



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

PREPARACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIONES BIOLÓGICAS
SELECTAS DE DERIVADOS SEMISINTÉTICOS DEL PRODUCTO NATURAL

EUFOL

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. LUIS JESÚS ROMERO MORÁN

ASESOR

DR. GUILLERMO DELGADO LAMAS
INSTITUTO DE QUÍMICA

CIUDAD DE MÉXICO, AGOSTO 2023



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**PREPARACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIONES BIOLÓGICAS SELECTAS
DE DERIVADOS SEMISINTÉTICOS DEL PRODUCTO NATURAL EUFOL**

**T E S I S
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. LUIS JESÚS ROMERO MORÁN

**DR. GUILLERMO DELGADO LAMAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**



Ciudad de México, agosto 2023

JURADO

Presidente: Dr. Manuel Jiménez Estrada (Instituto de Química).

Vocal: Dra. Laura Patricia Álvarez Berber (UAE-Morelos).

Vocal: Dr. José Alfredo Vázquez Martínez (Facultad de Química).

Vocal: Dr. Alfonso Sebastián Lira Rocha (Facultad de Química).

Secretario: Dr. Ricardo Jorge Cárdenas Pérez (Instituto de Química).

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. Guillermo Delgado Lamas.

Parte de los resultados de este trabajo fueron presentados en los siguientes eventos:

- Simposio Virtual del Instituto de Química, 4 de diciembre de 2020. Ciudad de México.
- 17a Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales (modalidad híbrida), de la AMIPRONAT, el 20 de mayo de 2022. Monterrey, Nuevo León (presentación virtual).

Publicación: Romero-Morán, L. J.; Ramírez-Apan, M. T.; Hernández-Ortega, S.; Martínez-Otero, D.; Delgado, G. *Trisnor-Euphane-Type Triterpenoid and Other Constituents Isolated from *Euphorbia tanquahuete* Sessé & Moc.: Preparation and Cytotoxic Evaluation of Semisynthetic Derivatives of Euphol.* *ACS Omega* **2022**, 7(39), 35077-35082.

M. en C. Luis Jesús Romero Morán

Sustentante

Dr. E. Guillermo Delgado Lamas

Tutor

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (becario 651375) y a la DGAPA UNAM (PAPIIT IG200821) por las becas otorgadas.

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

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

Al Dr. E. Guillermo Delgado Lamas por su paciente asesoría en el desarrollo de este proyecto.

Al personal técnico académico del Instituto de Química: a la M. en C. Elizabeth Huerta Salazar, la Dra. María Isabel Chávez Uribe, a la M. en C. Ángeles Peña González, a la Dra. Beatriz Quiroz García, al Dr. Rubén Luis Gaviño Ramírez de los Laboratorios de Resonancia Magnética Nuclear. A la QFB María del Rocío Patiño Maya[†], y a la Dra. Adriana Romo 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, por las bioevaluaciones de los productos naturales y de los derivados.

A los miembros del Comité Tutor: Dr. Francisco Hernández Luis, Dr. Ricardo Jorge Cárdenas Pérez y Dr. Guillermo Delgado Lamas.

A los miembros del jurado: Dr. Manuel Jiménez Estrada, Dra. Laura Patricia Álvarez Berber, Dr. José Alfredo Vázquez Martínez, Dr. Alfonso Sebastián Lira Rocha, Dr. Jorge Ricardo Jorge Cárdenas Pérez, por dedicar parte de su valioso tiempo a la revisión de esta tesis.

A mis compañeras de laboratorio: M. en C. Yesica R. Cruz Martínez y M. en C. Lady Olivia Pérez Valera, por su apreciado apoyo durante el doctorado y por asesorarme con el uso del cromatógrafo de líquidos.

A Perla; a mis padres, Arcelia y Luis; y a mi tío Enrique.

Contenido

Contenido	3
RESUMEN	5
ABSTRACT	5
CAPÍTULO 1.	
INTRODUCCIÓN	7
CAPÍTULO 2.	
ANTECEDENTES	9
2.1 Generalidades del eufol	9
2.2 Actividad biológica del eufol	12
2.3 Derivados semisintéticos de triterpenos	13
2.3.1 Actividad biológica de los derivados de triterpenos	18
2.3.2 Derivados del eufol informados en la literatura.	21
CAPÍTULO 3.	
JUSTIFICACIÓN, OBJETIVOS E	21
HIPÓTESIS	21
3.1 Justificación	21
3.2 Hipótesis	21
3.3 Objetivo general	22
3.4 Objetivos específicos	22
CAPÍTULO 4	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
4.1 Preparación de los derivados semisintéticos del eufol	23
4.2 Caracterización de los derivados semisintéticos del eufol	27
4.3 Determinación de la estructura cristalina por DRX de los derivados 17 y 21.	29
4.4 Actividad biológica de los derivados	30
4.4.1 Actividad antiproliferativa contra líneas celulares cancerosas	33
4.4.2 Inhibición de la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2)	35
4.4.3 Inhibición de la formación del complejo Spike-ACE2	37
CAPÍTULO 5.	
CONCLUSIONES	38
CAPÍTULO 6.	
SECCIÓN EXPERIMENTAL	39
6.1 Información general	39
6.2 Material vegetal	39
6.2.1 Aislamiento de la materia prima	43
6.3 Preparación de derivados semisintéticos	40

CAPÍTULO 7.	
REFERENCIAS	47
CAPÍTULO 8.	
ANEXO: ESPECTROS	52

RESUMEN

El producto natural euphol fue aislado de las partes aéreas de *Euphorbia tanquahuete* Sessé & Moc. y fue usado como materia prima para preparar una serie de derivados semisintéticos mediante reacciones químicas. Algunos de estos derivados no habían sido informados anteriormente y otros fueron caracterizados espectroscópicamente por primera vez. Se realizaron evaluaciones biológicas selectas de estos derivados *in vitro*: inhibición del crecimiento de células cancerosas humanas, inhibición de la enzima proinflamatoria COX-2, y evaluación de la actividad anti-Covid por inhibición de la formación del complejo Spike-ACE2. Con respecto a la actividad citotóxica, los compuestos **14**, **17** y **23** fueron los más activos contra la línea de leucemia mielógena (K652). Con respecto a la actividad de inhibición de COX-2, los compuestos **14**, **17** y **23** resultaron con mayor actividad. Finalmente, el compuesto **23** fue el más activo en el ensayo anti-Covid. Los resultados indican que la variación estructural tanto en el anillo A como en la cadena lateral del euphol, mostraron variaciones significativas en las actividades biológicas evaluadas. Estos resultados indican la importancia de investigación adicional en la búsqueda de compuestos antiproliferativos con bioactividad selectiva.

ABSTRACT

The natural product euphol was isolated from the aerial parts of *Euphorbia tanquahuete* Sessé & Moc. and was used as starting material for the preparation of a series of semisynthetic derivatives by chemical reactions. Some of these derivatives have not been previously reported, others were characterized spectroscopically for the first time. Selected biological activities were screened *in vitro* for these derivatives: growth inhibition of cancerous human cells, inhibition of the pro-inflammatory enzyme COX-2, and screening of anti-Covid activity by inhibition of the formation of the complex Spike-ACE2. Regarding the cytotoxic activity, the compounds **14**, **17** and **23** were the most active against the myelogenous leukemia cell line (K562). Regarding the COX-2 inhibition activity, the compounds **14**, **17** y **23** exhibited more activity. Finally, the compound **23** was the most active in the anti-Covid screening. The structural modification in both the A ring and in the side chain of euphol, showed significant variations in the evaluated biological activities. These results indicate the importance of further investigation in the search of antiproliferative compounds with selective bioactivity.

CAPÍTULO 1.

INTRODUCCIÓN

Una de las estrategias usadas para encontrar nuevos compuestos químicos con propiedades biológicas sobresalientes, consiste en la modificación de la estructura molecular de una sustancia química conocida que ya tenga alguna propiedad biológica interesante. De esta forma, se obtienen nuevos compuestos químicos que son derivados del original y que, idealmente, tendrían mejores propiedades. Esta estrategia se basa en que las propiedades de los compuestos químicos están estrechamente relacionadas con su estructura molecular, por lo que la modificación de la estructura altera también las propiedades fisicoquímicas y biológicas. En la literatura científica química hay abundantes ejemplos de esto.

Cuando se trata de compuestos con propiedades terapéuticas, como un fármaco o un producto natural, un caso de éxito sería encontrar un derivado sin efectos adversos y con mejor efecto terapéutico. Un ejemplo ilustrativo es el del ácido salicílico, producto natural aislado del sauce (*Salix alba*) y su derivado semisintético, el ácido acetilsalicílico (aspirina, Figura 1). El ácido salicílico tiene propiedades contra la inflamación, el dolor y la fiebre, pero es un irritante de la mucosa estomacal. El ácido acetilsalicílico tiene las mismas propiedades, pero con este efecto adverso aminorado.

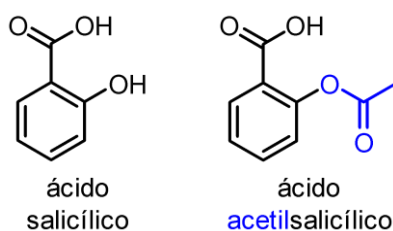


Figura 1. Estructura molecular del producto natural ácido salicílico y su derivado acetilado.

Si bien esta estrategia es simple, está respaldada porque no es posible predecir con precisión todas las propiedades de un compuesto químico sólo a partir de su estructura molecular. Es preciso tener al compuesto químico materialmente para poder investigar sus propiedades, dado que los modelos predictivos que existen hasta ahora están lejos de reemplazar a los métodos experimentales.

