccionamiento primario mediante cromatografía en columna (CC), usando como fase estacionaria sílica gel de malla 70 – 230 en proporción 1:5 con respecto a la masa de extracto. Como fase móvil se utilizó una serie de disolventes en

polaridad creciente, iniciando con hexano como disolvente menos polar, seguido de mezclas de hexano/acetato de etilo variando la proporción con aumento de la polaridad; posteriormente se continuó la elución con acetona pura, y finalmente se lavó la columna usando metanol como el disolvente más polar.

Durante este fraccionamiento primario se colectaron fracciones de 450 mL, las cuales fueron concentradas a presión reducida para disminuir el volumen de disolvente hasta la cantidad mínima necesaria para transferirlos a viales. El contenido de estas fracciones fue analizado mediante cromatografía en capa fina (CCF), lo que permitió agrupar las fracciones que presentaban el mismo perfil cromatográfico, resultando así 26 residuos orgánicos que fueron nombradas con las letras del abecedario A – Y.

A este fraccionamiento primario siguieron fraccionamientos secundarios por CC de aquellas fracciones en las que la CCF mostraban manchas homogéneas que pudieran considerarse como posibles compuestos de interés. Se usó como fase estacionaria silica gel de malla 230 – 400, y como fase móvil mezclas de hexano y acetato de etilo la mayoría de las veces, haciendo uso en ocasiones de mezclas hexano/diclorometano.

6.3 Caracterización

Los compuestos aislados fueron caracterizados por medios espectroscópicos, tales como Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de protón (^1H) y carbono 13 (^{13}C), de una y dos dimensiones (HSQC, HMBC) y espectros DEPT-90 y DEPT-135; así como espectrometría de masas de impacto electrónico, y espectroscopía de infrarrojo (IR). Para la obtención de los espectros de RMN, se utilizaron los equipos Bruker Fourier 300 MHz, Bruker Avance III 400 MHz, y Varian Unity Inova 500 MHz. Los espectros de IR fueron adquiridos en un espectrofotómetro Bruker Tensor 27 (IR-FT).

Los puntos de fusión fueron obtenidos con un aparato Fisher-Johns marca Cole-Palmer y no están corregidos.

6.4 Compuestos aislados

Escualeno (**19**)

Aceite viscoso incoloro (175 mg) CCF: Mancha gris/café recién revelada que cambia a color morado pálido. Rf.: 0.33 (Hexano).

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) 5.11 (6H, *m*, hidrógenos vinílicos), 2.04 (20H, *m*, metilenos), 1.68 (6H, *s*, metilos trans), 1.60 (18H, *s*, metilos cis).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) 135.25, 135.04, 131.38, 124.57, 124.46, 124.44, 39.92, 39.90, 28.44, 26.94, 26.83, 25.85, 17.83, 16.20, 16.16.

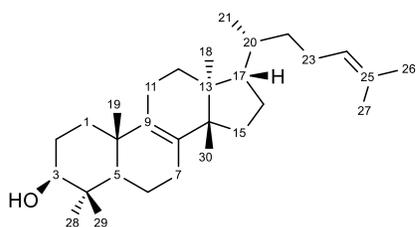
1-Octacosanol (**20**)

Sólido incoloro en forma de hojuelas pequeñas (~1 g). Precipitó al enfriarse la disolución de Hexano/AcOEt de la fracción H. Poco soluble en acetona, hexano, CH_2Cl_2 , y metanol. Soluble en cloroformo con ligero calentamiento (~30 °C). Soluble en mezcla de hexano/ CH_2Cl_2 /metanol 2:1:2. P. f. 75 – 77 °C.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 3.63 (2H, *t*, $J = 6.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{-OH}$), 1.56 (2H, *m*, C- $\text{CH}_2\text{-C}$), 1.26 (50H, *singlete ancho*, C-(CH_2)₂₅-C), 0.88 (3H, *t*, $J = 6.3$ Hz, $\text{CH}_3\text{-C}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 63.12, 32.91, 31.94, 29.70, 29.63, 29.46, 29.35, 25.80, 22.68.

Eufol (**18**)



Cristales en forma de agujas finas (~1g). CCF: Mancha de color naranja recién revelada, que cambia a color café/gris. Rf: 0.57 (Hexano/AcOEt 8:2).

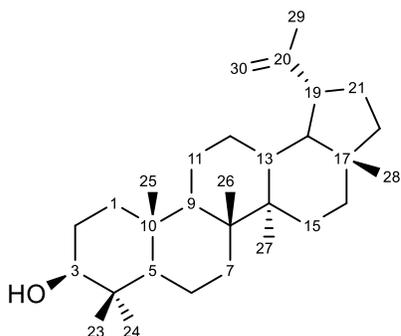
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5.09 (1H, *t*, $J = 7.2$ Hz, H-24), 3.24 (1H, *dd*, $J = 11.6$ Hz, $J = 4.8$ Hz, H-3), 1.68 (3H, *s*, H-26); 1.60 (3H, *s*, H-27), 1.00 (3H, *s*, H-28), 0.95 (3H, *s*, H-19), 0.87 (3H, *s*, H-30), 0.85 (3H, *d*, $J = 6.4$ Hz, H-21), 0.80 (3H, *s*, H-29), 0.75 (3H, *s*, H-18).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 134.01 (C-8*), 133.54 (C-9*), 130.86 (C-25*), 125.20 (C-24*), 79.00 (C-3*), 50.96 (C-5*), 50.03 (C-14*), 49.63 (C-17), 44.11 (C-13*), 38.94 (C-4*),

37.27 (C-10*), 35.87 (C-22), 35.42 (C-20), 35.25 (C-1*), 30.90 (C-15), 29.76 (C-16), 28.14 (C-12), 28.05 (C-29), 27.94 (C-7), 27.67 (C-2), 25.74 (C-27*), 24.76 (C-23), 24.47 (C-28), 21.53 (C-11), 20.14 (C-19*), 18.94 (C-6 y C-21*), 17.68 (C-26*), 15.62 (C-18*), 15.53 (C-30*).

*Asignaciones con base en los experimentos en dos dimensiones (son coincidentes con las asignaciones reportadas en la literatura³³).

Lupeol (21)



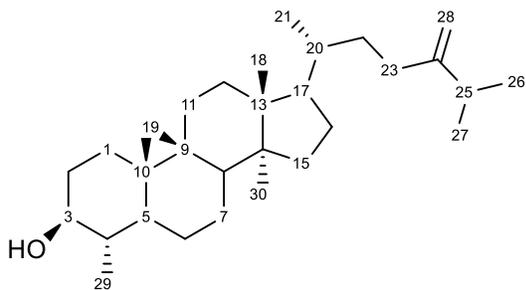
Sólido amorfo incoloro (~200 g). CCF: Mancha color naranja recién revelada, cambia a color rosa/morado intenso. Rf: 0.56 (Hexano/AcOEt 8:2).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ_H 4.69 (1H, *s*, H-30a); 4.57, (1H, *s*, H-30b); 3.19 (1H, *dd*, *J* = 11.1 Hz, *J* = 5.4 Hz, H-3); 2.38 (1H, *td*, *J* = 11.1 Hz, *J* = 5.7 Hz, H-19); 1.68 (3H, *s*, H-29); 1.03 (3H, *s*); 0.97 (6H, *s*); 0.94 (3H, *s*); 0.83 (3H, *s*); 0.79 (3H, *s*); 0.76 (3H, *s*).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ_C 150.96 (C-20), 109.31 (C-30), 78.99 (C-3), 55.30 (C-5), 50.44 (C-9), 48.30 (C-19), 47.99 (C-18), 43.00 (C-17), 42.83 (C-14), 40.83 (C-8), 40.00 (C-22), 38.86 (C-4), 38.71 (C-1), 38.05 (C-13), 37.17 (C-10), 35.58 (C-16), 34.28 (C-7), 30.92, 29.85 (C-21), 27.99 (C-23), 27.42 (C-2 y C-15), 25.14 (C-12), 20.93 (C-11), 19.31 (C-29), 18.32 (C-6), 18.00 (C-28), 16.12 (C-25), 15.98 (C-26), 15.37 (C-24), 14.55 (C-27).

Asignaciones en RMN ¹³C con base en lo reportado en la literatura⁴⁰

Cicloeucaleanol (**22**)



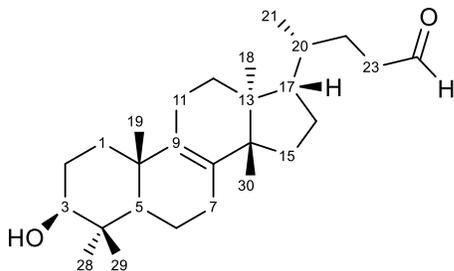
Cristales en forma de discos o escamas (10 mg). CCF: Mancha color café/gris recién revelada, cambia a color morado pálido, R.f.: 0.32 (CH₂Cl₂).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ_H 4.72, H-28a (s, 1H); 4.67, H-28b (s, 1H); 3.21, H-3 (ddd, 1H, *J* = 10.4 Hz, *J* = 9.2 Hz, *J* = 4.8 Hz); 2.24, H-25 (h, 1H, *J* = 6.4 Hz); 1.03, H-26 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz); 1.02, H-27 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz); 0.98, H-29 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz); 0.97, H-18 (s, 3H); 0.90, H-21 (d, 3H, *J* = 6.4 Hz); 0.89, H-30 (s, 3H); 0.39, H-19a (d, 1H, *J* = 4 Hz); 0.14, H-19b (d, 1H, *J* = 4 Hz).

RMN ¹³C (MHz, CDCl₃) δ_C 157.08 (C-24*), 106.08 (C-28*), 76.74 (C-3*), 52.37 (C-17), 49.07 (C-14*), 47.03 (C-8*), 45.52 (C-13*), 44.77 (C-4*), 43.50 (C-5*), 36.29 (C-20), 35.51 (C-15), 35.18 (C-22), 34.98 (C-2), 33.98 (C-25), 33.05 (C-12), 31.48 (C-23), 30.96 (C-1), 29.70 (C-10*), 28.27 (C-16), 27.40 (C-19*), 27.14 (C-11), 25.33 (C-7), 24.83 (C-6), 23.72 (C-9), 22.16 (C-27), 22.03 (C-26), 19.30 (C-30*), 18.50 (C-21), 17.95 (C-18), 14.56 (C-29*).

*Asignaciones con base en los experimentos en dos dimensiones (son coincidentes con las asignaciones reportadas en la literatura³⁴).

25,26,27-trisnor-3β-hidroxiuefan-24-al (**23**).

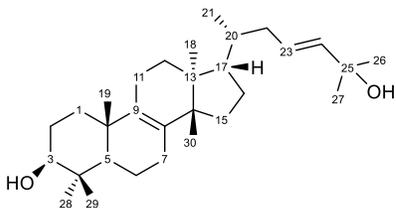


Sólido amorfo amarillento (7 mg), Rf: 0.4 (Hexano/AcOEt/MeOH/AcOH 28:10:1:1)

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} 9.78 (1H, *t*, $J = 2$ Hz, H-24), 3.24 (1H, *dd*, $J = 11.3$ Hz, $J = 4.4$ Hz, H-3), 1.00 (3H, *s*, H-28), 0.95 (3H, *s*, H-19), 0.88 (3H, *s*, H-30), 0.85 (3H, *d*, $J = 6.4$ Hz, H-21), 0.80 (3H, *s*, H-29), 0.78 (3H, *s*, H-18).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} 203.09 (C-24*), 134.07 (C-8*), 133.38 (C-9*), 78.97 (C-3*), 50.95 (C-5*), 50.03 (C-14*), 49.46 (C-17), 44.12 (C-13*), 40.94, 38.93 (C-4*), 37.27 (C-10*), 35.45 (C-20), 35.21 (C-1*), 30.88 (C-15), 29.70 (C-16), 28.07, 28.05 (C-29), 27.91 (C-7), 27.65 (C-2), 27.26, 24.43 (C-28), 21.47 (C-11), 20.14 (C-19), 18.92, 18.78, 15.64, 15.52 (C-30*).

Eufa-8,23-dien-3 β -25-diol (**24**)



Sólido amorfo amarillento (6 mg). CCF: Mancha color rojo ladrillo recién revelada. Rf: 0.5 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Me}_2\text{CO}$ 9:1).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5.58 (2H, *m*, H-23 y H-24), 3.24, H-3 (1H, *dd*, $J = 11.6$ Hz, $J = 4.4$ Hz); 1.31 (6H, *s*, H-26 y H-27), 1.00 (3H, *s*, H-28); 0.95 (3H, *s*, H-19); 0.88 (3H, *s*, H-30); 0.82 (3H, *d*, $J = 6$ Hz, H-21); 0.80 (3H, *s*, H-29); 0.78 (3H, *s*, H-18).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 139.25 (C-24*), 134.01 (C-8*), 133.50 (C-9*), 125.69 (C-23*), 78.98 (C-3*), 70.74 (C-25*), 50.96 (C-5*), 50.01 (C-14*), 49.54 (C-17), 44.16 (C-13*), 38.94 (C-4*), 38.14 (C-22), 37.27 (C-10*), 36.20 (C-20), 35.24 (C-1*), 30.97 (C-12), 29.92 (C-27*), 29.87 (C-26*), 29.74 (C-15*), 28.05 (C-28), 27.92 (C-2 y C-16), 27.67 (C-7), 24.45 (C-30*), 21.48 (C-11), 20.14 (C-19*), 19.05 (C-21*), 18.93 (C-6*), 15.77 (C-18), 15.52 (C-29).

*Asignaciones con base en los experimentos en dos dimensiones (son coincidentes con las asignaciones reportadas en la literatura³⁷).

β -Sitosterol (**15**)

Cristales en forma de agujas finas (125 mg). P. f.: 155 – 157 °C. CCF: Mancha de color rojo vino recién revelada. R.f.: 0.53 (Hexano/AcOEt 7:3)

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 5.35 (1H, *d*, $J = 5.1$ Hz, H-6), 3.52 (1H, *m*, H-3) 1.01 (3H, *s*), 0.92 (3H, *d*, $J = 6.6$ Hz), 0.84 (3H, *s*), 0.82 (3H, *s*) 0.80 (3H, *s*), 0.68 (3H, *s*).

7. REFERENCIAS

- (1) Weyrich, L. S.; Duchene, S.; Soubrier, J.; Arriola, L.; Llamas, B.; Breen, J.; Morris, A. G.; Alt, K. W.; Caramelli, D.; Dresely, V.; et al. Neanderthal Behaviour, Diet, and Disease Inferred from Ancient DNA in Dental Calculus. *Nature* **2017**, *544* (7650), 357–361.
- (2) Hardy, K.; Buckley, S.; Collins, M. J.; Estalrich, A.; Brothwell, D.; Copeland, L.; García-Taberero, A.; García-Vargas, S.; De La Rasilla, M.; Lalueza-Fox, C.; et al. Neanderthal Medics? Evidence for Food, Cooking, and Medicinal Plants Entrapped in Dental Calculus. *Naturwissenschaften* **2012**, *99* (8), 617–626.
- (3) Rosas, A.; Martínez-Maza, C.; Bastir, M.; García-Taberero, A.; Lalueza-Fox, C.; Huguet, R.; Ortiz, J. E.; Julià, R.; Soler, V.; de Torres, T.; et al. Paleobiology and Comparative Morphology of a Late Neandertal Sample from El Sidron, Asturias, Spain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103* (51), 19266–19271.
- (4) Cragg, G. M.; Newman, D. J. Natural Products: A Continuing Source of Novel Drug Leads. *Pure Appl. Chem.* **2005**, *77* (1), 7–24.
- (5) Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79* (3), 629–661.
- (6) Monroy-Ortiz, C.; Castillo-España, P. *Plantas Medicinales Utilizadas En El Estado de Morelos.*; Centro de Investigaciones Biológicas, UAEM., 2000.
- (7) Mahlberg, P. G.; Davis, D. G.; Galitz, D. S.; Manners, G. D. Laticifers and the Classification of *Euphorbia*: The Chemotaxonomy of *Euphorbia esula* L. *Bot. J. Linn. Soc.* **1987**, *94*, 165–180.
- (8) Liang, Q. L.; Dai, C. C.; Jiang, J. H.; Tang, Y. P.; Duan, J. A. A New Cytotoxic Casbane Diterpene from *Euphorbia pekinensis*. *Fitoterapia* **2009**, *80* (8), 514–516.
- (9) Aguilar, C. A.; Camacho, J. R.; Chino, S.; Jacquéz, P.; López, M. E. *Plantas Medicinales Del Herbario IMSS: Cuadros Básicos Por Aparatos Y Sistemas Del Cuerpo Humano.*; Instituto Mexicano del Seguro Social, 1994.
- (10) Martínez-Vázquez, M.; Ramírez-Apan, T. O.; Lazcano, M. E.; Bye, R. Anti-Inflammatory Active Compounds from the *n*-Hexane Extract of *Euphorbia hirta*. *J. Mex. Chem. Soc.* **1999**, *43* (3–4), 103–105.

- (11) Shi, J.-G.; Shi, Y.-P.; Jia, Z.-J. Sesquiterpenoids from *Euphorbia wangii*. *Phytochemistry* **1997**, *45* (2), 343–347.
- (12) Fattorusso, E.; Lanzotti, V.; Tagliatalata-Scafati, O.; Tron, G. C.; Appendino, G. Bisnorsesquiterpenoids from *Euphorbia resinifera* Berg. and an Expeditious Procedure to Obtain Resiniferatoxin from Its Fresh Latex. *European J. Org. Chem.* **2002**, *2002* (1), 71–78.
- (13) Shi, Q. W.; Su, X. H.; Kiyota, H. Chemical and Pharmacological Research of the Plants in Genus *Euphorbia*. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (10), 4295–4327.
- (14) Vasas, A.; Hohmann, J. *Euphorbia* Diterpenes: Isolation, Structure, Biological Activity, and Synthesis (2008–2012). *Chem. Rev.* **2014**, *114* (17), 8579–8612.
- (15) 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* (27), 5115–5130.
- (16) Marco, J. A.; Sanz-Cervera, J. F.; Yuste, A.; Jakupovic, J.; Lex, J. Terracinolides A and B, Two Bishomoditerpene Lactones with a Novel Carbon Framework from *Euphorbia terracina*. *J. Org. Chem.* **1996**, *61* (5), 1707–1709.
- (17) Marco, J. A.; Sanz-Cervera, J. F.; Yuste, A.; Jakupovic, J. Terracinolides from *Euphorbia terracina*. *Phytochemistry* **1997**, *45* (1), 137–140.
- (18) Gewali, M. B.; Hattori, M.; Tezuka, Y.; Kikuchi, T.; Namba, T. Constituents of the Latex of *Euphorbia antiqorum*. *Phytochemistry* **1990**, *29* (5), 1625–1628.
- (19) Madureira, A. M.; Gyémánt, N.; Ascenso, J. R.; Abreu, P. M.; Molnár, J.; Ferreira, M. J. U. Euphoportlandols A and B, Tetracylic Diterpene Polyesters from *Euphorbia portlandica* and Their Anti-MDR Effects in Cancer Cells. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69* (6), 950–953.
- (20) Benmerache, A.; Alabdul Magid, A.; Labed, A.; Kabouche, A.; Voutquenne-Nazabadioko, L.; Hubert, J.; Morjani, H.; Kabouche, Z. Isolation and Characterisation of Cytotoxic Compounds from *Euphorbia clementei* Boiss. *Nat. Prod. Res.* **2017**, *6419* (April), 1–8.
- (21) Giner, J. L.; Berkowitz, J. D.; Andersson, T. Nonpolar Components of the Latex of *Euphorbia peplus*. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63* (2), 267–269.
- (22) Öksüz, S.; Gürek, F.; Gil, R. R.; Pengsuparp, T.; Pezzuto, J. M.; Cordell, G. A. Four

- Diterpene Esters from *Euphorbia myrsinites*. *Phytochemistry* **1995**, 38 (6), 1457–1462.
- (23) Öksüz, S.; Gürek, F.; Lin, L. Z.; Gil, R. R.; Pezzuto, J. M.; Cordell, G. A. Aleppicatines A and B from *Euphorbia aleppica*. *Phytochemistry* **1996**, 42 (2), 473–478.
- (24) Ferreira, M. J. U.; Madureira, A. M.; Ascenso, J. R. A Tetracyclic Diterpene and Triterpenes from *Euphorbia segetalis*. *Phytochemistry* **1998**, 49 (1), 179–183.
- (25) Valente, C.; Pedro, M.; Duarte, A.; Nascimento Maria, M. S. J.; Abreu, P. M.; Ferreira, M. J. U. Bioactive Diterpenoids, a New Jatrophone and Two Ent-Abietanes, and Other Constituents from *Euphorbia pubescens*. *J. Nat. Prod.* **2004**, 67 (5), 902–904.
- (26) *Euphorbia tanquahuete*. The Plant List. <http://www.theplantlist.org/tp11.1/record/kew-82452> (accessed Nov 4, 2017).
- (27) Bello Segura, M. M. Estudio Etnobotánico Y Químico Del “pega hueso” *Euphorbia tanquahuete* Sessé et Moc. En Xochipala, Municipio de Eduardo Neri, Guerrero, Universidad Nacional Autónoma de México, 1994.
- (28) Flores Perez, M. J. Recursos Vegetales Utilizados Durante El Proceso Reproductivo, Por Las Parteras de Xohipala, Gro., Universidad Nacional Autónoma de México, 1990.
- (29) García-Mendoza, A. J.; Ordóñez, M. de J.; Briones-Salas, M. *Biodiversidad de Oaxaca*, 1a edicion.; Universidad Nacional Autónoma de México: México, 2004.
- (30) Bello, M.; Gómez, A.; Pérez-Amador, M. C.; Bratoeff, E. A. Estudio Químico Del Látex de *Euphorbia tanquahuete* Sesse et Moc. (Euphorbiaceae). *Phyton (B. Aires)*. **1991**, 52 (1), 69–71.
- (31) Pogliani, L.; Ceruti, M.; Ricchiardi, G.; Viterbo, D. An NMR and Molecular Mechanics Study of Squalene and Squalene Derivatives. *Chem. Phys. Lipids* **1994**, 70 (93), 21–34.
- (32) Bartlett, W. R.; Johnson, W. S.; Plummer, M. S.; Small, V. R. Cationic Cyclization of a Substrate Having an Internal Acetylenic Bond. Synthesis of Euphol and Tirucallol'. *J. Org. Chem.* **1990**, 55 (8), 2215–2224.
- (33) Knight, S. A. Carbon-13 NMR Spectra of Some Tetra- and Pentacyclic Triterpenoids. *Org. Magn. Reson.* **1974**, 6 (3), 603–611.

- (34) 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* (6), 2479–2486.
- (35) De, P. T.; Urones, J. G.; Marcos, I. S.; Basabe, P.; Cuadrado, M. S.; Fernandez Moro, R. Triterpenes from *Euphorbia broteri*. *Phytochemistry* **1987**, *26* (6), 1767–1776.
- (36) Guo, J.; Zhou, L. Y.; He, H. P.; Leng, Y.; Yang, Z.; Hao, X. J. Inhibition of 11 β -HSD1 by Tetracyclic Triterpenoids from *Euphorbia kansui*. *Molecules* **2012**, *17* (10), 11826–11838.
- (37) Leong, Y. W.; Harrison, L. J. (20R,23E)-Eupha-8,23-Diene-3B,25-Diol from *Tripetalum cymosum*. *Phytochemistry* **1999**, *50* (5), 849–857.
- (38) Jury, S. L. *The Euphorbiales: Chemistry, Taxonomy and Economic Botany*; Academic Press, 1987.
- (39) Departamento de Botánica, Instituto de Biología (IBUNAM), *Euphorbia fulva* Stapf, ejemplar de: Herbario Nacional de México (MEXU), Plantas Vasculares. En Portal de Datos Abiertos UNAM (en línea), México, U. N. A. de M. *Euphorbia fulva* Stapf <https://datosabiertos.unam.mx/IBUNAM:MEXU:1394140%0A> (accessed Aug 27, 2017).
- (40) Mochammad, S.; Kazuo, Y.; Ryoji, K.; Osamu, T. 13C Nuclear Magnetic Resonance of Lupane-Type Triterpenes, Bupeol, Betulin and Betulinic Acid. *Chem. Pharm. Bull.* **1980**, *28* (3), 1006–1008.

8. ANEXO

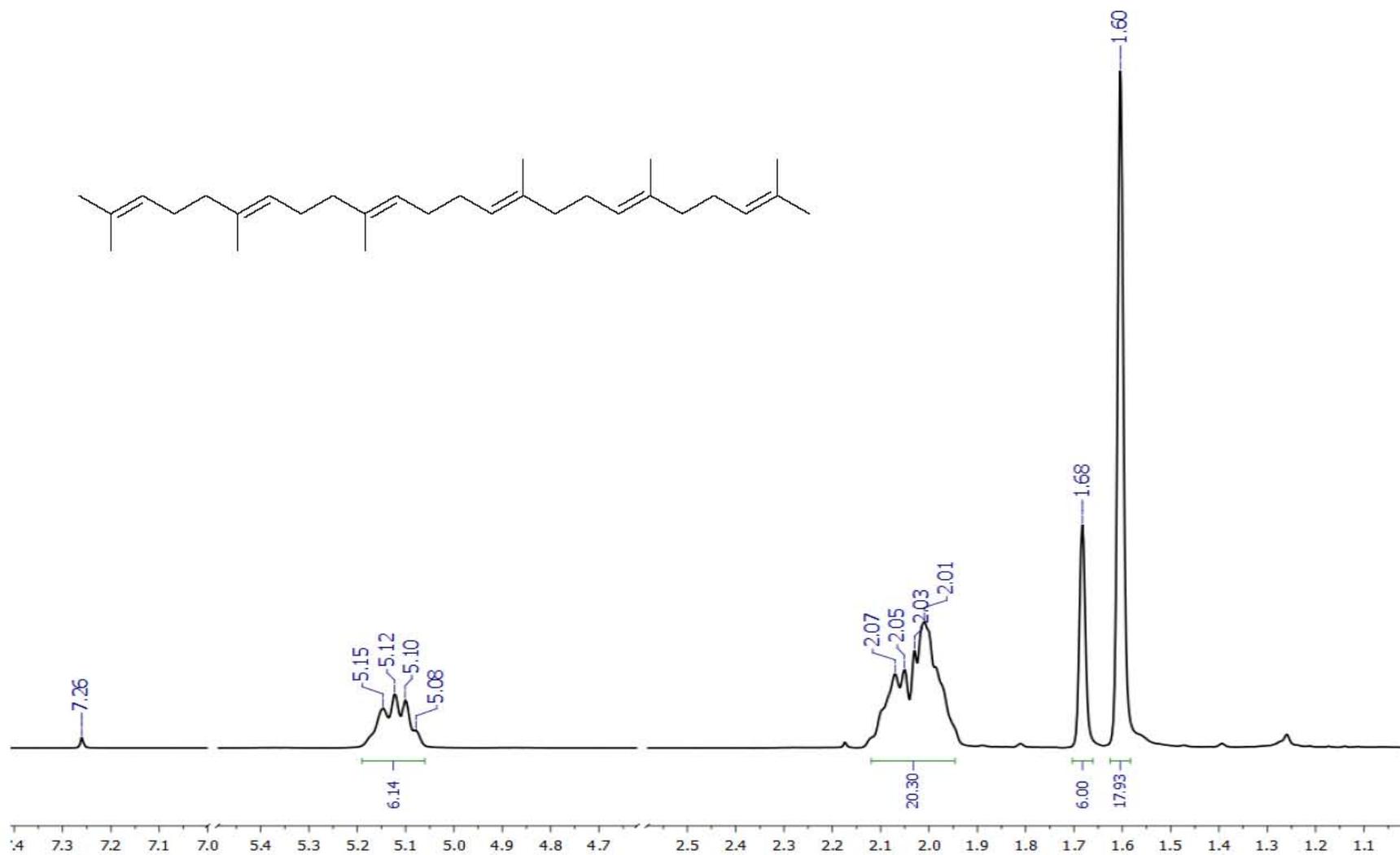


Figura 11. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) del escualeno (**20**).

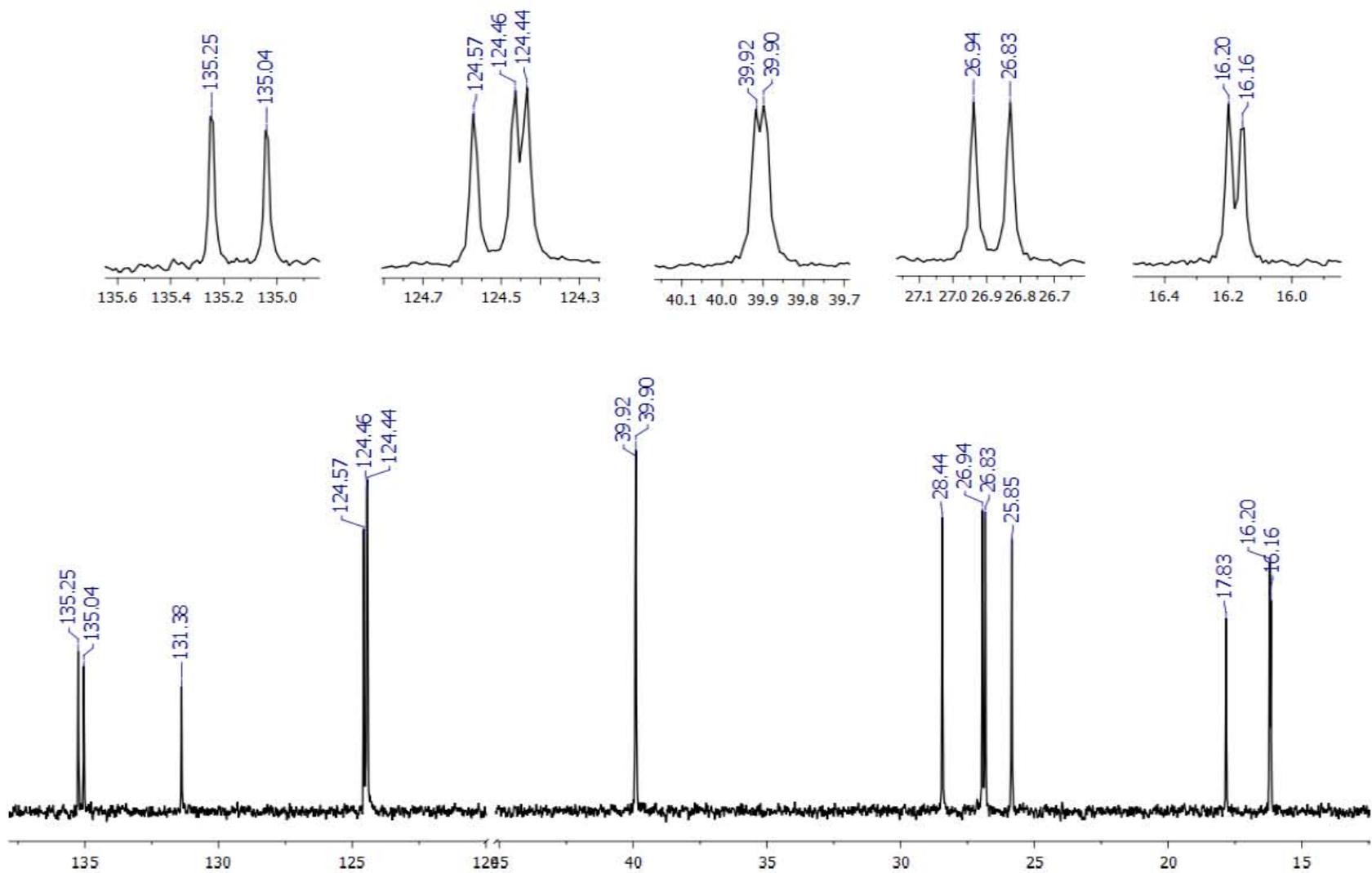


Figura 12. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) del escualeno (19).