Introducción

El eufol es un producto natural encontrado frecuentemente en plantas del género *Euphorbia*. Este género, en el que se encuentran clasificadas alrededor de 2000 especies, es uno de los más grandes de la familia Euphorbiaceae, y a su vez, uno de los más grandes del reino vegetal. Entre las plantas más conocidas de este grupo se encuentra la nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*), de uso ornamental. También en esta familia se encuentran plantas de interés comercial, como *Euphorbia antisyphilitica*, de la cual se extrae la cera de la candelilla usada en las industrias cosmética y alimentaria.¹ Dentro de la familia Euphorbiaceae se encuentra también la especie *Jatropha curcas*, de cuyas semillas se extrae un aceite utilizado para la producción de biodiesel.²

Al estudiar el contenido químico de la planta conocida popularmente como pegahueso (*Euphorbia tanquahuete*), uno de los hallazgos fue que el eufol es el constituyente químico mayoritario, y que se encuentra en cantidades suficientes para considerar a esta planta una fuente relativamente abundante de este producto natural. En la literatura se encuentran varios informes sobre el eufol y sus actividades biológicas, entre las que destacan la actividad antitumoral, antiinflamatoria y antinociceptiva, entre otras. Estas actividades, junto con el hallazgo de que el eufol es el constituyente mayoritario, podrían correlacionarse con el uso popular de esta planta para tratar fracturas óseas, ya que podría aminorar el dolor y la inflamación.

Al haber encontrado una fuente natural relativamente abundante del compuesto natural bioactivo eufol, en este trabajo se utilizó esta sustancia como material de partida para la preparación de derivados semisintéticos. Para este fin se realizaron modificaciones en la estructura molecular del eufol mediante reacciones químicas. Complementariamente, fueron evaluadas algunas actividades biológicas de los derivados. Los resultados obtenidos representan aportaciones al conocimiento de la química de los productos naturales presentes en la vegetación de nuestro país y de ciertas propiedades biológicas, tanto de las sustancias naturales como la de los derivados semisintéticos preparados, y constituye una contribución a la relación entre la estructura química de las sustancias y su bioactividad.

¹ Aranda-Ledesma, N. E. *et al.* *LWT – Food. Sci. Technol.* **2022**, *159*, 113170.

² Ruatpuia, J. V. L. *et al.* *Renewable Energy* **2023**, *206*, 597–608.

CAPÍTULO 2.

ANTECEDENTES

2.1 Generalidades del eufol

El eufol (**1**, Figura 2) es un triterpeno aislado principalmente de ciertas plantas de la familia Euphorbiaceae, y es el metabolito secundario más abundante en el látex de varias especies del género *Euphorbia*. Cabe señalar que este grupo de plantas incluye alrededor de 2000 especies y es el género más grande de la familia Euphorbiaceae.^{3,4}

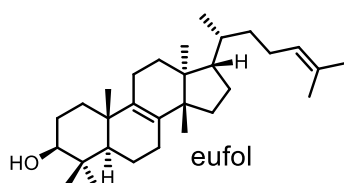


Figura 2. Estructura molecular del eufol (**1**).

El eufol fue aislado y descrito por primera vez por Newbold y Spring en 1944.⁵ Dado que el eufol tiene treinta átomos de carbono, y su estructura está conformada por tres ciclos de seis miembros y uno de cinco miembros, se clasifica como un triterpeno tetracíclico.

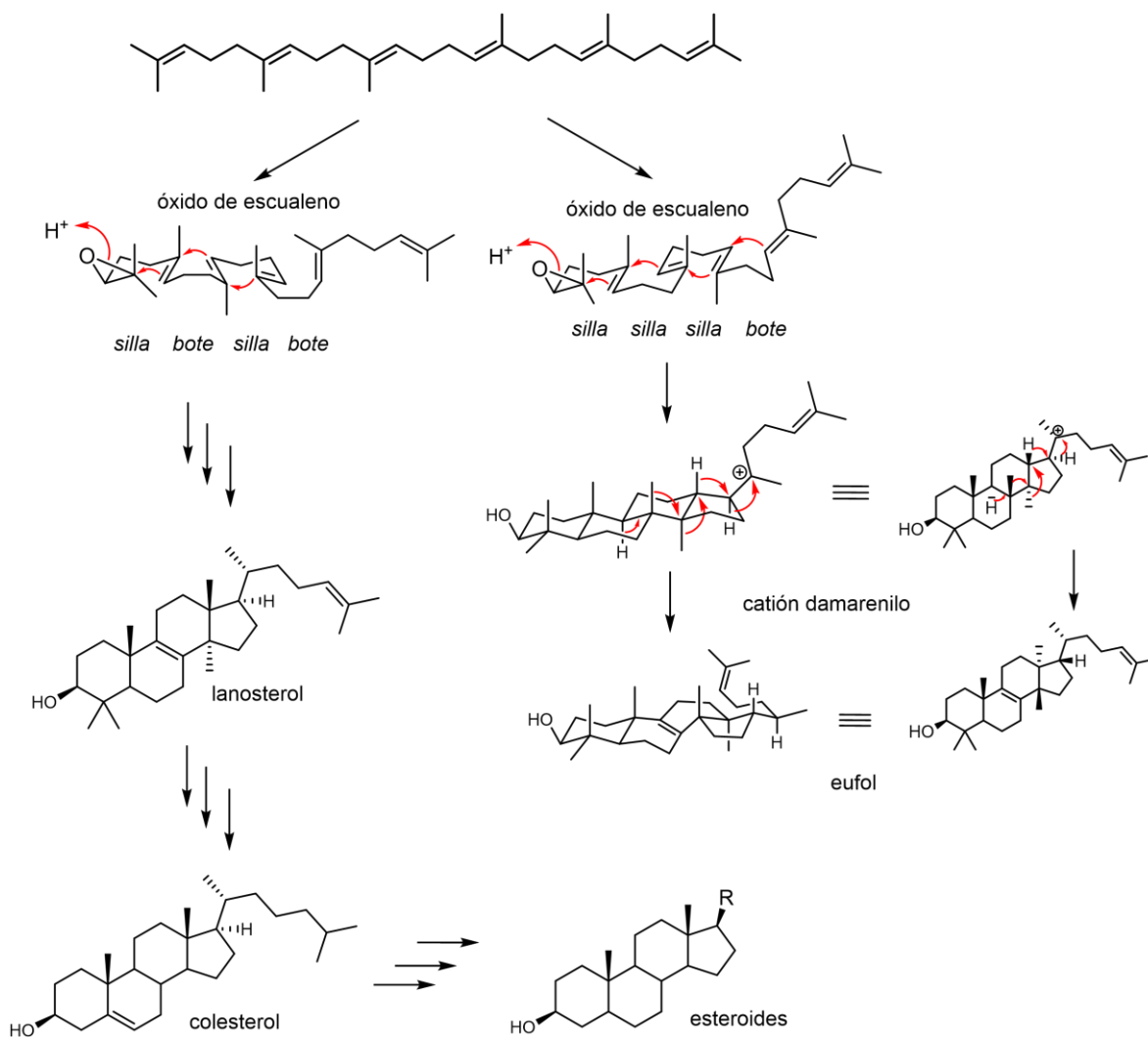
Al igual que para otros terpenos, la biosíntesis del eufol ocurre mediante la ruta del acetato/mevalonato y su precursor biosintético es el escualeno. Específicamente, el epóxido de escualeno es la forma activa de este compuesto. En el Esquema 1 se representa la biogénesis del eufol y de su estereoisómero, el lanosterol. La biosíntesis diverge a escala enzimática, es decir, aunque en ambos el óxido de escualeno actúa como el precursor directo, la diferencia que lleva a ambos compuestos se debe a distintas conformaciones provocadas por distintas enzimas.

³ Shi, Q.-W.; Su, X.-H.; Kiyota, H. *Chem. Rev.* **2008**, 108, 4295–4327.

⁴ Jury, S. L. *The Euphorbiales: Chemistry, Taxonomy and Economic Botany*, Academic Press, 1987.

⁵ Newbold, G. T.; Spring, F. S. *J. Chem. Soc.* **1944**, 249–252.

Antecedentes



Esquema 1. Biosíntesis del eufol (1) y lanosterol (3).

Este sistema de cuatro ciclos conforma un núcleo del tipo ciclopentano-perhidrofenantreno, similar al que poseen los esteroides, aunque tienen diferencias importantes en la estereoquímica, particularmente en la configuración de los carbonos C13, C14 y C17.

La estructura del eufol tiene dos olefinas, una es endocíclica tetrasustituida en el enlace C8-C9 que une los anillos B y C; la otra se encuentra en el enlace C24-C25 de la cadena lateral. El eufol tiene siete carbonos estereogénicos, de los cuales los más relevantes son los de las posiciones C13, C14, C17, y C20 por que existen dos estereoisómeros conocidos del eufol (Figura 3). El primero es el epímero en C20 conocido como tirucalol (2),

aislado por primera vez de *E. tirucalli*, y que ha sido encontrado en otras plantas del género junto con el eufol, además de que también se han aislado en una misma planta productos naturales análogos de ambos isómeros.⁶ El otro estereoisómero es el lanosterol (**3**), aislado de la grasa de la lana de las ovejas.⁷ El lanosterol tiene una configuración inversa a la del eufol en las posiciones C13, C14, y C17. Ambos estereoisómeros tienen diferencias esperables en sus propiedades físicas, como el punto de fusión y la rotación específica, al igual que diferencias sustanciales en los desplazamientos químicos de señales de RMN relevantes. Estas diferencias se enlistan en la Tabla 1.