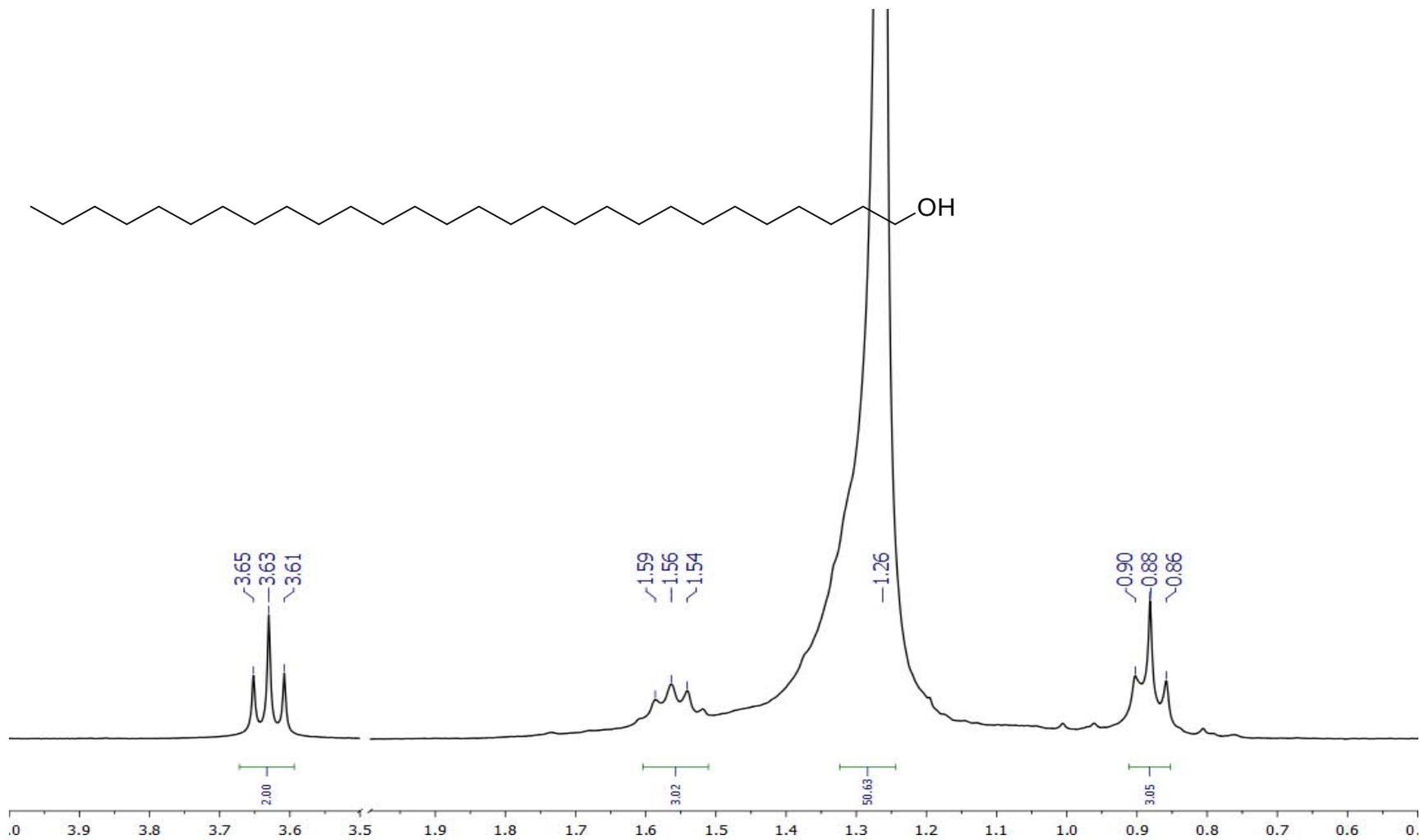


Figura 13. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) del 1-octacosanol (20).

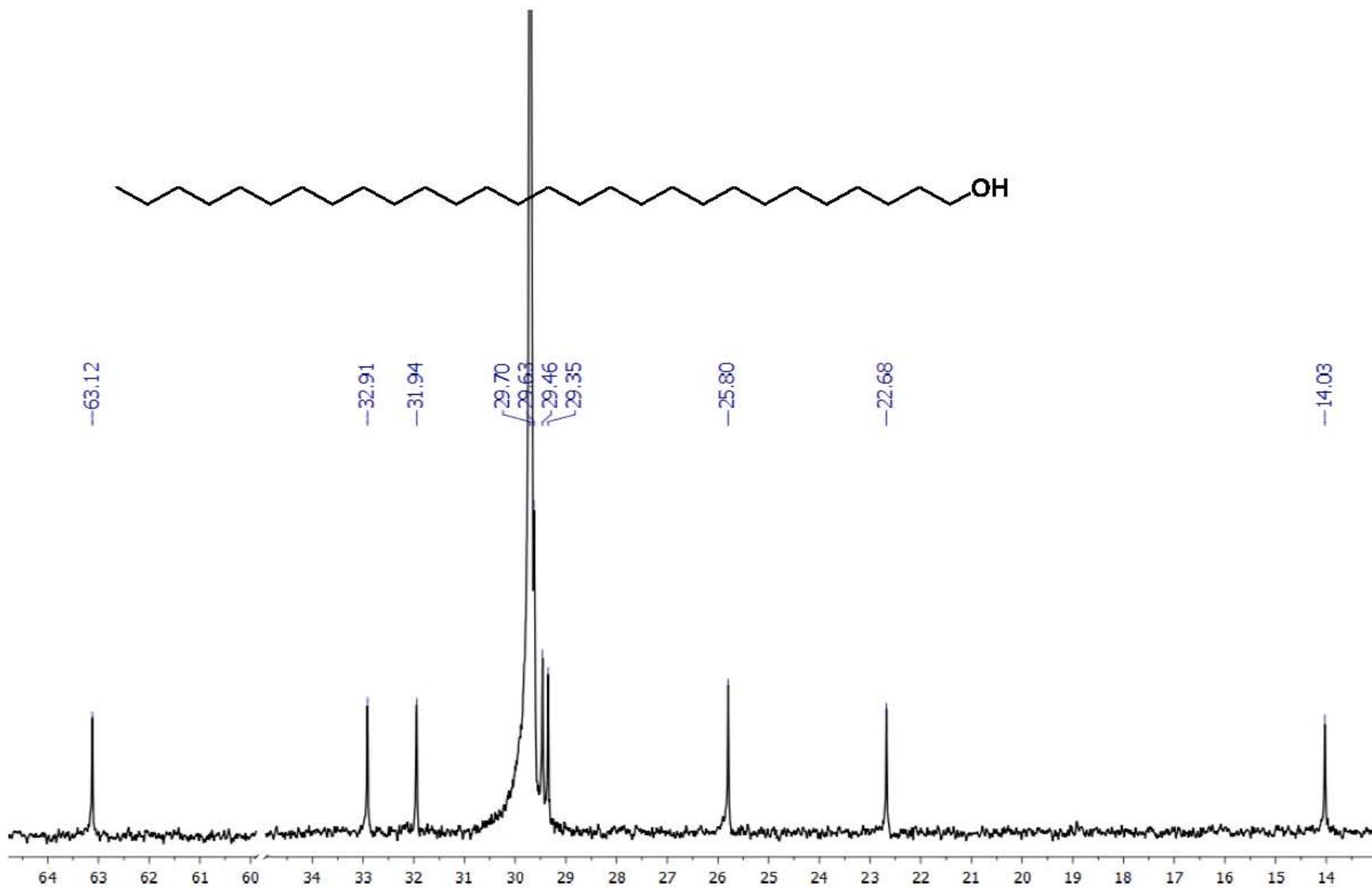


Figura 14. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) del 1-octacosanol (20).

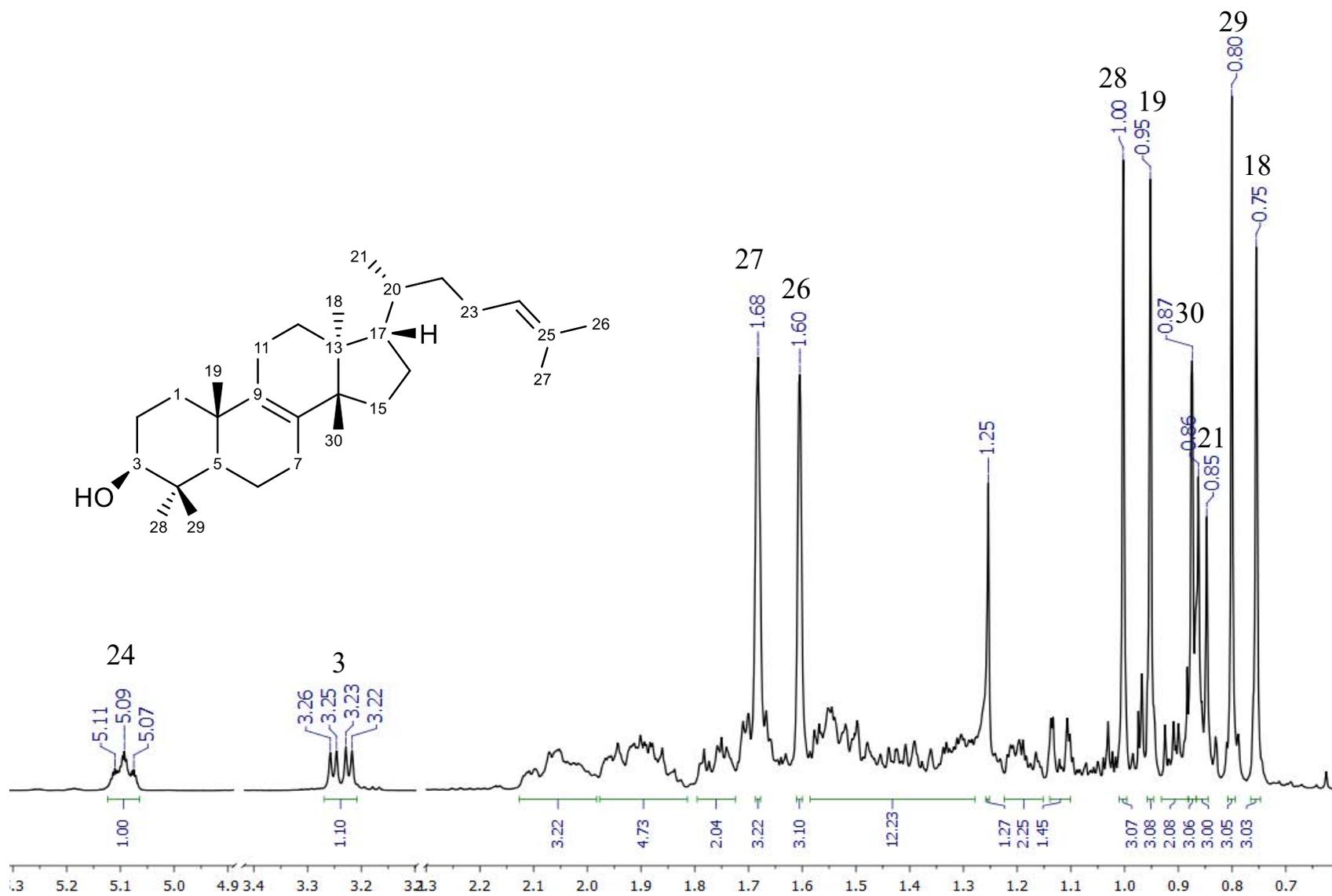


Figura 15. Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) del eufol (18).

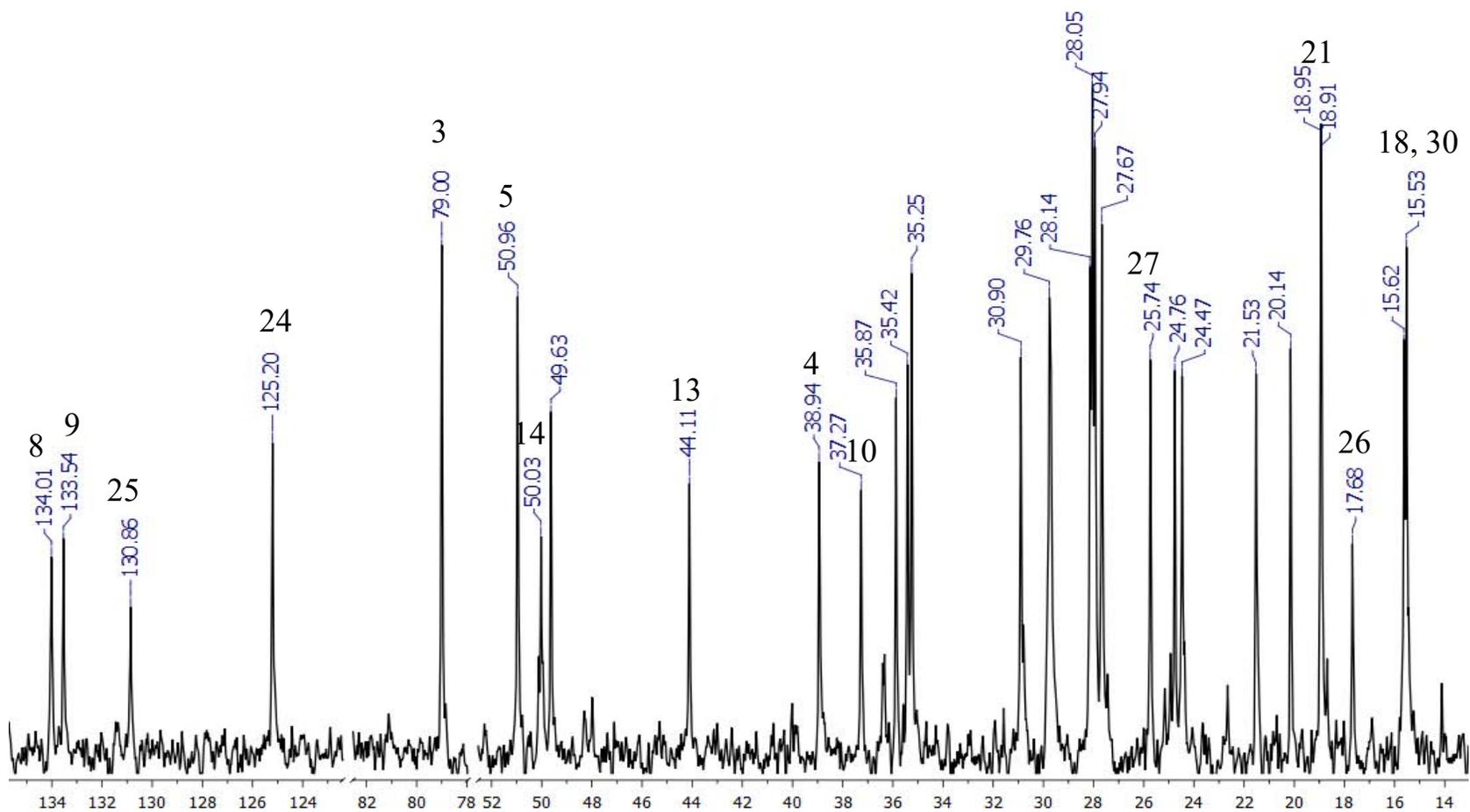


Figura 16. Espectro de RMN ¹³C (CDCl₃, 400 MHz) del eufol (18).

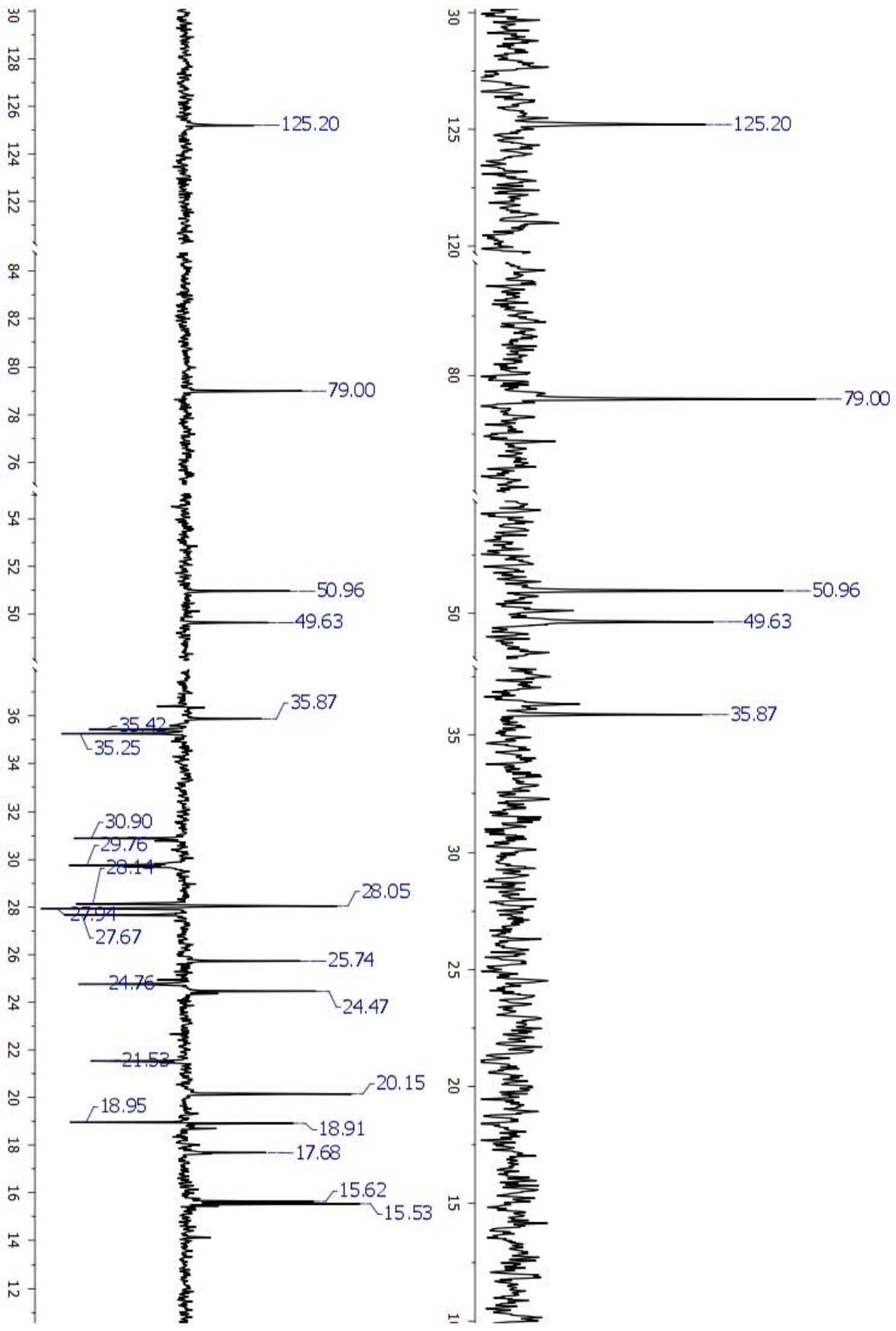


Figura 17. Espectros DEPT del eufol (18).

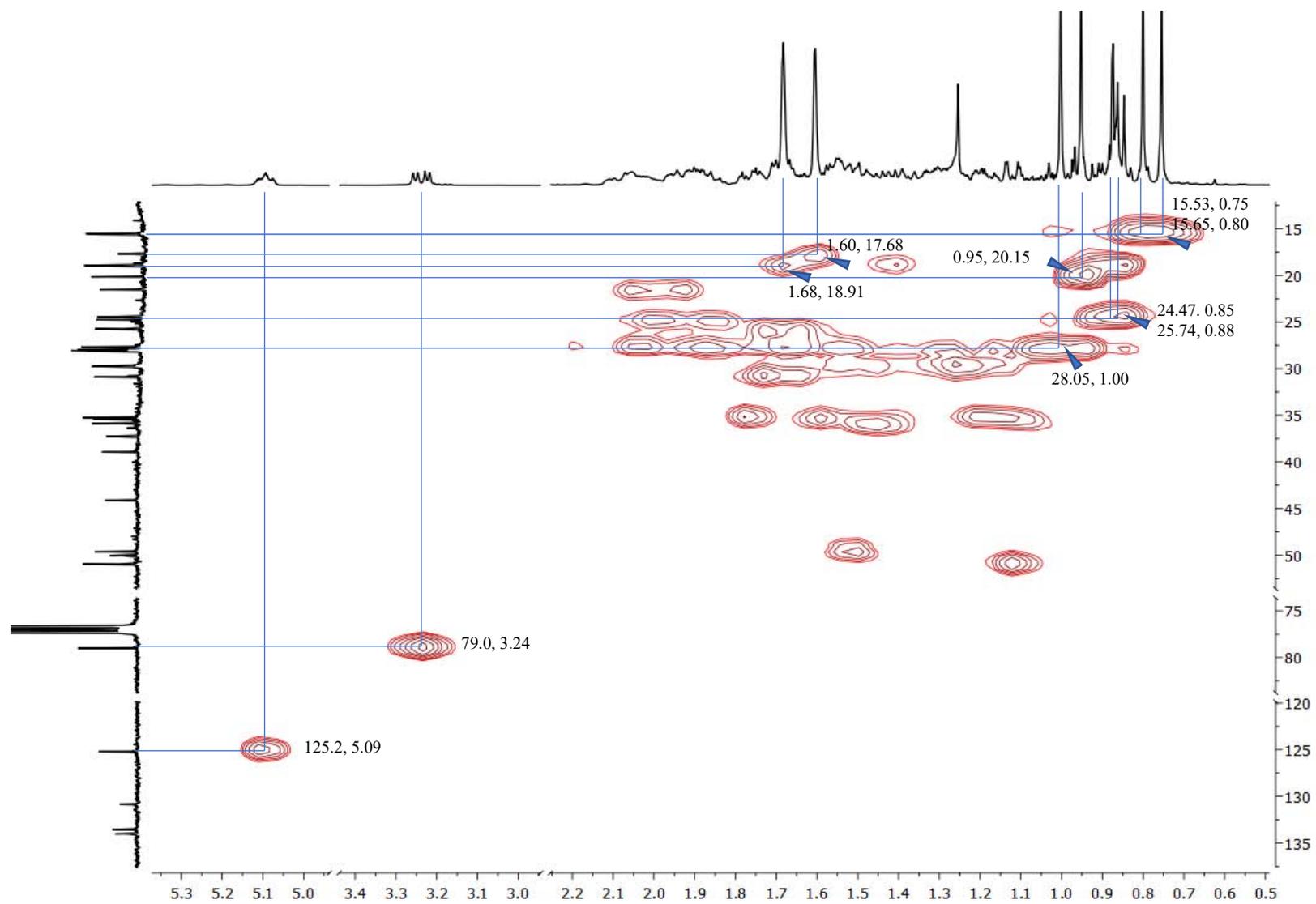


Figura 18. Espectro HSQC del eufol (18).

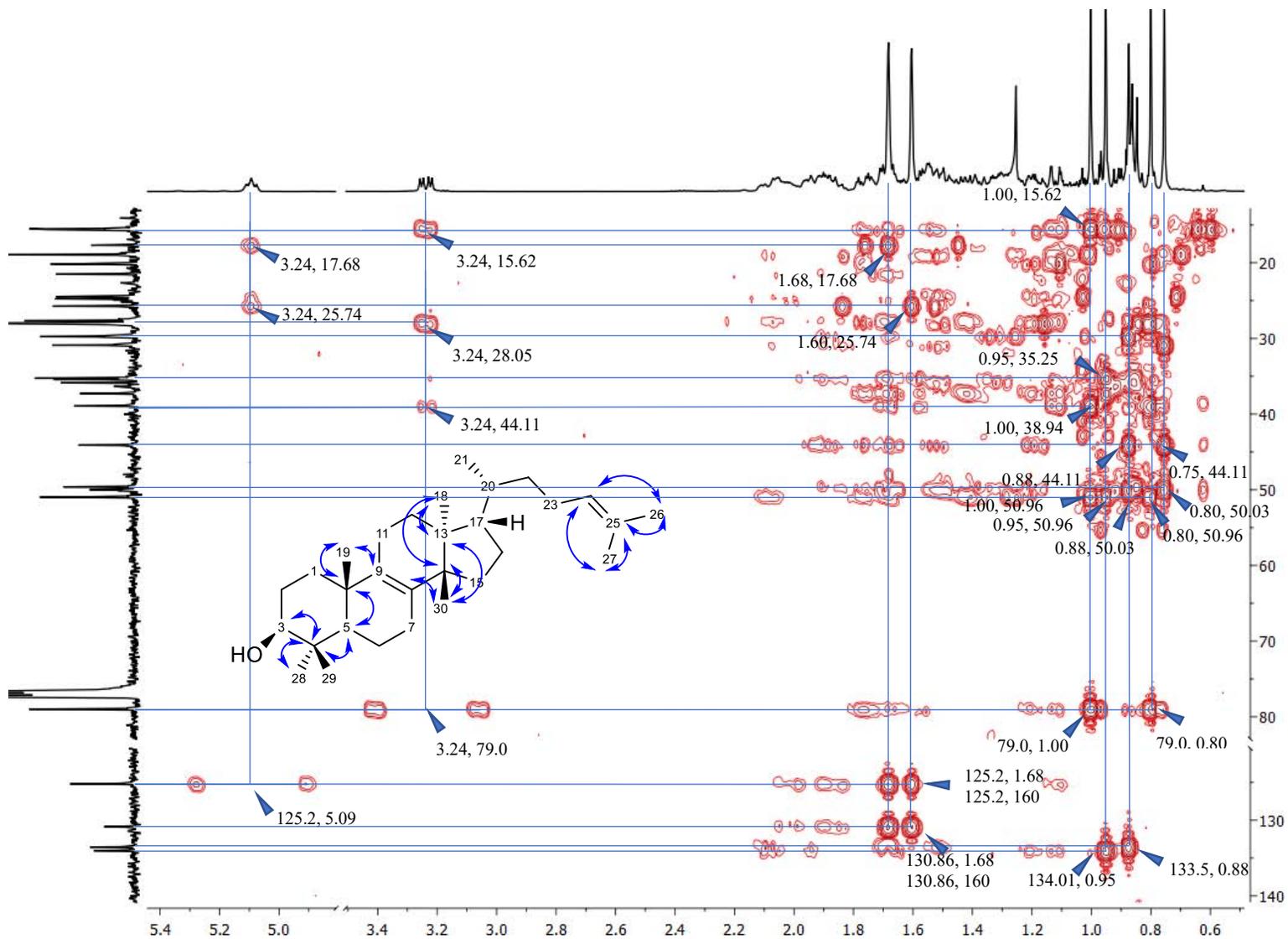


Figura 19. Espectro HMBC del eufol (18).

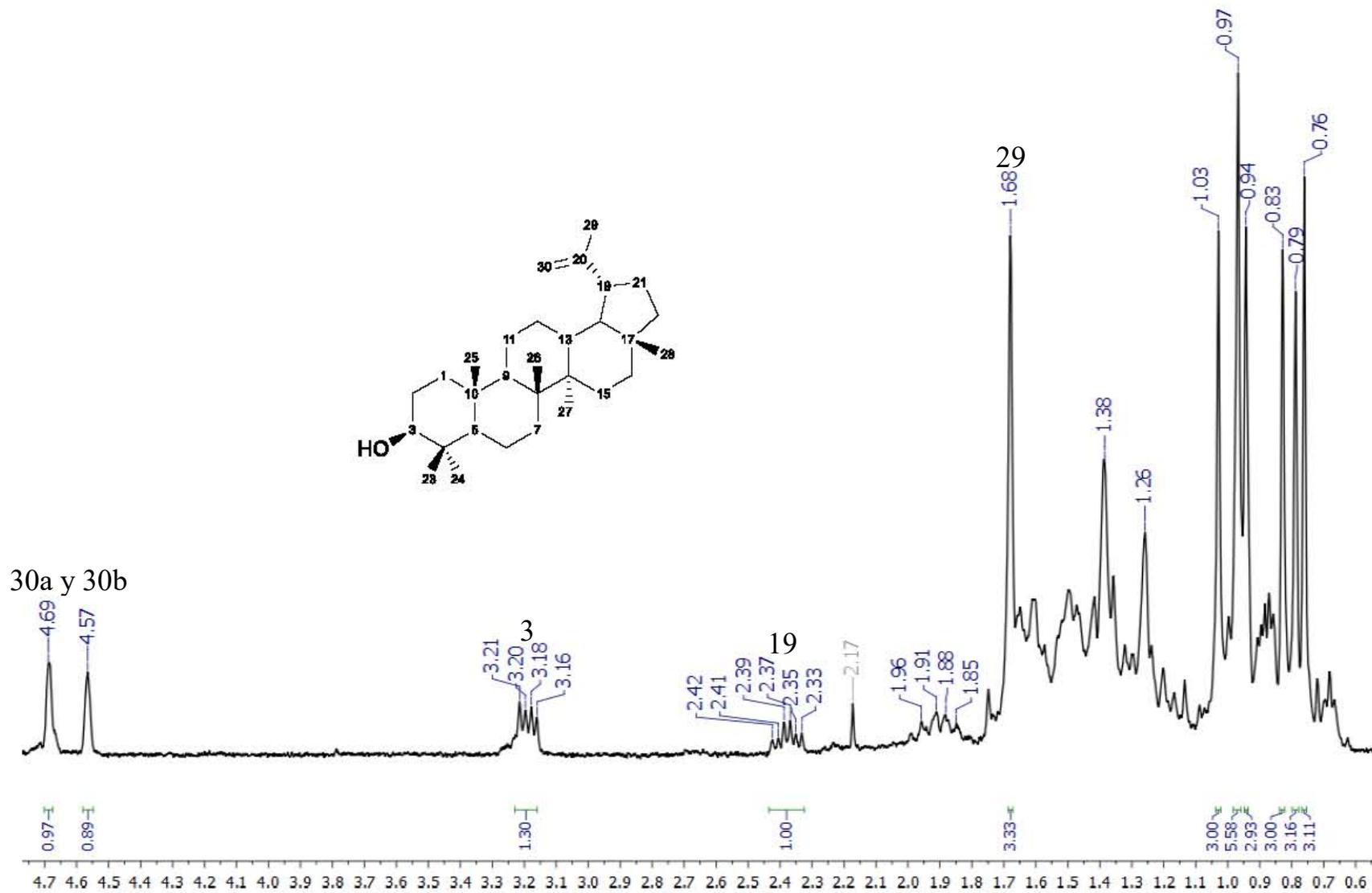


Figura 20. Espectro de RMN ^1H (CDCl₃, 300 MHz) del lupeol (21).