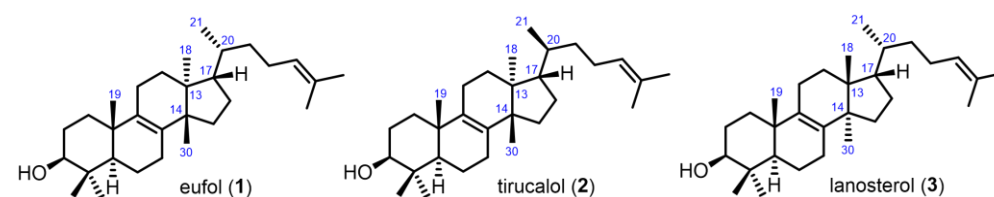


Figura 3. Estructura molecular del eufol y sus estereoisómeros conocidos.

Tabla 1. Diferencias en las propiedades físicas del eufol (**1**) y sus estereoisómeros (**2** y **3**).

Propiedades	Eufol (1) ⁸	Tirucalol (2) ⁶	Lanosterol (3) ⁹
pf (°C)	116–117	133–134	140–141
$[\alpha]_D$ (CHCl ₃)	+31.8° (c, 0.12)	+5° (c, 0.21)	+58.2° (c, 0.978)
RMN ¹ H (δ, ppm)			
H18	0.76, s ¹⁰	0.75, d ¹¹	0.69, s ¹²
H19	0.95, s	0.95, s	0.98, s
H21	0.85, d	0.91, d	0.91, d
H30	0.87, s	0.86, s	0.88, s

La historia sobre la elucidación estructural del eufol es interesante, puesto que se llevó a cabo antes del amplio uso de la técnica espectroscópica de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), mediante degradaciones químicas y correlaciones con otros compuestos. La caracterización química completa de este compuesto se realizó a lo largo de 12 años y quedó documentada en más de diez publicaciones; las últimas características estructurales descritas fueron las configuraciones de las posiciones C13, C14, C17 y C20. En particular, el trabajo

⁶ Zhang, Q. *et al. Molecules* **2017**, *22*, 2176.

⁷ Gascoigne, R. M.; Simes, J. J. *Q. Rev., Chem. Soc.* **1955**, *4*, 328–361.

⁸ Azfa, N. *et al. Phytochemistry* **1989**, *28*, 1982–1984.

⁹ Ruzicka, L.; Rey, E.; Muhr, A. C. *Helv. Chim. Acta* **1944**, *27*, 472–489.

¹⁰ Silva, V. A. O. *et al. Exp. Ther. Med.* **2018**, *16*, 557–566.

¹¹ Bartlett, W. R. *et al. J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 2224–2226.

¹² Nes, W. D. *et al. Arch. Biochem. Biophys.* **2009**, *481*, 210–218.

de Warren y Watling en 1958 confirmó la sutil diferencia entre el eufol (**1**) y su epímero en C20 conocido como tirucalol (**2**).¹³ A través de estas degradaciones fueron preparados varios derivados simples del eufol; no obstante, fueron sintetizados con una finalidad puramente estructural, por lo que la actividad biológica de estos no fue estudiada.

2.2 Actividad biológica del eufol

A pesar de los numerosos estudios sobre la elucidación estructural del eufol que se realizaron en los años 50's, su actividad biológica se comenzó a estudiar hasta tiempo relativamente reciente. El primer estudio de actividad biológica se realizó en 1989 por el grupo de Singh, y consistió en la evaluación de la actividad hipotensora del eufol (**1**).¹⁴

Entre las actividades estudiadas más recientemente sobresalen la actividad antitumoral, la antiinflamatoria y la antinociceptiva, como se mencionó en la introducción. Dado que el eufol es un constituyente relativamente abundante en ciertas plantas usadas en la Medicina Tradicional para tratar padecimientos cancerosos, la actividad antiproliferativa ha sido una de las más evaluadas para este compuesto. En este rubro, el trabajo más representativo es el de Silva y colaboradores, en el que la actividad antiproliferativa del eufol se evaluó en 73 líneas de células cancerosas humanas por el ensayo colorimétrico con (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2*H*-tetrazolio (MTS).⁸ El eufol exhibió actividad contra todas las líneas, y más de la mitad resultaron altamente sensibles de acuerdo al criterio usado por los autores. Las CI_{50} del eufol en las distintas líneas están en el rango de 1.41 a 38.89 μM . Además, mostró una interacción sinérgica con gemcitabina y paclitaxel en líneas celulares pancreáticas y esofágicas, respectivamente, mostrando que este producto natural es un potencial fármaco anticáncer solo o en combinación con quimioterapia convencional.

¹³ Warren, F. L.; Watling, K. H. *J. Chem. Soc.* **1958**, 179–184.

¹⁴ Singh, G. B. *et al. Planta Med.* **1989**, 55, 498 – 500.

En lo que respecta a la evaluación de la actividad antitumoral *in vivo*, el grupo de Yasukawa y colaboradores evaluó de forma tópica en un modelo murino la inhibición del crecimiento tumoral inducido químicamente con 7,12-dimetilbenzo[*a*]antraceno (DMBA) y promovido por acetato de tetradecanoilforbol (ATF), a una concentración de 2.0 μ mol (853 μ g) de eufol por ratón.¹⁵ Se demostró que en este modelo el eufol (**1**) inhibe significativamente la promoción de tumores cutáneos, con respecto al control negativo.

La Tabla 2 resume las principales actividades biológicas del eufol (**1**) que han sido estudiadas. Las publicaciones en este tema se encuentran distribuidas entre los años 2000–2021.

Tabla 2. Actividades biológicas reportadas para el producto natural eufol.

Entrada	Actividad	Referencias
1	Hipotensora	14
2	Antiinflamatoria	16 17
3	Colitis	18
4	Antitumoral, antiproliferativa	10 13 19 20 21
5	Antinociceptiva	22 23 24
6	Antiesclerosis múltiple	25
7	Inmunomoduladora	26

¹⁵ Yasukawa, K. *et al. J. Pharm. Pharmacol.* **2000**, 52, 119–124.

¹⁶ Anjali, P.; Sarang, B. *J. Appl. Pharm. Sci.* **2013**, 3, 020–025.

¹⁷ Passos, G. F. *et al. Eur. J. Pharmacol.* **2013**, 698, 413–420.

¹⁸ Dutra, R. C. *et al. PLoS ONE* **2011**, 6, e27122.

¹⁹ Lin, M.W. *et al. Food Chem. Toxicol.* **2012**, 50, 4333–4339.

²⁰ Wang, L. *et al. Mol. Med. Rep.* **2013**, 8, 1279–1285.

²¹ Silva, V. A. O. *et al. Invest. New Drugs* **2018**, 37, 223–237.

²² Dutra, R. C. *et al. Planta Med.* **2011**, 12, SL46.

²³ Dutra, R. C. *et al. Neuropharmacology* **2012**, 63, 593–605.

²⁴ Dutra, R. C. *et al. Neuroscience* **2015**, 303, 126–137.

²⁵ Dutra, R. C. *et al. Biochem. Pharmacol.* **2012**, 83, 531–542.

²⁶ de Oliveira, T. L. *et al. Life Sciences* **2021**, 280, 119700.

2.3 Derivados semisintéticos de triterpenos

Sobre la amplia variedad de triterpenos de origen natural y sus actividades biológicas, las revisiones periódicas de Hill & Connolly (*Nat. Prod. Rep.*) son un buen referente.²⁷ Para el caso específico de los derivados de triterpenos, en la literatura científica se encuentran varios informes; del 2017 a la fecha se han realizado algunas revisiones de acuerdo a varios criterios, y se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Lista de revisiones sobre derivados semisintéticos de triterpenos.

Entrada	Autor	Año	Descripción	Referencia
1	Salvador, J. A. R.	2017	Revisión sobre triterpenos pentacíclicos: avances recientes en el tratamiento del cáncer.	28
2	Zhou, M.	2017	Revisión sobre profármacos de triterpenoides y de sus derivados.	29
3	Ríos, J. L.	2018	Revisión sobre el ácido betulínico y algunos de sus derivados.	30
4	Peron, G.	2018	Triterpenos y sus derivados como andamios para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos contra el cáncer.	31
5	Kumar, P.	2018	Ácido betulínico como activador de la apoptosis (se mencionan derivados).	32
6	Sousa, J. L. C.	2019	Revisión de derivados de ácido betulínico y ácido betulínico. Periodo 2013 – 2018.	33
7	Mlala, S	2019	Revisión de derivados del ácido ursólico como agentes bioactivos.	34
8	Hodon, J.	2019	Revisión sobre conjugados de triterpenos pentacíclicos y sus actividades biológicas.	35
9	Khwaza, V.	2020	Derivados de ácido ursólico como agentes anticancerosos. Periodo 2015 – 2020.	36
10	Zhang, Z. J.	2020	Desarrollo de agentes antiinfluenza a partir de Productos Naturales (incluye derivados de triterpenos).	37
11	Amiri, S.	2020	Revisión sobre derivados de la betulina, ácido betulínico y sus efectos farmacológicos.	38
12	Wang, M.	2020	Revisión sobre panaxadiol, protopanaxadiol y sus derivados.	39
13	Cunha, A. B.	2021	Revisión sobre derivados del ácido betulínico con actividad antiprotozoaria.	40
14	Paquín, A.	2021	Revisión sobre derivados diméricos con potencial biológico (incluye algunos derivados diméricos de triterpenos).	41

²⁷ Hill, R.; Connolly, J. *Nat. Prod. Rep.* **2020**, *37*, 962 – 998.

²⁸ Salvador, J. A. R. *et al. Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *142*, 95.

²⁹ Zhou, M. *et al. Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *131*, 222.

³⁰ Ríos, J. L. *et al. Planta Med.* **2018**, *84*, 8.

³¹ Peron, G. *et al. Curr. Med. Chem.* **2018**, *25*, 1259.

³² Kumar, P. *et al. Life Sciences* **2018**, *209*, 24.

³³ Sousa, J. L. C. *et al. Molecules* **2019**, *24*, 355.

³⁴ Mlala, S. *et al. Molecules* **2019**, *24*, 2751.

³⁵ Hodon, J. *et al. Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *182*, 111653.

³⁶ Khwaza, V. *et al. Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5920.

³⁷ Zhang, Z. J. *et al. Eur. J. Med. Res. Dev.* **2020**, *40*, 2290.

³⁸ Amiri, S. *et al. Biotechnol. Adv.* **2020**, *38*, 107409.

³⁹ Wang, M. *et al. Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *189*, 112087.

⁴⁰ Cunha, A. B. *et al. Molecules* **2021**, *26*, 1081.

⁴¹ Paquín, A. *et al. Molecules* **2021**, *26*, 2340.

15	Liu, H.	2021	Revisión sobre derivados del ácido betulínico y sus análogos naturales. Periodo 2013 – 2018.	42
16	Majhi, S.	2021	Revisión sobre derivados de productos naturales (incluye algunos derivados de triterpenos).	43

Aún con las dieciséis revisiones cubriendo el tema de derivados de triterpenos, vale mencionar que están circunscritas a derivados muy específicos. Se puede identificar que la mayoría están dirigidas a derivados de triterpenos pentacíclicos. De hecho, seis de las dieciséis revisiones (entradas 3, 5, 11, 13 y 15 de la Tabla 3) son específicamente sobre derivados del ácido betulínico, y dos son sobre derivados del ácido ursólico (entradas 7 y 9), ambos triterpenos con núcleo pentacíclico. Solo una de las revisiones (entrada 12) está dirigida a derivados tetracíclicos; sin embargo, únicamente son derivados del panaxadiol y protopanaxadiol, productos naturales encontrados en el *Panax ginseng*. El resto son revisiones más generales pero que incluyen algunos derivados de triterpenos, casi exclusivamente pentacíclicos.

Las actividades biológicas señaladas en estas revisiones también son limitadas; cuatro de las revisiones (entradas 1, 3, 5 y 9) se refieren a derivados evaluados en actividad antitumoral, y solo una de las revisiones (entrada 13) trata específicamente de derivados con actividad antiprotozoaria.

Este aparente sesgo en la investigación hacia los derivados pentacíclicos puede deberse, por un lado, a que no se haya encontrado aún una fuente natural abundante de triterpenos tetracíclicos para usarlos como materia prima, como sí ha ocurrido con triterpenos pentacíclicos que incluso ya están disponibles comercialmente. Por otro lado, es probable que no se haya encontrado actividad biológica tan sobresaliente como la de los pentacíclicos en triterpenos tetracíclicos, por lo que no han sido considerados como materias primas promisorias para la preparación de derivados con mejor actividad.

Finalmente, es destacable que la mitad de las revisiones están publicadas en las revistas *Molecules* y *Eur. J. Med. Chem.*, con cuatro revisiones en cada una.

⁴² Liu, H. *et al. Authorea* 2021.

⁴³ Majhi, S.; Das, D. *Tetrahedron* 2021, 78, 131801.

2.3.1 Actividad biológica de los derivados de triterpenos

Existen numerosos informes de derivados de triterpenos con actividad biológica, pero entre estos destacan el ibrexafungerb (4) y el bevirimat (5), derivados semisintéticos de la enfumafungina (6) y el ácido betulínico (7), respectivamente (Figura 4). El ibrexafungerb fue aprobado en 2021 como fármaco antifúngico para el tratamiento de la candidiasis, por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) en EEUU.⁴⁴ El bevirimat por otra parte, llegó a fase IIb de ensayos clínicos por su propiedad de inhibir al VIH. Es el primero de una clase de compuestos contra el VIH que actúa por un nuevo mecanismo conocido como inhibición de la maduración.⁴⁵ A pesar de su novedoso mecanismo, las pruebas clínicas de este derivado se suspendieron debido a que se detectó el desarrollo de resistencia al tratamiento. No obstante, este hallazgo inició investigaciones sobre el nuevo mecanismo de acción contra el VIH.

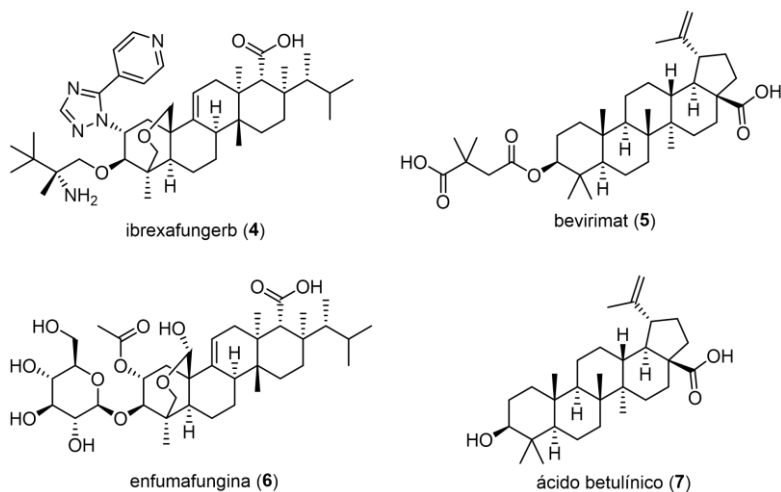


Figura 4. Ejemplos de triterpenos naturales y semisintéticos con actividad biológica sobresaliente.

La revisión de la literatura científica del periodo 2015–2023 sobre derivados de triterpenos, permitió contar al menos 1600 derivados con por lo menos una actividad biológica evaluada. Entre estas actividades se encuentran la antiinflamatoria, antiobesidad, antiviral, antidiabética (*in vivo* e *in vitro*), neuroprotectora, inhibición de la

⁴⁴ Héctor, R. F.; Bierer, D. E. *Expert Opin. Ther. Patents* **2011**, *21*, 1597–1610.

⁴⁵ McCallister, S. et al. *Antivir. Ther.* **2008**, *13*, A10.

acetilcolinesterasa, antimicrobiana, antiparasitaria, gastroprotectora, herbicida, anticataratas y dermo-regeneradora. Sin embargo, esta variedad de actividades biológicas solo representa alrededor de un tercio de los derivados de triterpenos evaluados. En la Figura 6 se muestra que dos tercios de los derivados han sido evaluados solo en actividad anticáncer, refiriéndose en este contexto como actividad anticáncer a las evaluaciones antitumorales (modelos *in vivo*) y evaluaciones antiproliferativas (modelos *in vitro*).

Es notable que dos terceras partes de los derivados hayan sido evaluados específicamente contra actividad anticáncer, lo cual probablemente se deba a que esta es una de las actividades sobresalientes de los triterpenos usados como material de partida. Aunque se han encontrado derivados con actividad excepcional, esta información demuestra que se requieren estudios adicionales para explorar actividades biológicas aparte de la actividad anticáncer.

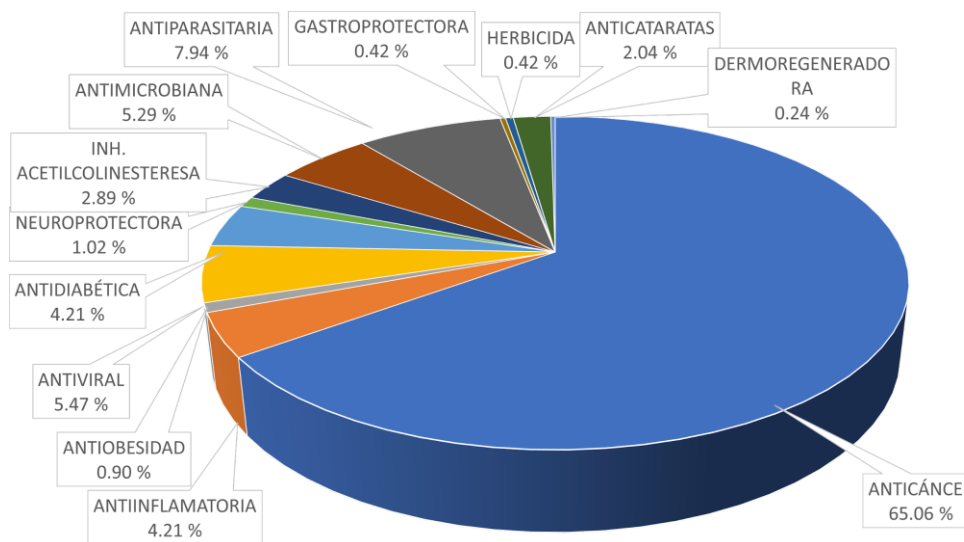


Figura 6. Distribución de las actividades biológicas evaluadas en derivados de triterpenos (2015–2023).