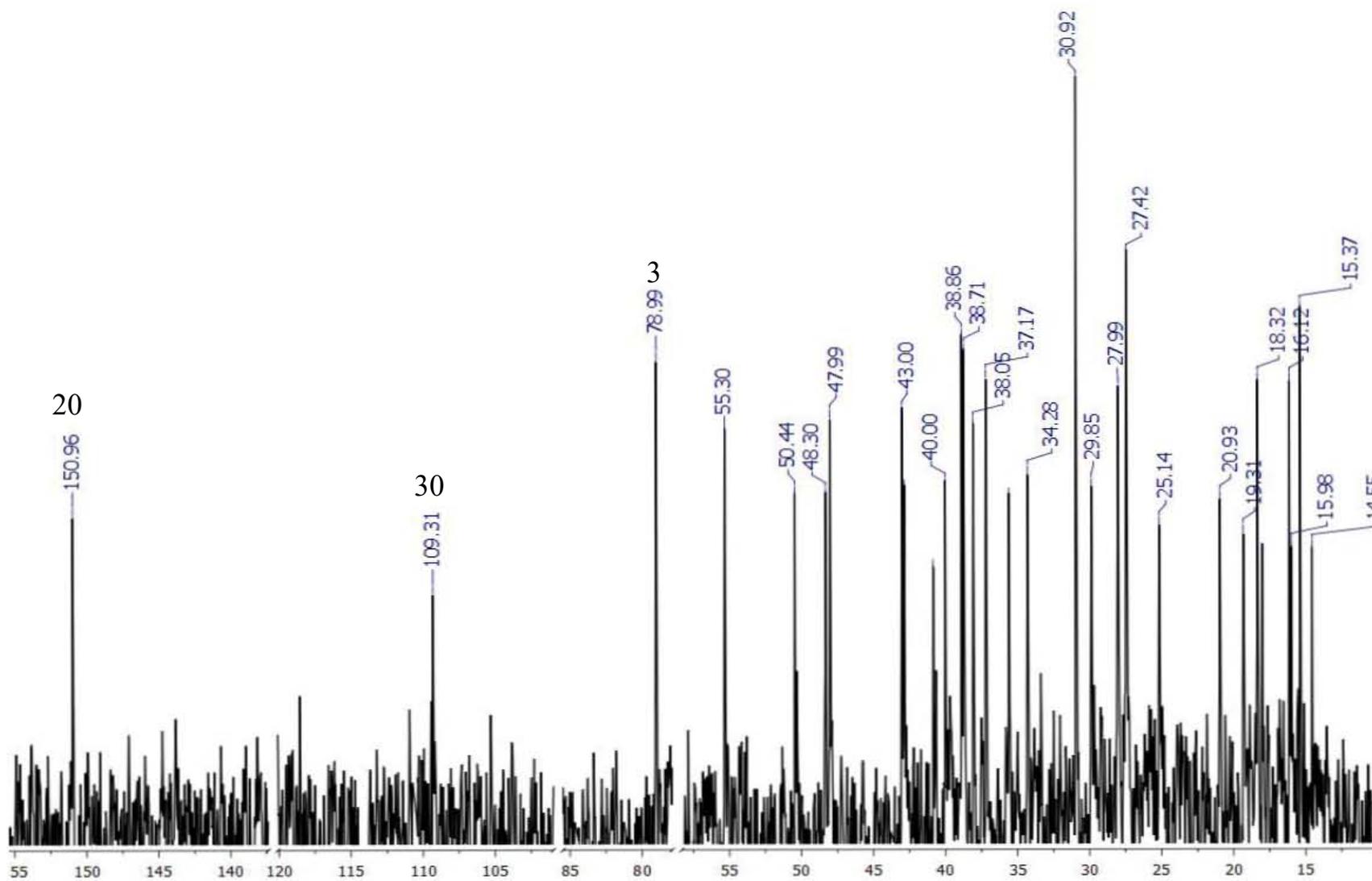


Figura 21. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) del lupeol (**21**).

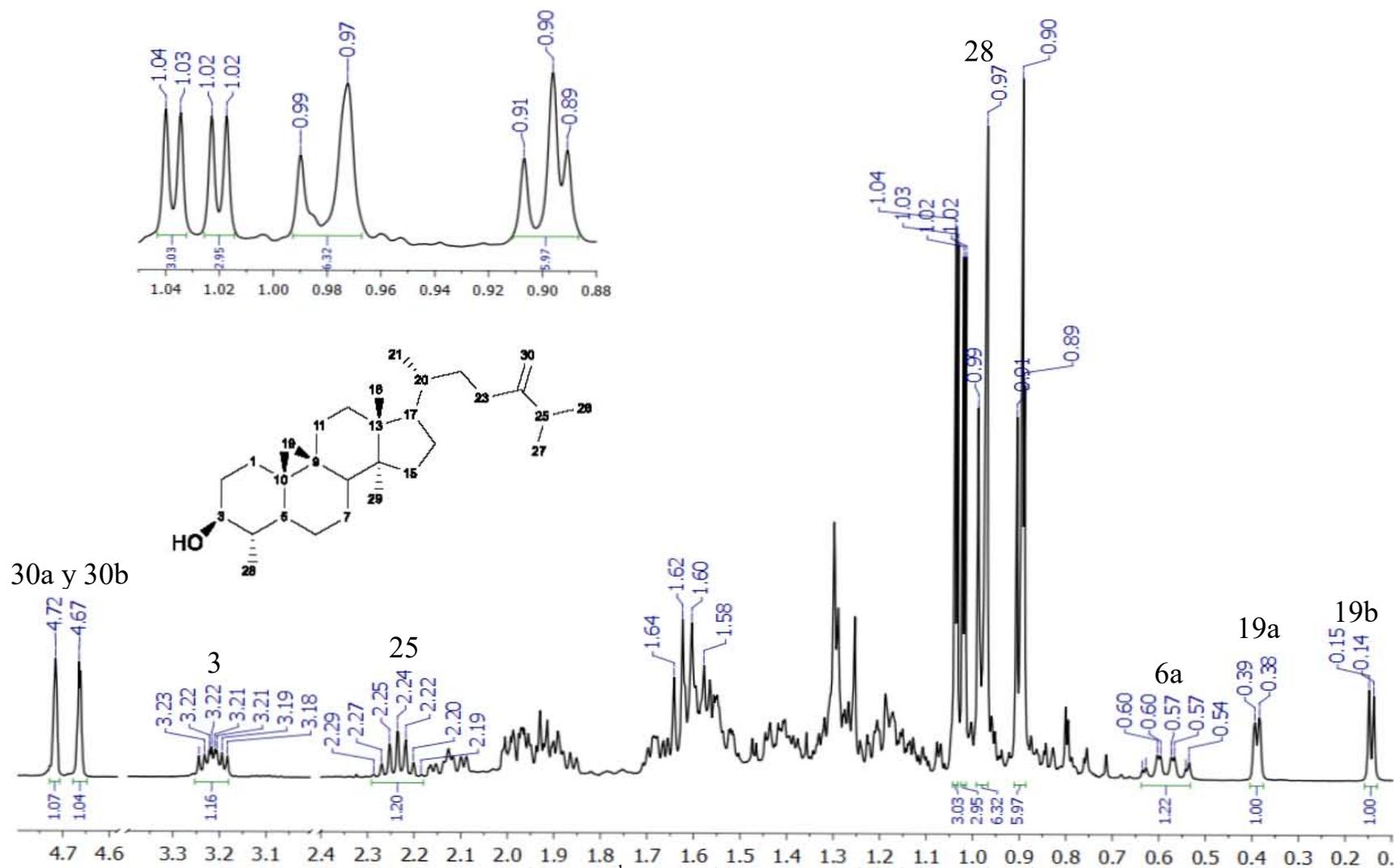


Figura 22. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del cicloeucalenol (22).

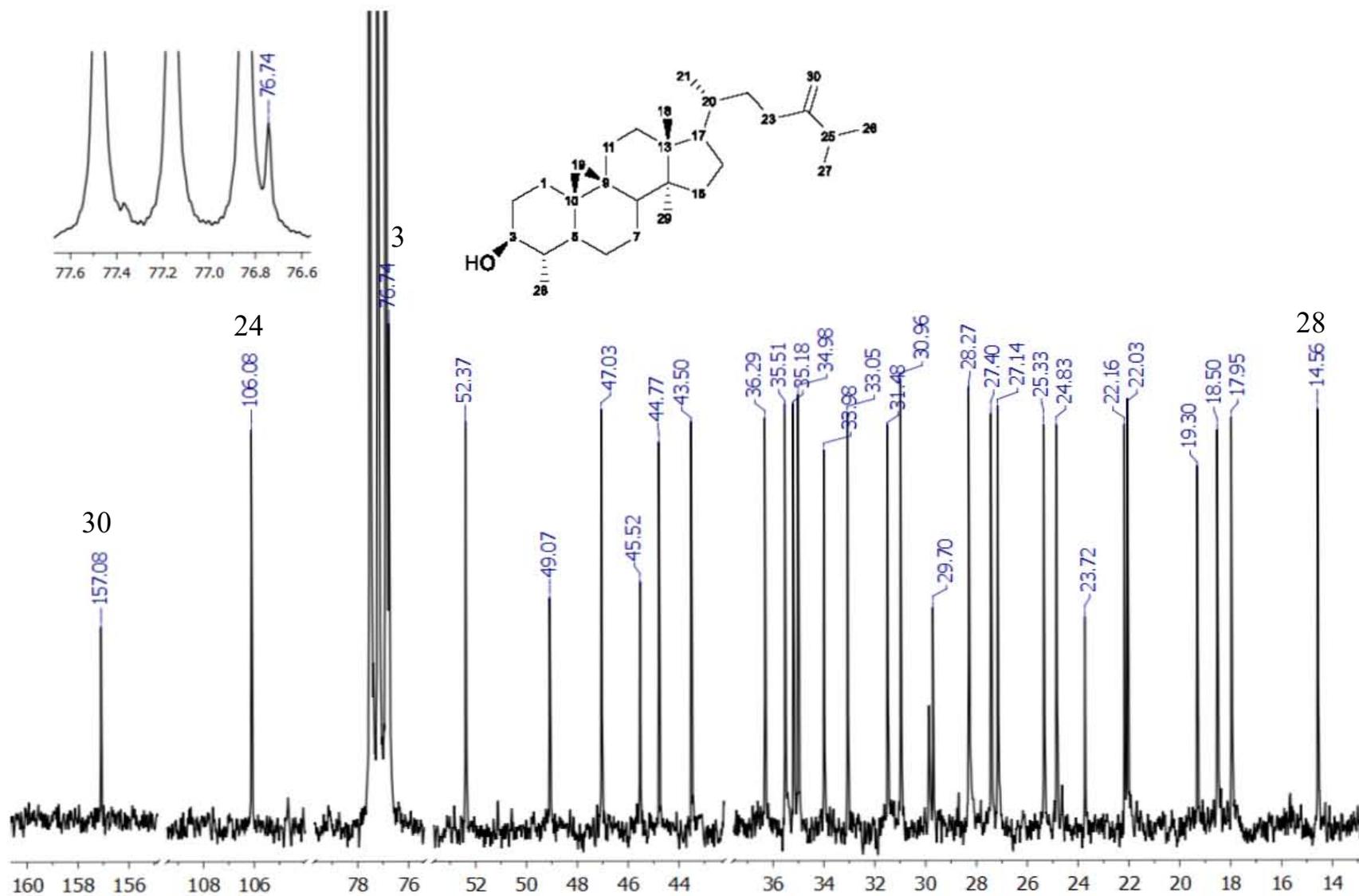


Figura 23. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) del cicloecalenol (22).

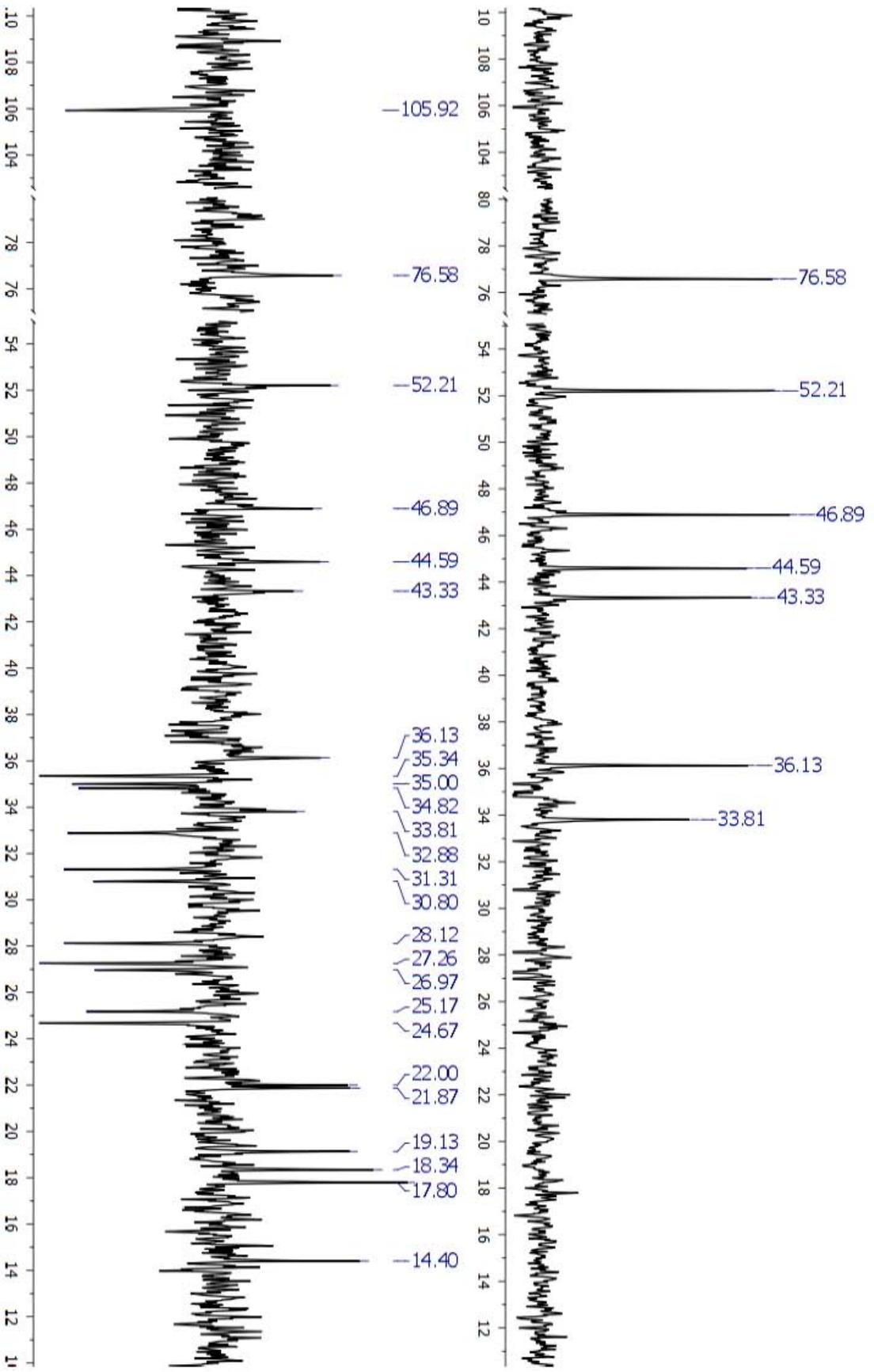


Figura 24. Espectros DEPT del ciclohexenol (22).

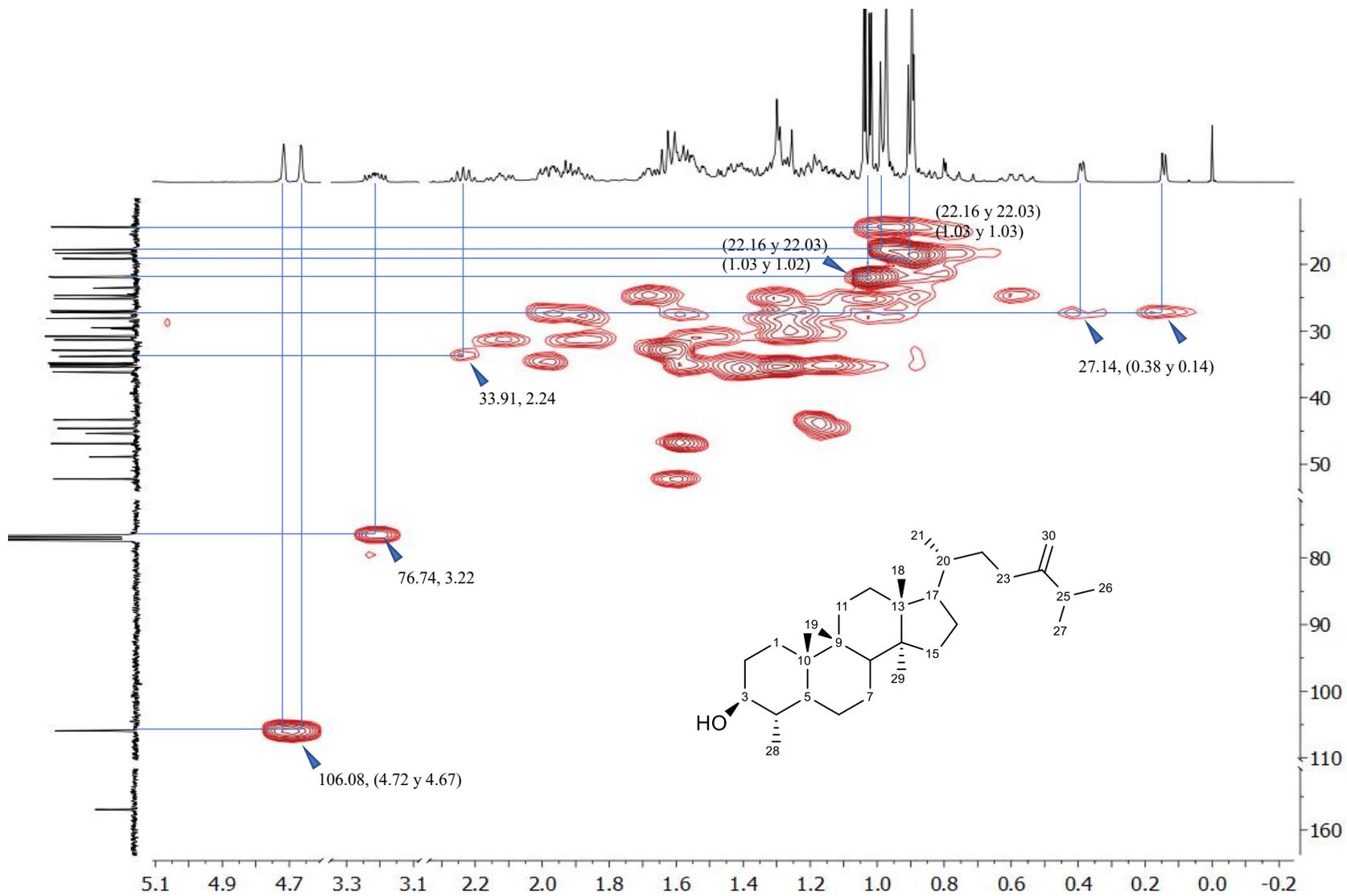


Figura 25. Espectro HSQC del cicloecalenol (22).