Por otro lado, la clasificación estructural de estos 1600 derivados coincide con lo observado en las revisiones del mismo tema (ver la Tabla 3), es decir, casi todos los derivados informados y evaluados son de triterpenos pentacíclicos. Siendo más específicos, alrededor del 95% de los derivados de triterpenos evaluados en el periodo 2015–2023 son triterpenos pentacíclicos con esqueletos de hopano (> 1%), lupano (22%), ursano (29%) y oleanano (44.5%). El 5 % restante son triterpenos tetracíclicos con esqueletos de tipo eufano (0.13%),

Antecedentes

cucurbitano (0.13%), damarano (1.93%), y lanostano (2.19%), tal como se muestra a continuación en la Figura 7. Esto hace evidente la ausencia de investigación sobre la preparación y evaluación biológica de triterpenos tetracíclicos y sus derivados semisintéticos.

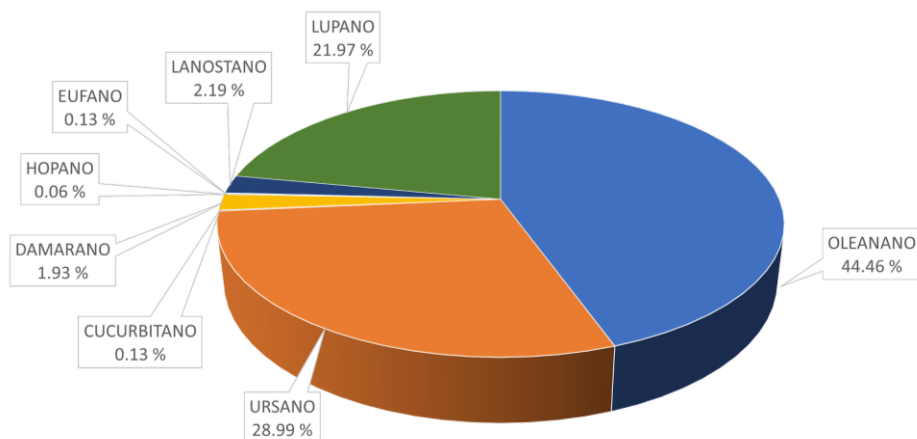


Figura 7. Clasificación estructural de los derivados semisintéticos de triterpenos (2015–2023).

Las modificaciones estructurales hechas en los derivados de triterpenos informados en la literatura son muy variadas y numerosas, por lo que no es viable realizar una descripción detallada en este trabajo. No obstante, es pertinente mencionar algunas de las modificaciones sobresalientes, ya sea por su excepcional mejora de la actividad, o porque se consideró que serían modificaciones promisorias, pero resultaron no serlo. Como ejemplo ilustrativo se puede mencionar la actividad inhibidora de la enzima α -glucosidasa. Algunos triterpenos pentacíclicos naturales, tales como el ácido betulínico (**7**), la betulina (**8**), el ácido oleanólico (**9**), el ácido glicirretínico (**10**), y el ácido ursólico (**11**) (Figura 8), inhiben muy bien a la α -glucosidasa.⁴⁶ Por esta razón distintos grupos de investigación idearon la preparación de derivados formando aductos entre estos triterpenos naturales con sustancias como monosacáridos y disacáridos,⁴⁷ o con sustancias que son inhibidores conocidos de esta enzima.⁴⁸ No obstante, aunque estos aductos parecieran promisorios como buenos inhibidores de α -glucosidasa, la realidad fue que tuvieron una actividad menor a la de la acarbosa, que es la sustancia de referencia usada como control positivo.

⁴⁶ Zhang, B. *et al. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 5065.

⁴⁷ Xu, J. *et al. Carbohydrate Res.* **2016**, *424*, 42–53.

⁴⁸ Liu, X. *et al. Bioorg. Chem.* **2020**, *97*, 103694.

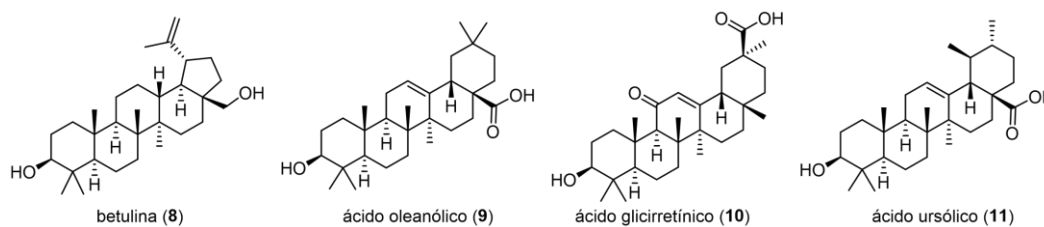


Figura 8. Estructura de triterpenos naturales inhibidores de la α -glucosidasa (**8–11**).

En contraste, derivados de triterpenos con un sistema indol fusionado al anillo A, tales como los informados por el grupo de Khusnutdinova (Figura 9, fórmulas **12** y **13**),⁴⁹ mostraron inhibir excepcionalmente a la α -glucosidasa, mucho mejor que el control positivo acarbosa. Estos ejemplos ilustran bien el hecho de que no es posible prever qué modificaciones estructurales serán las más promisorias; es necesario preparar y evaluar los derivados para conocer sus propiedades.

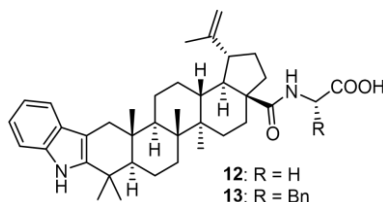


Figura 9. Derivados semisintéticos de triterpenos inhibidores de la α -glucosidasa (**12** y **13**).

Adicionalmente, es pertinente mencionar los diferentes orígenes del receptor biológico, es decir, de la α -glucosidasa, ya que se reconoce que existe la enzima de origen fúngico y de origen murino.

2.3.2 Derivados del eufol informados en la literatura.

Anteriormente, se mencionó que durante los años 50's del siglo pasado se sintetizaron varios derivados del eufol (**1**) como parte de su elucidación estructural, pero la actividad biológica de ellos no fue estudiada. Recientemente, el grupo de investigación de González-Coloma preparó algunos derivados de este triterpene y evaluó *in vitro* la actividad antiparasitaria contra *Leishmania infantum* y *Trypanosoma cruzi*, organismos causantes de la leishmaniasis y la enfermedad de Chagas, respectivamente. El eufol usado en ese trabajo como materia prima fue aislado de *Euphorbia resinifera*,⁵⁰ y solo fueron preparados y evaluados tres

⁴⁹ Khusnutdinova, E. *et al. Bioorg. Chem.* **2019**, *88*, 102957.

⁵⁰ Mazoir, N. *et al. Z. Naturforsch.* **2011**, *66c*, 360–366.

Antecedentes

derivados del eufol, todos ellos con modificación en la cadena lateral, consistente en la pérdida de los carbonos C25, C26 y C27, y la incorporación de un grupo aldehído en C24. Los tres derivados se diferencian en el grupo funcional de C3, específicamente un alcohol con orientación β (**14**), un grupo acetoxi (**15**), y una cetona (**16**) (Figura 10). La dosis efectiva media (DE_{50}) contra *L. infantum* solo fue especificada para el alcohol **14** como 8.18 $\mu\text{g/mL}$, mientras que para los otros dos (**15** y **16**) sólo se indica <10 y >1 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Para el caso de *T. cruzi*, las DE_{50} fueron de 9.15 (**15**), 23.87 (**16**) y 28.46 $\mu\text{g/mL}$ (**14**), respectivamente.

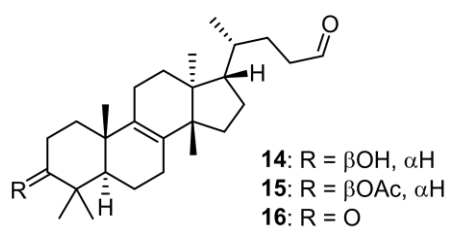


Figura 10. Derivados del eufol (**1**) informados por el grupo de González-Coloma.⁴⁸

CAPÍTULO 3.

JUSTIFICACIÓN, OBJETIVOS E HIPÓTESIS

3.1 Justificación

Las propiedades de las entidades químicas son consecuencia de sus estructuras moleculares; sin embargo, dada la naturaleza de las ciencias químicas, no es posible determinar *a priori* todas las propiedades de una entidad química solamente con base en su estructura molecular. Aunque se han realizado avances importantes en modelos teóricos predictivos, de gran utilidad para guiar la investigación química, éstos aún distan mucho de poder reemplazar a las pruebas experimentales como forma última de conocer las propiedades de una entidad química. Por lo tanto, es indispensable disponer físicamente de las entidades químicas, ya sea aislándolas de una fuente natural o preparándolas de forma químico o biosintética, para poder caracterizarlas e investigar sus propiedades.

Los triterpenos y sus derivados semisintéticos han demostrado ser entidades químicas promisorias por sus interesantes propiedades. No obstante, en el caso de los triterpenos tetracíclicos estos han permanecido poco explorados, en comparación con los triterpenos pentacíclicos. Particularmente, existen escasos antecedentes sobre la actividad biológica de derivados semisintéticos del eufol (**1**), por lo que existe la oportunidad de contribuir al conocimiento químico y biológico de los derivados de este producto natural.

3.2 Hipótesis

La preparación de derivados semisintéticos modificando la estructura molecular del eufol (**1**) permitirá acceder a nuevas entidades, con propiedades químicas y biológicas distintas a la materia prima. Particularmente, se espera que los derivados semisintéticos tengan actividad biológica diferente a la del producto natural de partida.

3.3 Objetivo general

- Contribuir al conocimiento de las propiedades químicas y biológicas de los triterpenos tetracíclicos mediante la preparación de derivados semisintéticos del producto natural eufol (1).

3.4 Objetivos específicos

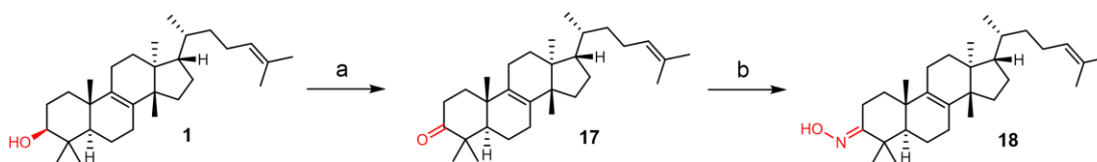
- Preparar derivados semisintéticos modificando la estructura molecular del eufol (1) mediante reacciones químicas.
- Caracterizar los derivados obtenidos mediante las técnicas espectrométricas, espectroscópicas, quirópticas y cristalográficas convencionales.
- Evaluar *in vitro* las actividades biológicas de los derivados preparados. Específicamente, la actividad antiproliferativa contra líneas celulares cancerosas humanas, la actividad inhibitoria de la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2) (la cual correlaciona con el fenómeno inflamatorio), y la inhibición de la formación del complejo que se forma entre la proteína *Spike* del virus SARS-CoV-2, y la enzima convertidora de angiotensina (ACE2); la inhibición de este complejo (*Spike*-ACE2) correlaciona con la prevención y el tratamiento de la enfermedad de Covid-19.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Preparación de los derivados semisintéticos del eufol

Aprovechando los grupos funcionales del eufol (**1**) se prepararon derivados con modificaciones en el anillo A y en la cadena lateral. Las modificaciones en el anillo A consistieron en la derivatización del grupo hidroxilo. Así, se preparó satisfactoriamente la cetona **17**, mediante oxidación con el reactivo de Jones (Esquema 2). Esta modificación cambia al grupo hidroxilo de naturaleza nucleofílica por un carbonilo que confiere a la posición C3 un carácter electrofílico, pero que además puede extender su reactividad a la posición C2 a través del equilibrio cetoenólico. La cetona **17** además funcionó como materia prima para la preparación de la oxima **18**. Esta oxima, obtenida por reacción con hidroxilamina, tiene una reactividad distinta, debido al carácter nucleofílico tanto del oxígeno como del nitrógeno; además del carácter anfifílico del carbono C3.⁵¹ Una particularidad de las oximas es que pueden existir los isómeros *syn* y *anti*, debido a las dos posibles orientaciones del grupo hidroxilo con respecto al enlace doble C-N. En el caso de este derivado, la presencia de los grupos metilo en C4 muy probablemente favorece la estereoquímica *anti*, como se muestra en la estructura de **18**.



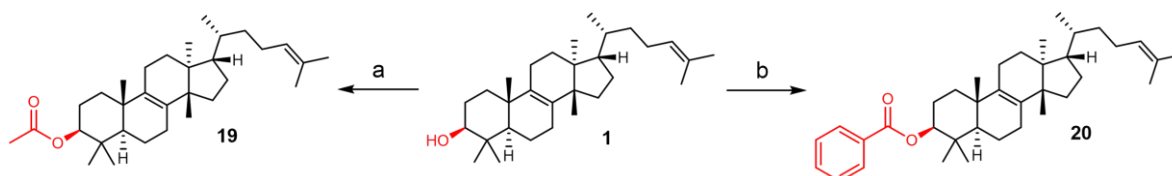
Esquema 2. Oxidación de eufol (**1**) para la obtención de eufona (**17**), y posterior obtención de la oxima **18**.
(a) reactivo de Jones; (b) HONH₂·HCl

Las reacciones del eufol (**1**) con anhídrido acético (Ac₂O) y cloruro de benzoílo (BzCl) dieron lugar a los ésteres **19** y **20**, respectivamente (Esquema 3). Aunque en ambos derivados se trata del grupo funcional éster, tienen características estéricas y electrónicas distintas: el acetil derivado permite explorar el efecto de la sola presencia de este grupo funcional (es el éster más frecuentemente obtenido), mientras que el benzoíl derivado permite

⁵¹ Rykaczewski, K. A. *et al. Nat. Synth.* **2022**, *1*, 24–36.

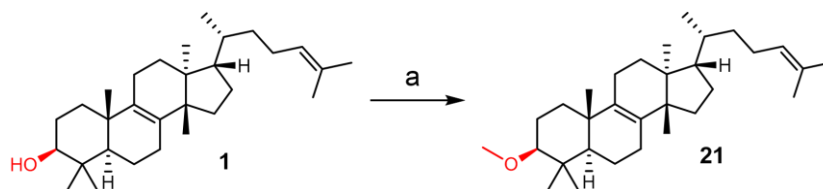
Resultados y Discusión

ponderar la presencia de un ciclo aromático, que además está desactivado por efecto inductivo del carbonilo de éster.



Esquema 3. Preparación de los ésteres **19** y **20** a partir de **1**. (a) Ac₂O, Py; (b) BzCl, Py.

El éter metílico del eufol (**21**) fue preparado mediante una síntesis de Williamson, por reacción con yoduro de metilo (MeI) usando hidruro de sodio (NaH) para desprotonar al hidroxilo (Esquema 4). La metilación del grupo hidroxilo cambia su reactividad al bloquear la posibilidad de actuar como donador de enlace de hidrógeno, y dejándolo solo como un aceptor del mismo tipo de enlace.

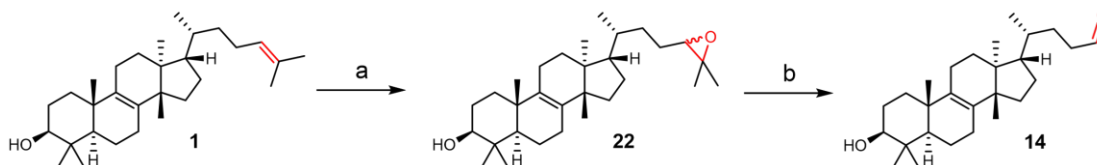


Esquema 4. Preparación del éter metílico **21** a partir de **1**. (a) MeI, NaH, THF.

Las modificaciones en la cadena lateral se llevaron a cabo aprovechando la reactividad de las posiciones alílicas de la olefina trisustituida. Una de las modificaciones consistió en la epoxidación con ácido *meta*-cloroperbenzoico (AMCPB) usando las condiciones reportadas por O’Keeffe y colaboradores para el lanosterol (**3**).⁵² De esta forma se obtuvo el epóxido **22** (Esquema 5), presumiblemente como mezcla diastereomérica, debido a la adición concertada del oxígeno por la cara *re*- y la cara *si*- de la olefina. Es anticipable que la adición de un heteroátomo a la estructura tenga un efecto significativo en las propiedades físicas y biológicas de la molécula. El epóxido **22** también pudo ser usado como materia prima al ser sometido a una ruptura oxidativa con ácido peryódico (H₅IO₆) para obtener el aldehído **14**. Esta reacción procede por la apertura del epóxido para formar el diol intermediario, el cual se oxida provocando la ruptura del enlace carbono-carbono para

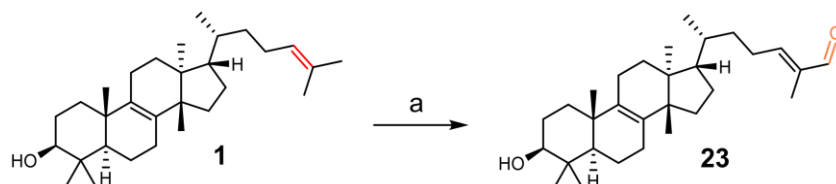
⁵² O’Keeffe, R. *et al. Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 2270–2280.

formar el aldehído. Este derivado permite estudiar, al mismo tiempo, el efecto de una cadena lateral más corta y el efecto de un heteroátomo con una reactividad distinta a la del epóxido.



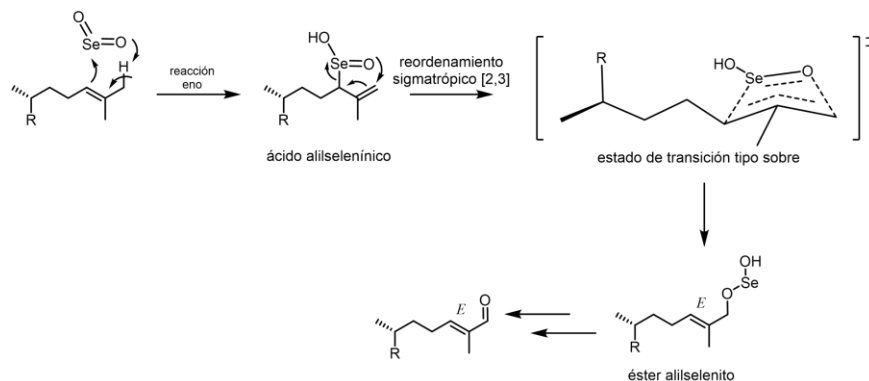
Esquema 5. Preparación del epóxido **22** y el aldehído **14**, a partir de **1**. (a) AMCPB; CH₂Cl₂ (b) H₅IO₆, Et₂O

La otra modificación en la cadena lateral consistió en una oxidación alílica del producto natural **1** con dióxido de selenio (SeO₂) en 2-metoxietanol (2-ME), con lo que se obtuvo el aldehído α,β -insaturado **23** (Esquema 6).



Esquema 6. Oxidación alílica de **1** para obtener el aldehído α,β -insaturado **23**. (a) SeO₂/2-ME.