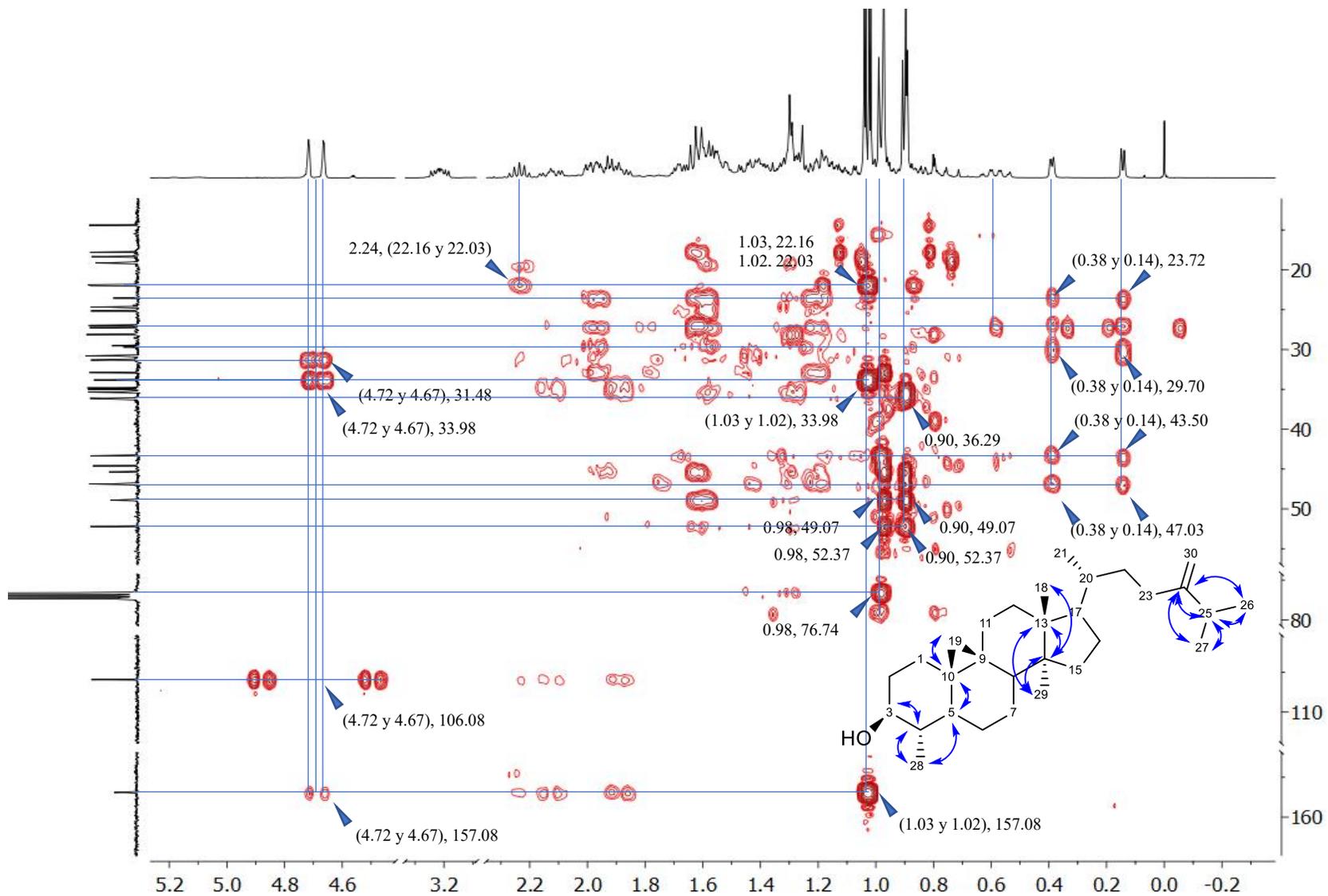


Figura 26. Espectro HMBC del cicloecalenol (22).

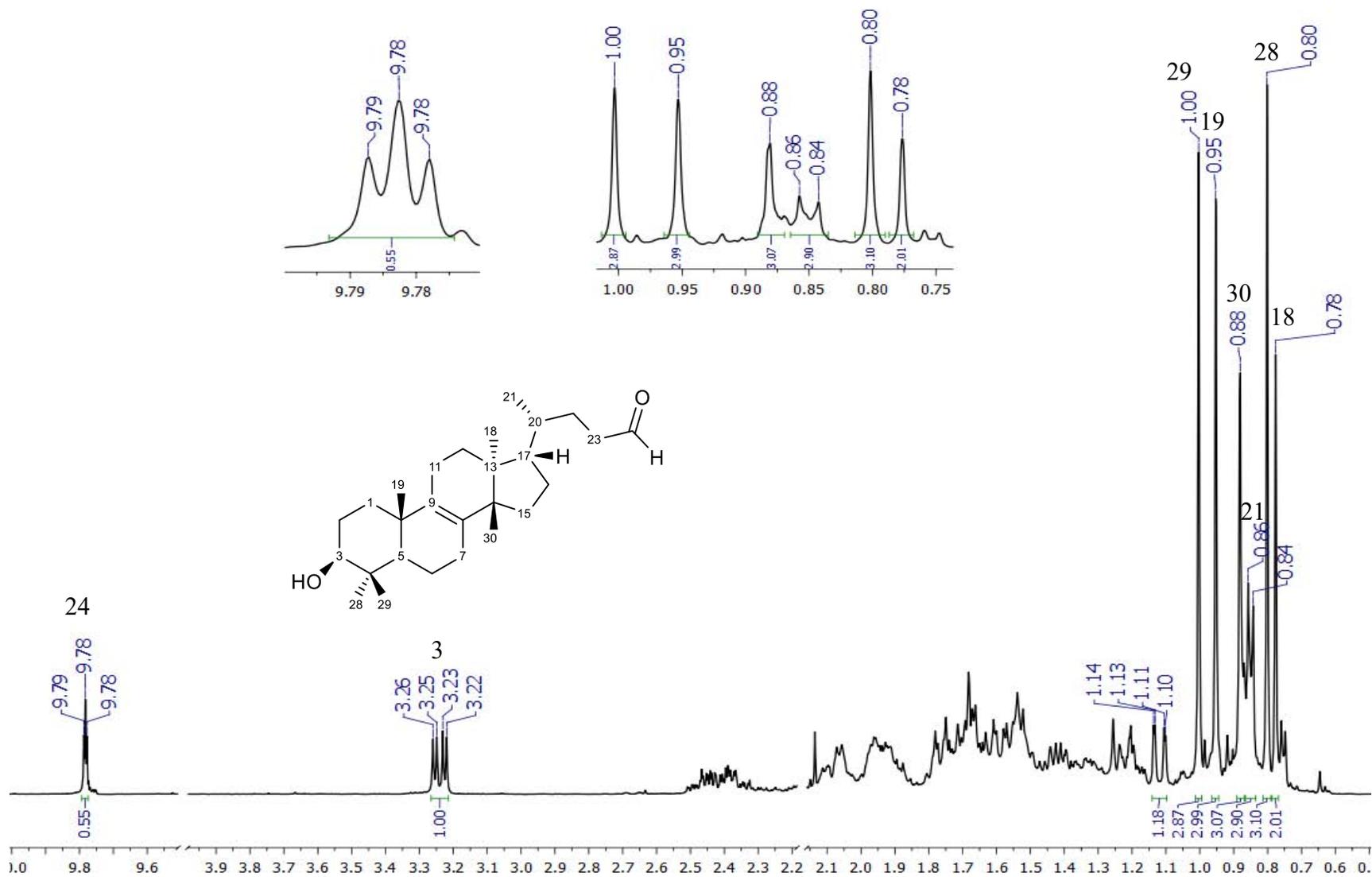


Figura 27. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del 25,26,27-trisnor-3 β -hidroxieufan-24-al (**23**).

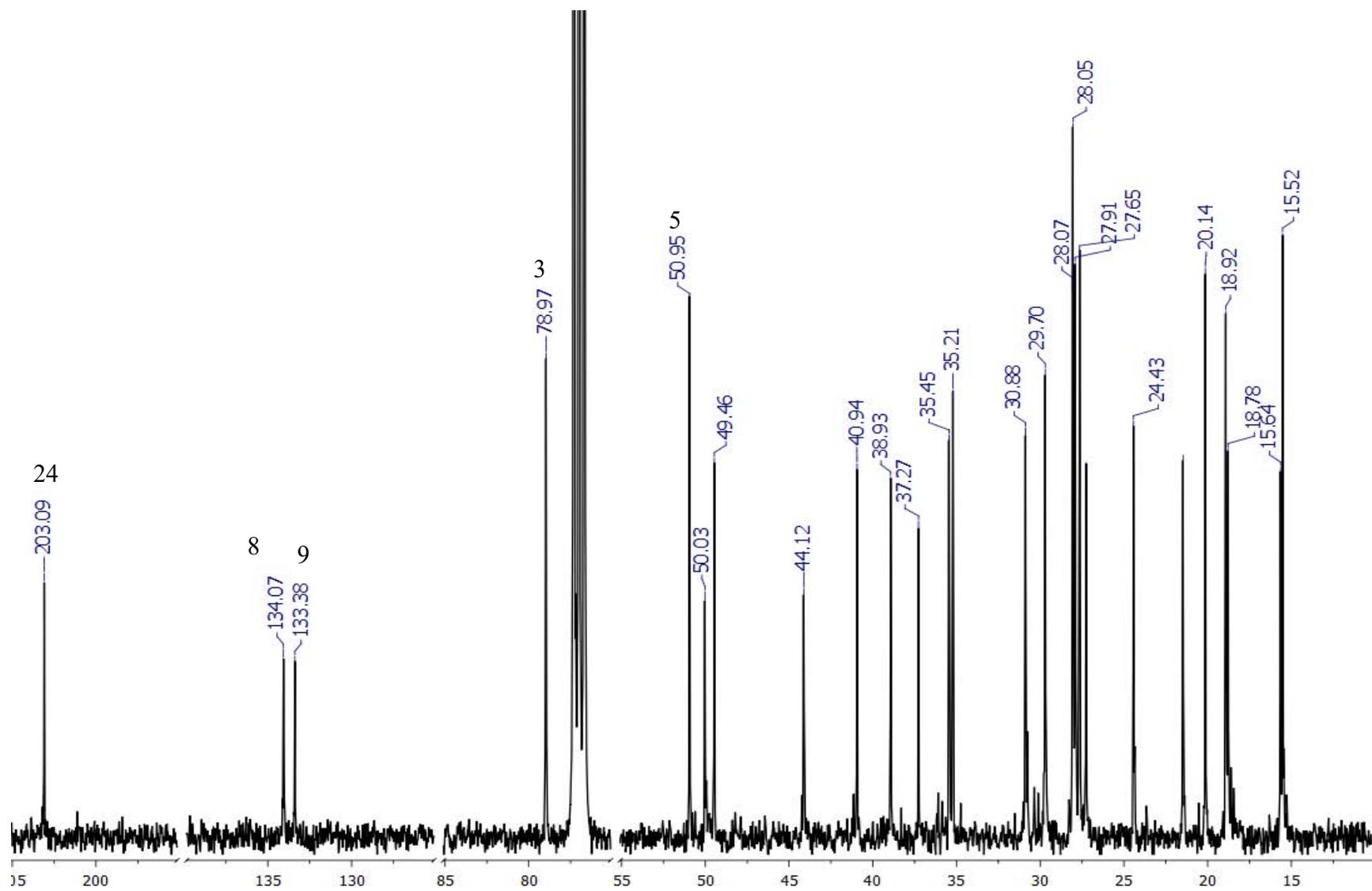


Figura 28. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de 25,26,27-*trisor*-3 β -hidroxieufan-24-al (**23**).

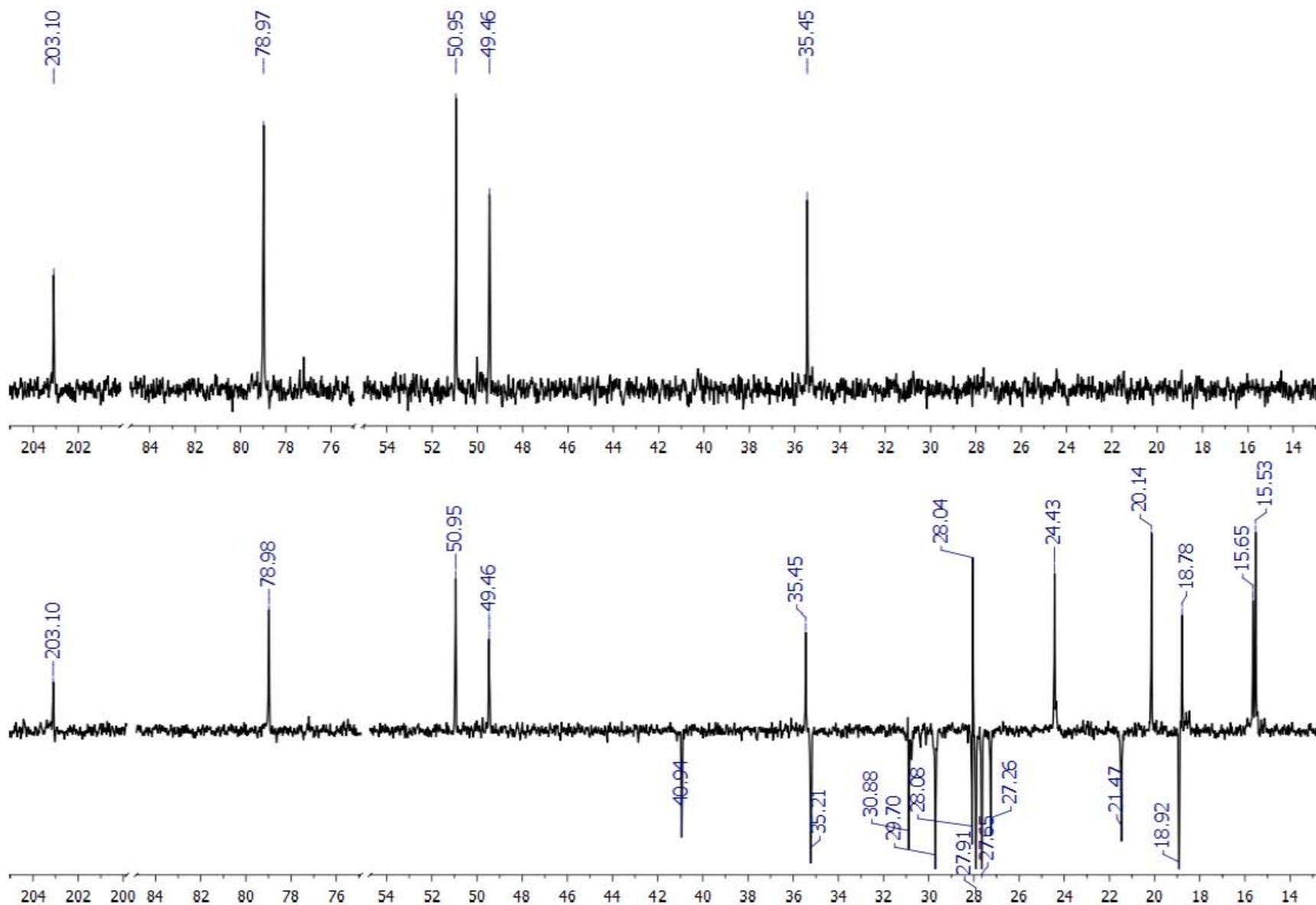


Figura 29. Espectros DEPT del 25,26,27-trisnor-3β-hidroxicufan-24-al (23).

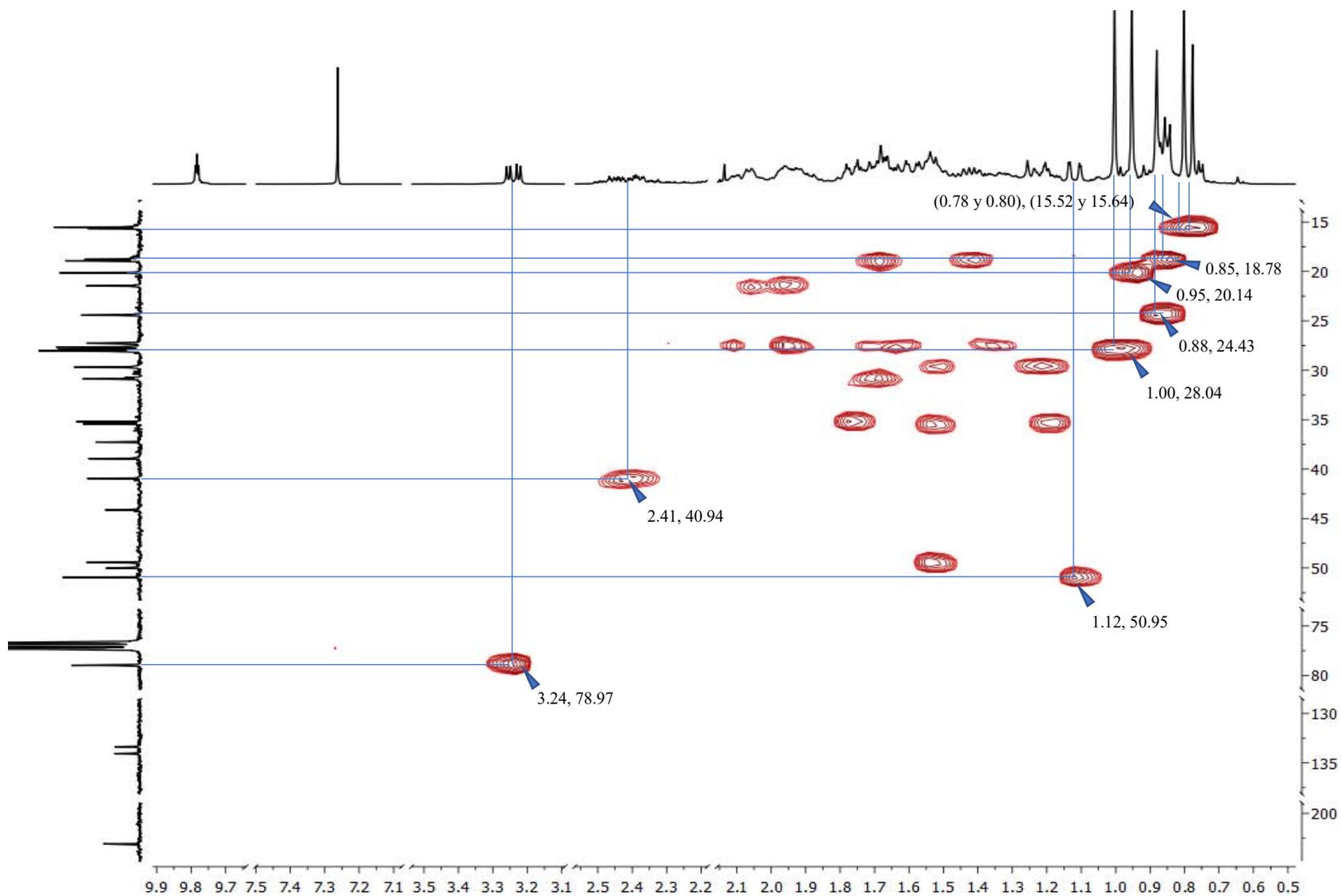


Figura 30. Espectro HSQC del 25,26,27-*trisor*-3 β -hidroxiefan-24-al (**23**).

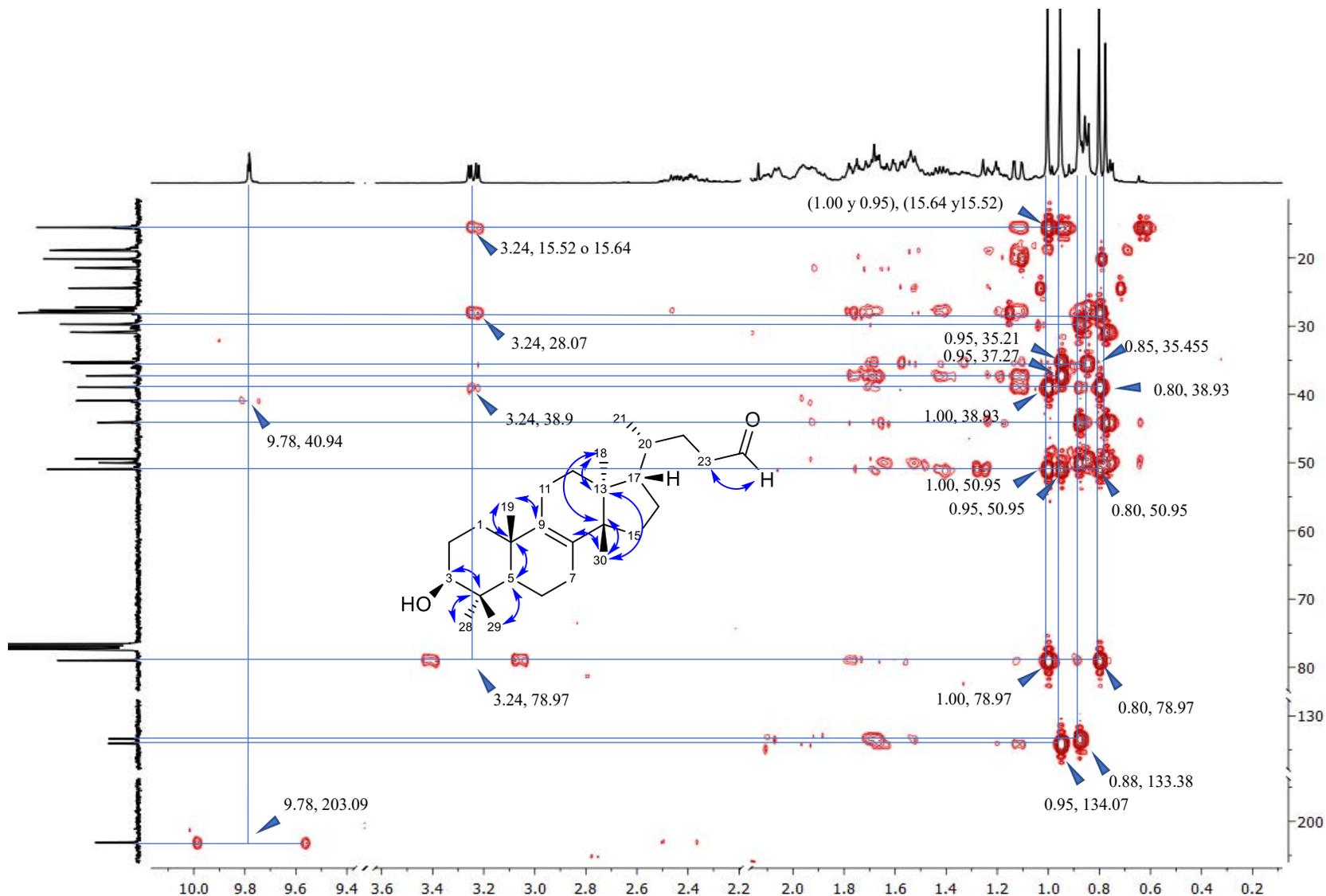


Figura 31. Espectro HMBC del 25,26,27-trisnor-3 β -hidroxiefufan-24-al (**23**).

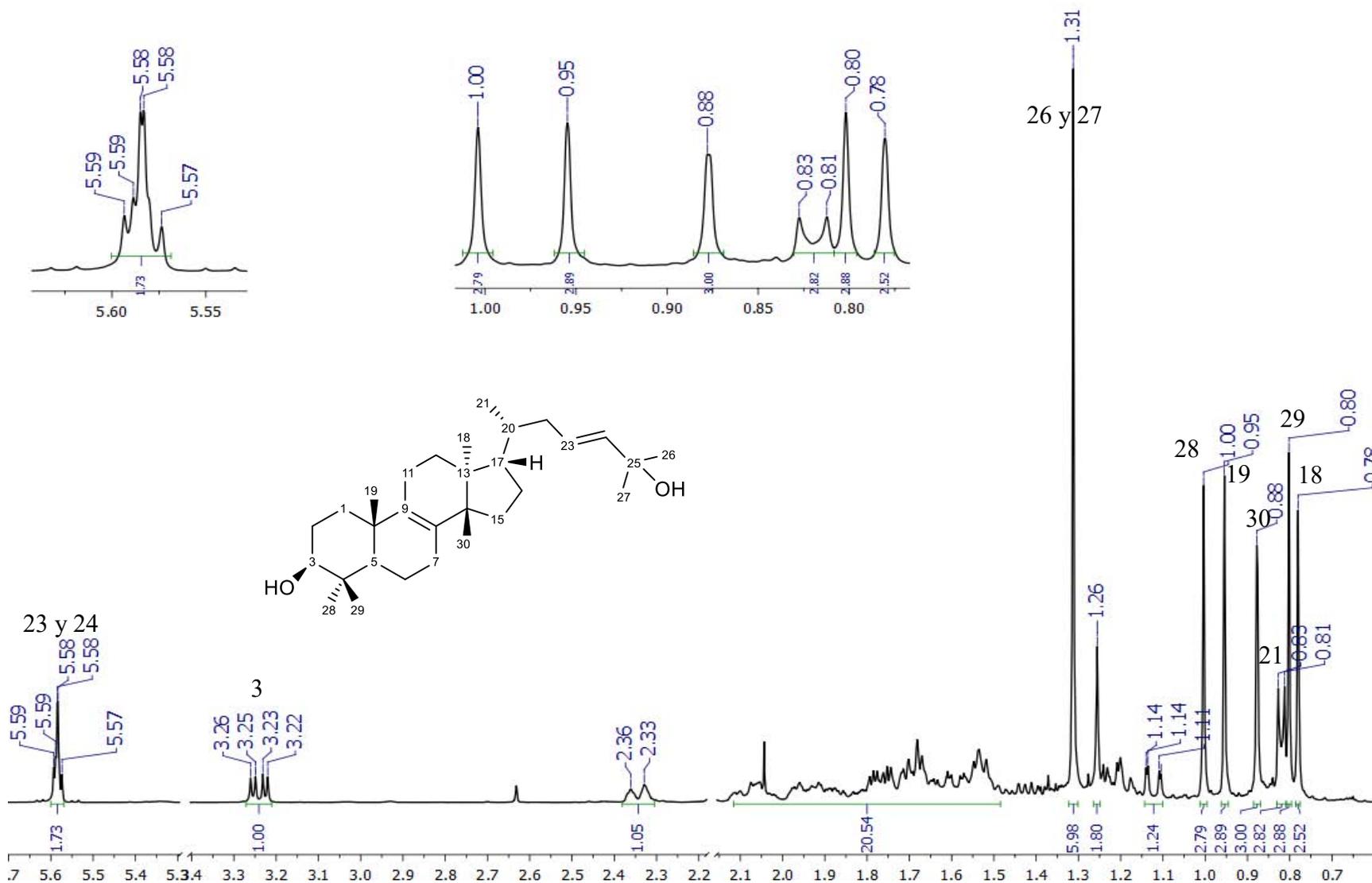


Figura 32. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) del eufa-8,23-dien-3 β ,25-diol (24).

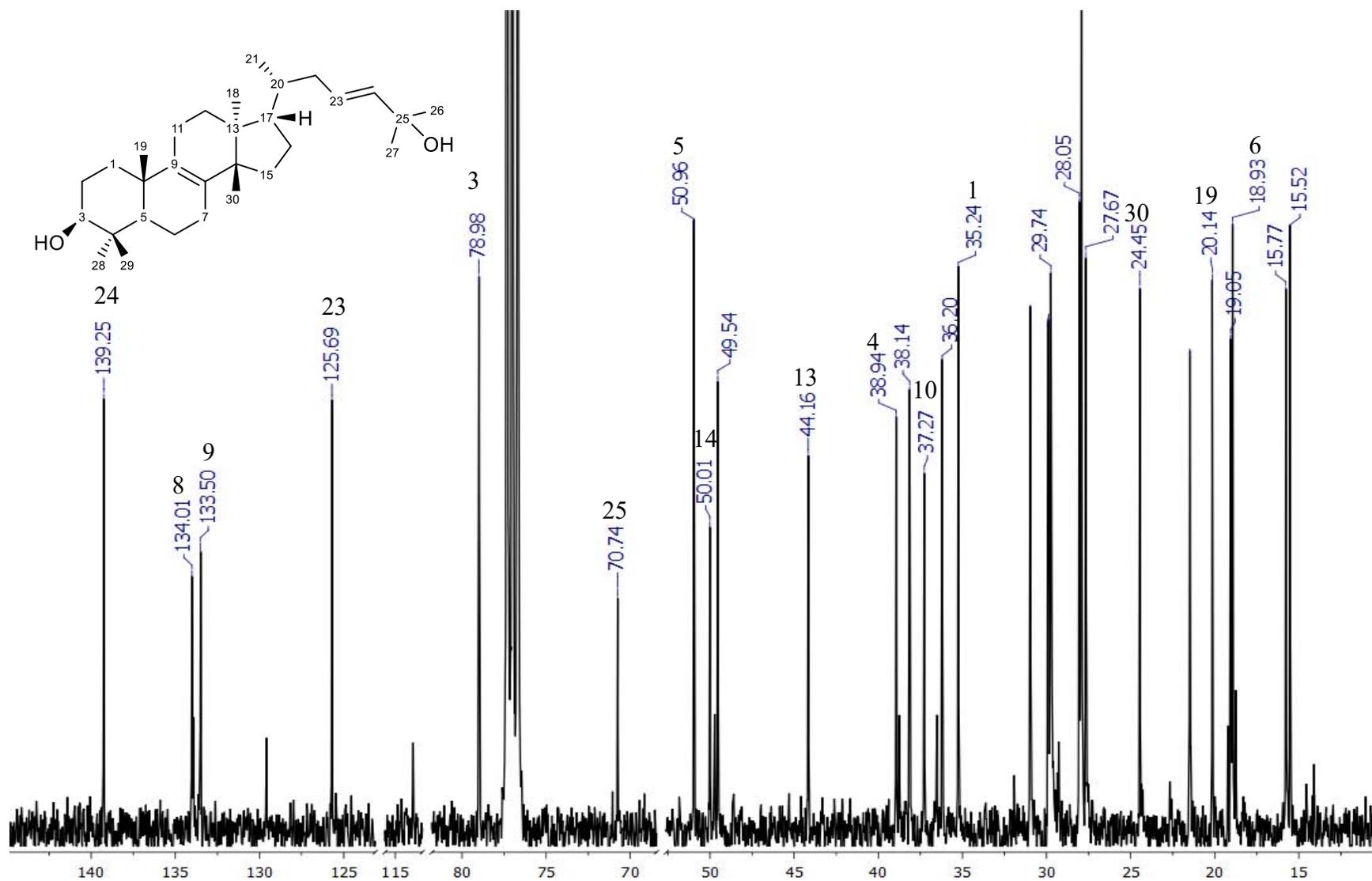


Figura 33. Espectro de RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) del eufa-8,23-dien-3β,25-diol (**24**).