Si bien existen tres posiciones alílicas en la cadena lateral del eufol (C23, C26 y C27), la oxidación en C26 que conduce al producto con olefina de configuración *E*, es la más favorecida, puesto que la transformación procede estereoselectivamente mediante una reacción eno, seguido de un reordenamiento sigmatrópico [2,3] (Esquema 7).⁵³ La evidencia cromatográfica y espectroscópica es consistente con esta explicación.



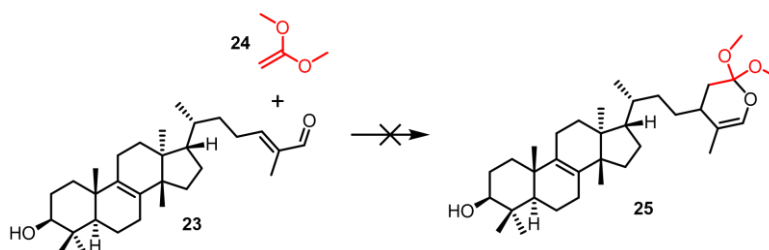
Esquema 7. Mecanismo de la oxidación alílica que explica la olefina *E* de **23** como producto mayoritario.

⁵³ Nakamura, A.; Nakada, M. *Synthesis* **2013**, *45*, 1421.

Resultados y Discusión

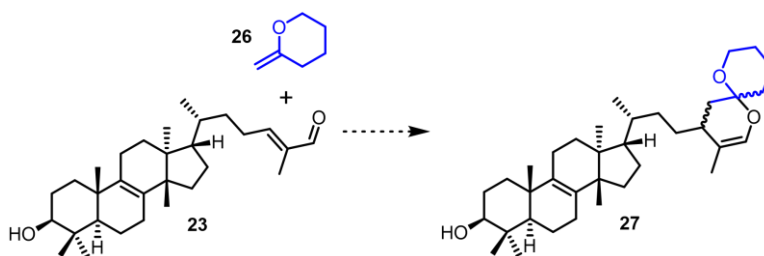
La preparación del aldehído **23** es de importancia puesto que al tener un grupo carbonilo α,β -insaturado, permite explorar una reactividad distinta; así, este grupo puede actuar como aceptor en reacciones de tipo Michael, lo que lo hace agente alquilante. Además, se ha informado que para el caso específico de triterpenoides, la incorporación de una unidad aceptora de Michael a la estructura molecular mejora considerablemente la actividad antitumoral.⁵⁴

Se realizaron ensayos exploratorios de reacciones tipo hetero Diels-Alder, empleando el aldehído α,β -insaturado **23** como dieno y el *gem*-dimetil acetal **24** como dienófilo (Esquema 8), empleando diversas condiciones de reacción.



Esquema 8. Intento de obtención de **25** por reacción hetero Diels-Alder entre **23** y **24**.

La intención era encontrar condiciones apropiadas para realizar una cicloadición tipo hetero Diels-Alder entre **23** y el compuesto **26**, lo que al final daría el compuesto **27**, que contiene un grupo espirocetal en la cadena lateral (Esquema 9). Se presume que el grupo espirocetal es uno de los que confiere su excepcional actividad antitumoral a las cefalostatinas y otros productos naturales.⁵⁵ No obstante, los resultados no fueron satisfactorios desde el punto de vista preparativo, dada la polimerización y descomposición de las materias primas.



Esquema 9. Propuesta de reacción hetero Diels-Alder entre **23** y **26** para obtener **27**.

⁵⁴ Heller, L. *et al.* *Euro. J. Med. Chem.* **2015**, *101*, 391-399.

⁵⁵ Lee, S. *et al.* *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2275-2314.

Cabe mencionar que el éter metílico **21**, el epóxido **22** y el aldehído α,β -insaturado **23**, no se encuentran informados en la literatura, por lo que su preparación es una contribución significativa tanto al conocimiento químico como biológico de estos compuestos. La cetona **17** y la oxima **18**, así como los ésteres **19** y **20**, ya habían sido informados como productos de transformación del eufol (ver sección 2.2); sin embargo, en este trabajo se contribuye con su caracterización espectroscópica y al conocimiento de algunas de sus propiedades biológicas.

4.2 Caracterización de los derivados semisintéticos del eufol

Otra de las contribuciones de este trabajo es la caracterización espectroscópica y asignación de las señales en los espectros de RMN. Aunque la preparación de algunos de los derivados de este trabajo ya había sido informada, muchos de éstos habían sido caracterizados sólo por degradación química y algunas constantes físicas, y no existían datos espectroscópicos en la literatura.

En este trabajo fueron obtenidos los espectros de RMN de protón (^1H), de carbono-13 (^{13}C), espectros DEPT-90, DEPT-135, además de espectros bidimensionales (HSQC, HMBC). Con estos datos fue posible asignar las señales de los espectros con sus respectivas estructuras moleculares. La Tabla 4 contiene los desplazamientos de ^{13}C y sus asignaciones. De esta forma se confirmó la conectividad molecular y la estereoquímica de los derivados obtenidos.

Para realizar las asignaciones se tomaron como referencia los datos espectroscópicos del eufol (**1**), tanto obtenidos en este trabajo, como los informados por varios autores. La mayoría de las señales de RMN permanecen prácticamente inalteradas entre **1** y sus derivados; no obstante, en la cercanía de las modificaciones de algunos de los derivados, los desplazamientos químicos son modificados considerablemente. Tal es el caso de los derivados con la cetona (**17**), la oxima (**18**), o los ésteres en C3 (**19** y **20**), en los que el efecto en los desplazamientos de grupos funcionales no solo afecta a átomos a dos o tres enlaces, sino también a través del espacio en algunos casos, tal como sucede con los carbonos C6 y C19 en **18**, y el C6 en **17**. Los metilos C28 y C29 son los más afectados por la presencia de

Resultados y Discusión

heteroátomos en C3 como puede identificarse en la Tabla 4. Los compuestos **17–21** tienen el C28 desplazado hacia mayor frecuencia, mientras que los compuestos **17** y **18** tienen el C29 desplazado hacia baja frecuencia, con respecto al desplazamiento químico de los otros derivados.

Tabla 4. Desplazamientos químicos de RMN ^{13}C del eufol (**1**) y sus derivados (**14–23**) (CDCl_3 , 100 MHz, δ en ppm).

# C	Compuestos								
	1	14	17	18	19	20	21	22	23
1	35.4	35.4	35.7	35.2	35.1	35.1	35.3	35.4	35.4
2	28.1	28.1	34.7	23.2	24.4	24.4	22.9	28.1	28.0
3	79.1	79.1	218.3	167.3	81.1	81.7	88.8	79.1	79.1
4	39.1	39.1	47.4	40.5	38.0	38.4	39.0	39.1	39.1
5	51.1	51.1	51.6	51.8	51.2	51.3	51.6	51.1	51.1
6	19.1	19.1	21.3	19.9	18.9	19.1	19.1	19.1	19.0
7	27.8	27.8	27.6	27.6	27.7	27.7	27.8	27.8	27.8
8	133.7	133.5	134.9	133.5	133.8	133.8	133.6	133.6	133.6
9	134.1	134.2	132.8	134.3	134.0	134.0	134.3	134.2	134.2
10	37.4	37.4	37.3	37.5	37.3	37.3	37.4	37.4	37.4
11	21.7	21.6	21.6	21.7	21.7	21.7	21.7	21.7	21.6
12	31.0	31.0	31.0	31.0	31.0	31.0	31.0	31.1	31.2
13	44.2	44.3	44.3	44.2	44.2	44.3	44.3	44.3	44.3
14	50.2	50.2	50.3	50.2	50.2	50.2	50.2	50.2	50.2
15	29.9	29.9	29.9	29.9	29.9	29.9	29.9	29.9	29.8
16	28.3	28.2	28.3	28.3	28.3	28.3	28.3	28.3	28.3
17	49.8	49.6	49.9	49.8	49.8	49.8	49.8	49.5	49.7
18	15.7	15.7	15.9	15.7	15.7	15.7	15.7	15.7	15.7
19	20.3	20.3	20.4	19.9	20.3	20.4	20.3	20.3	20.3

20	36.0	35.6	36.0	36.0	36.0	36.0	36.0	35.9	36.0
21	19.1	18.9	19.0	19.1	19.1	19.0	19.0	19.2	19.1
22	35.5	41.1	35.5	35.5	35.6	35.6	35.6	31.8	34.0
23	24.9	27.4	24.9	24.9	24.9	24.9	24.9	25.4	26.0
24	125.4	203.3	125.3	125.3	125.3	125.4	125.4	64.9	155.7
25	131.1	--	131.1	131.1	131.0	131.0	131.0	58.5	139.2
26	17.7	--	17.8	17.8	17.8	17.8	17.8	25.1	195.6
27	25.9	--	25.9	25.9	25.9	25.9	25.9	18.9	9.4
28	15.8	15.8	19.9	17.8	16.8	17.1	16.4	15.8	15.9
29	28.2	28.2	26.8	27.5	28.1	28.3	28.2	28.2	28.2
30	24.6	24.6	24.4	24.5	24.6	24.6	24.6	24.6	24.6
1'	--	--	--	--	171.2	166.5	57.7	--	--
2'	--	--	--	--	21.5	131.2	--	--	--
3',''	--	--	--	--	--	129.7	--	--	--
4',''	--	--	--	--	--	128.5	--	--	--
5'	--	--	--	--	--	132.8	--	--	--

4.3 Determinación de la estructura cristalina por DRX de los derivados 17 y 21.

Las recristalizaciones de la cetona **17** en *i*PrOH o en acetona/agua, y del éter metílico **21** en MeOH, produjeron cristales apropiados para la obtención de la estructura cristalina mediante la técnica de difracción de rayos X (DRX) de monocristal (Figura 11). Con la obtención de la estructura cristalina con radiación de Cu K α ($\lambda = 1.54178 \text{ \AA}$) se confirmó la configuración absoluta de estos derivados (y por ende de la materia prima), con un parámetro de Flack de 0.09(6) y de 0.09(4) para **17** y **21**, respectivamente. La configuración absoluta fue consistente con la interpretación espectroscópica, confirmando un núcleo de tipo eufano y quedando

Resultados y Discusión

descartada la posibilidad de que se tratara de uno de los estereoisómeros del eufol (ver sección 2.1). La inspección de la estructura cristalina de la cetona **17** muestra que la unidad asimétrica en la celda unitaria está constituida por dos moléculas apiladas, cada una con una orientación y conformación diferente.