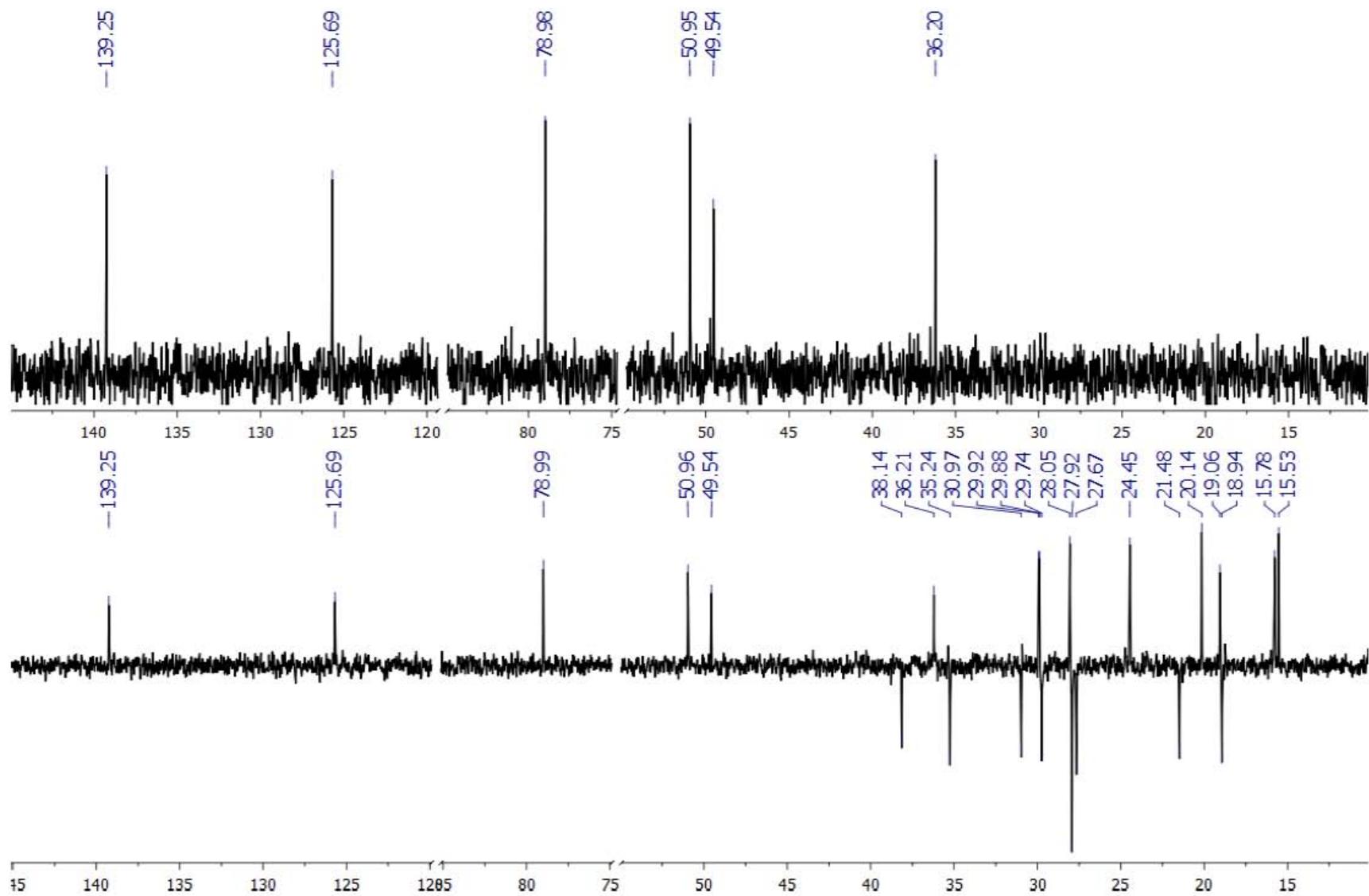


Figura 34. Espectros DEPT del eufa-8,23-dien-3β,25-diol (24).

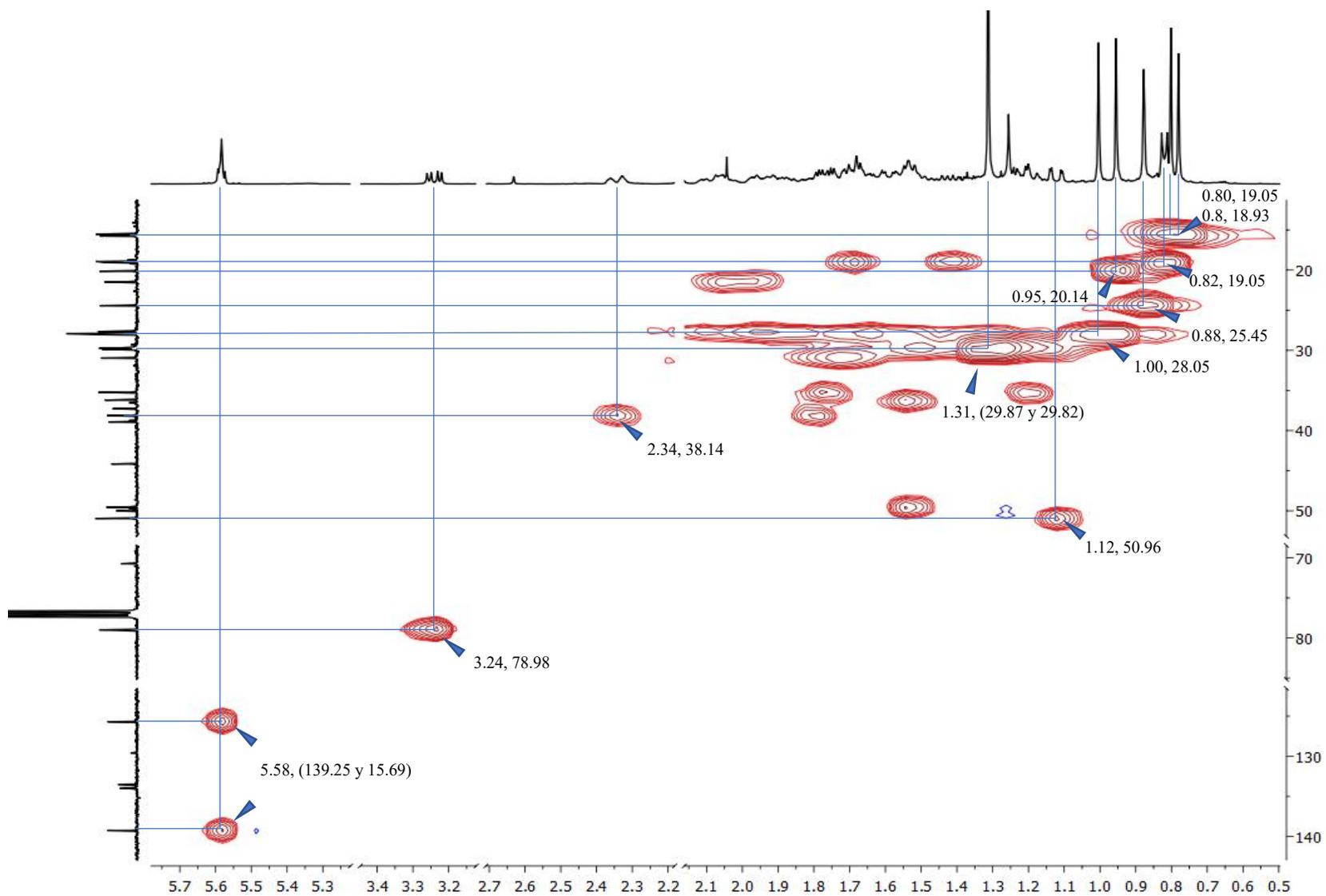


Figura 35. Espectro HSQC del eufa-8,23-dien-3 β ,25-diol (**24**).

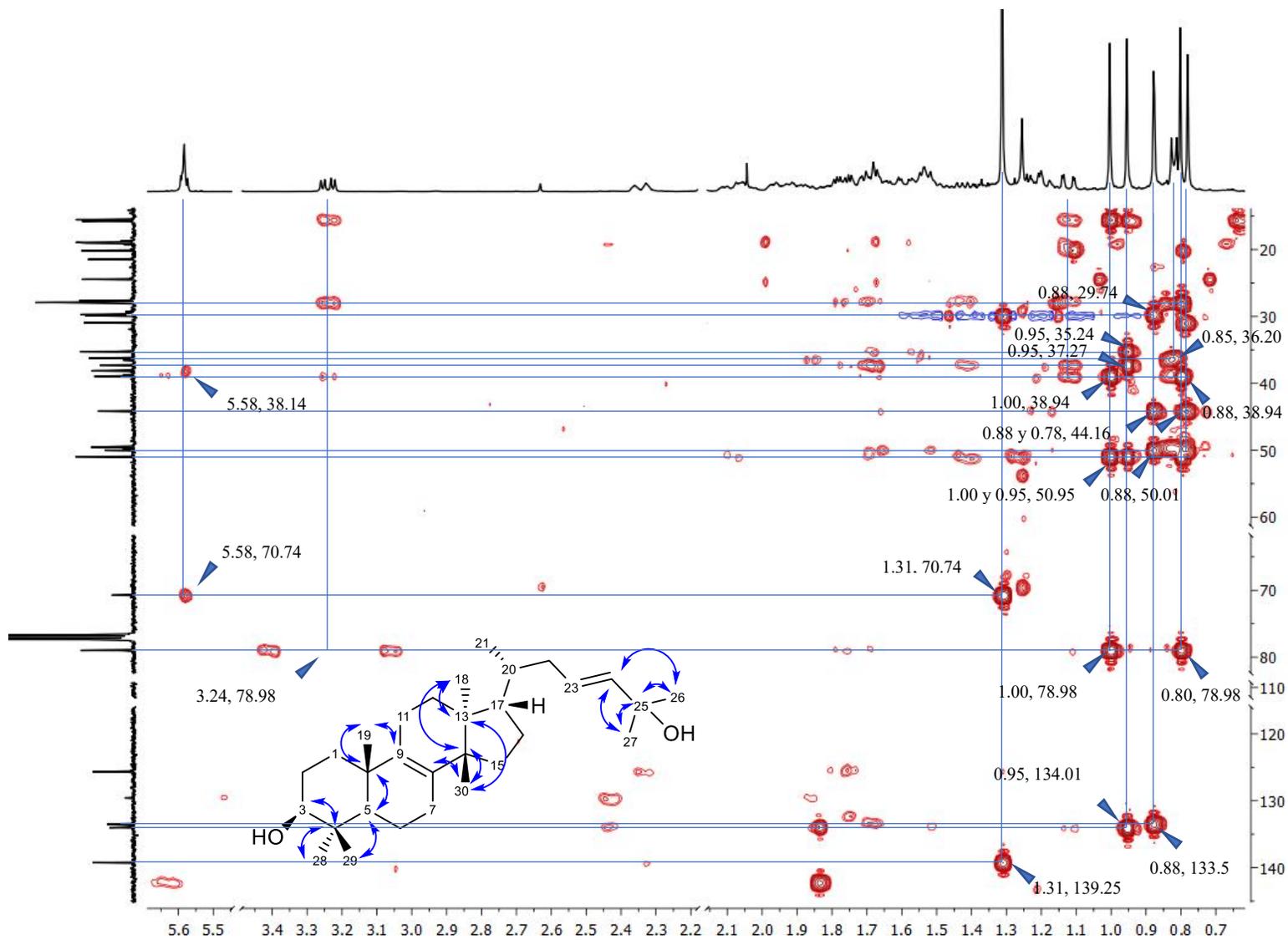


Figura 36. Espectro HMBC del eufa-8,23-dien-3 β ,25-diol (24).

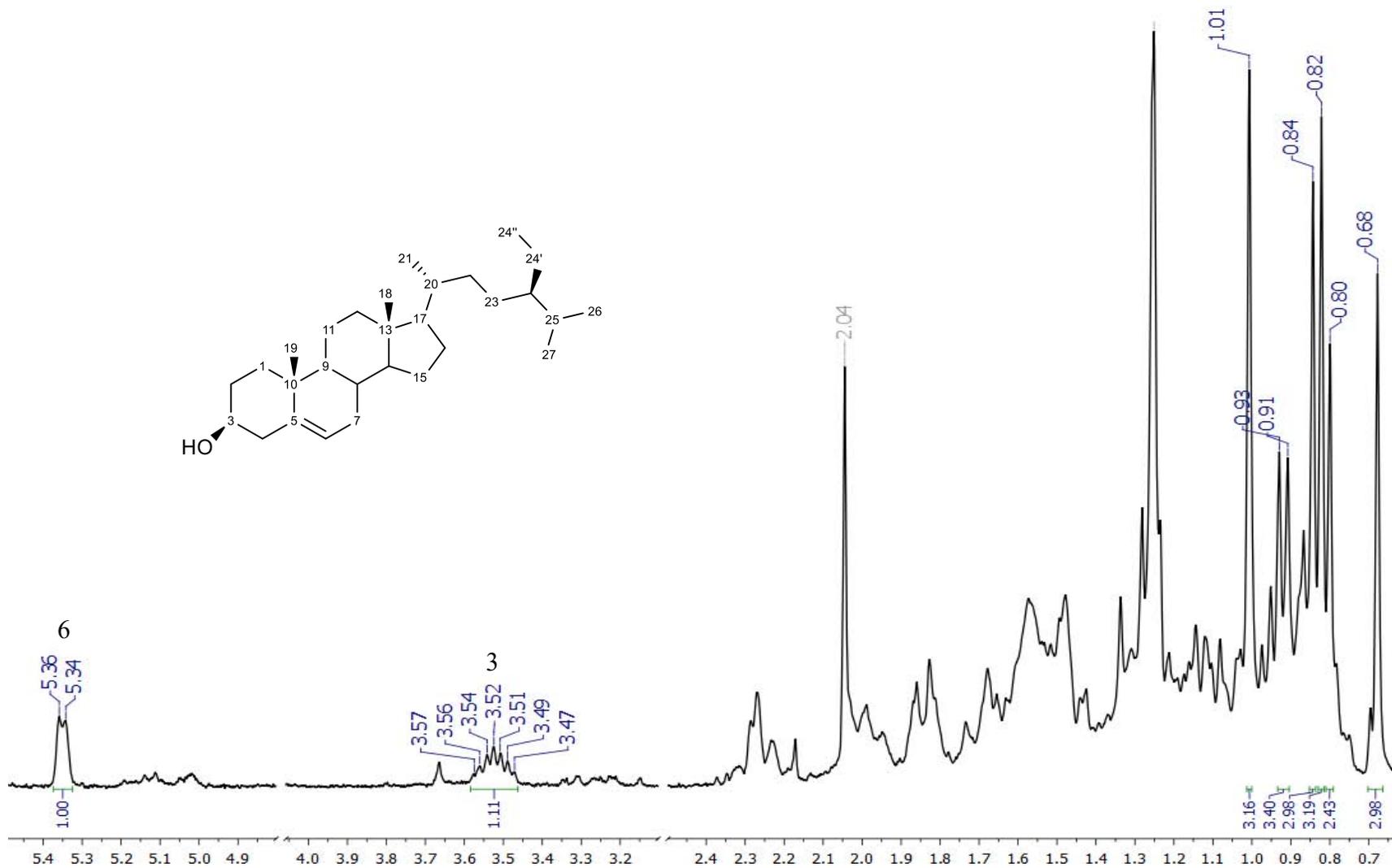


Figura 37. Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) del β-sitosterol (15).