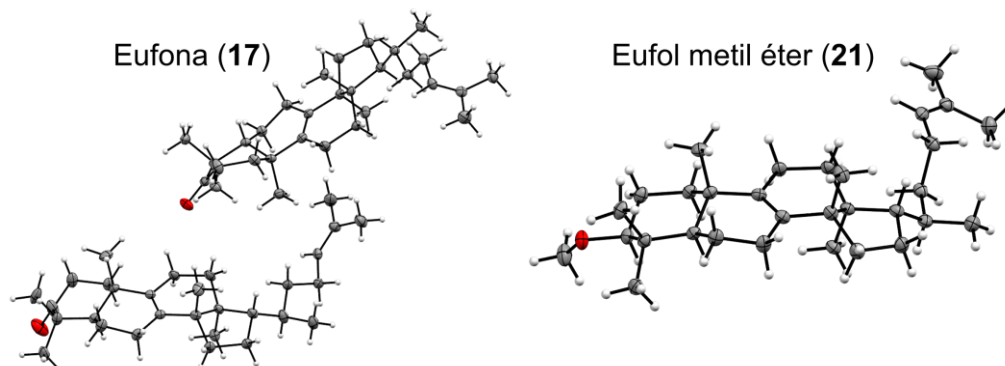


Figura 11. Estructura cristalina de la eufona (**17**) y del éter metílico de eufol (**21**).

Puede observarse que para ambos derivados la orientación de la cadena lateral está definida por la configuración *R* del carbono C20, que favorece un ordenamiento alternado *antiperiplanar* de los hidrógenos en el enlace C17–C20. Esta observación es consistente con la conformación encontrada en la estructura cristalina del 3-acetileufol informada en la literatura, y que es inducida por la estereoquímica de la molécula.⁵⁶ Esto contrasta con la orientación espacial de la cadena lateral del estereoisómero tirucalol (**2**).

Los datos cristalográficos de **17** y **21** no habían sido informadas, por lo que fueron depositadas en el Centro de Datos Cristalográficos de Cambridge (CCDC, por sus siglas en inglés) con los identificadores CCDC2178145 y CCDC2181277, respectivamente.

4.4 Actividad biológica de los derivados

Se realizaron evaluaciones de actividades biológicas selectas de los derivados del eufol. Las actividades evaluadas fueron: (a) inhibición de la proliferación de líneas celulares cancerosas humanas (sección 4.4.1), (b) inhibición de la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2) (sección

⁵⁶ Nes, W. D. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1984**, *81*, 5896.

4.4.2), y (c) inhibición de la formación del complejo *Spike-ACE2*, complejo que se forma entre la proteína *Spike* del virus SARS-CoV-2, y la enzima convertidora de angiotensina (ACE2) (sección 4.4.3).

4.4.1 Actividad antiproliferativa contra líneas celulares cancerosas

La inhibición de la proliferación de los derivados **14**, **17–23** fue evaluada de forma preliminar mediante ensayos de porcentajes de inhibición en las siguientes líneas celulares cancerosas humanas: cáncer del Sistema Nervioso Central (U251), cáncer de próstata (PC-3), leucemia mielógena (K562), cáncer de colon (HCT-15), cáncer de pecho (MCF7) y cáncer de pulmón (SKLU-1). También se evaluó la inhibición de la proliferación de una línea no cancerosa de riñón de mono (COS7) con el fin de evaluar la selectividad de los derivados. La Tabla 5 muestra estos resultados.

Tabla 5. Porcentajes de inhibición de los derivados a líneas celulares cancerosas humanas.

Muestra	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF7	SKLU-1	COS7
1	NC	NC	26.9	2.18	36.62	4.9	NC
14	59.8	87.2	100	74.6	61.4	88.4	22.0
17	NC	NC	95.0	12.2	1.5	31.3	17.2
18	1.0	8.5	12.2	NC	NC	5.01	NC
19	NC	NC	39.8	39.4	20.1	40.0	NC
20	NC	NC	33.1	15.6	1.3	10.9	NC
21	NC	NC	57.8	4.3	4.3	21.6	NC
22	NC	NC	34.1	16.4	NC	4.6	NC
23	22.4	16.5	84.9	3.8	17.5	9.7	20.3
Etopósido	95.7	46.9	74.6	86.4	58.4	86.5	ND

NC: no citotóxico. Líneas celulares cancerosas humanas: U251 (glioblastoma), PC-3 (próstata), K256 (leucemia), HCT-15 (colon), MCF-7 (pecho), SK-LU-1 (pulmón). COS7: células no cancerosas de riñón de mono. Concentración 50 μ M (compuestos puros), 25 μ g/mL (extractos); Vehículo: DMSO.

Lo primero que destaca de los resultados de la Tabla 5 es que el eufol y varios de sus derivados mostraron selectividad. Es decir, no presentaron actividad contra las líneas celulares de Sistema Nervioso Central (U251) y de próstata (PC-3). Las excepciones a esta observación son los aldehídos **14** y **23**. También la oxima **18** tuvo actividad, pero esta es mínima.

Resultados y Discusión

Otra observación es que los compuestos **17**, **23** y **14** fueron los que tuvieron mayor porcentaje de inhibición, con 95, 85, y 100%, respectivamente. Es pertinente destacar que estos porcentajes fueron para la línea celular de leucemia mielógena (K562), que de hecho muestra una tendencia a ser la más sensible a ser inhibida por el eufol y sus derivados.

En general, el eufol y sus derivados mostraron inhibir selectivamente a las líneas celulares cancerosas, puesto que, con excepción de los derivados **14**, **17** y **23**, no inhibieron la proliferación de la línea celular no cancerosa COS7. Es interesante que estos tres derivados con mayor porcentaje de inhibición poseen grupos carbonilo de tipo cetona y aldehído. Puede suponerse que este tipo de grupo funcional es la característica que les confiere mayor actividad a estos derivados, mientras que los grupos carbonilo de tipo éster no tienen el mismo efecto en la actividad, tal como sugieren los porcentajes de inhibición de los derivados **19** y **20**.

Los grupos carbonilo de cetona y aldehído se diferencian de los grupos carbonilos de éster; los del primer grupo son más reactivos al tener mayor carácter electrofílico, y además poder actuar como nucleófilos debido al equilibrio ceto-enólico característico de éstos. Podría proponerse la hipótesis de que la mayor actividad de los derivados **14**, **17**, y **23**, se debe a estas características. Es necesario realizar más derivados con grupos carbonilo de este tipo para poner a prueba esta hipótesis.

En lo que respecta a las diferencias en la actividad entre modificaciones en el anillo A y en la cadena lateral, el sitio de modificación parece no influir en la actividad tanto como sí lo hace el grupo funcional. Prueba de esto es que la cetona **17** tiene actividad comparable con la de los aldehídos **14** y **23**, aun cuando la modificación es en ubicaciones distintas de la estructura molecular. No obstante, el aldehído **14** es activo contra líneas celulares para las que no lo es la cetona **17**, sugiriendo que las modificaciones en la cadena lateral son más promisorias.

Fueron determinadas las concentraciones inhibitorias medias (CI_{50}) de los compuestos **14** y **17** (Tabla 6). Para el caso de los demás derivados no fue posible determinar una CI_{50} debido a que no tuvieron un comportamiento dosis respuesta ideal.

Tabla 6. Concentración inhibitoria media (CI₅₀, μM) de los compuestos **14** y **17**.

Muestra	Líneas celulares cancerosas					
	U251	PC3	K562	HCT-15	MCF7	SKLU-1
14	30.9 ± 1.3	30.9 ± 1.3	18.8 ± 0.5	39.0 ± 2.9	17.4 ± 0.6	39.9 ± 1.6
17	ND	ND	13.6 ± 0.7	ND	ND	ND
etopósido	2.4 ± 0.2		2.2 ± 0.7	4.8 ± 0.5		2.6 ± 0.3

4.4.2 Inhibición de la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2)

Una forma de evaluar *in vitro* el potencial de una sustancia como agente antiinflamatorio es mediante el ensayo de inhibición de la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2). A nivel farmacéutico, la inhibición de esta enzima puede aliviar el dolor e inflamación debido a que ésta cataliza la formación de especies químicas que regulan estos síntomas en diversas patologías.⁵⁷ Dado que el eufol (**1**) tiene propiedades antiinflamatorias (ver sección 2.2.2) podría esperarse que sus derivados también tengan esta actividad, razón por la que los derivados **14**, **17–23** fueron sometidos al ensayo de inhibición de la enzima COX-2.

Los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 6, y en la Figura 12. El ensayo preliminar se realizó a las concentraciones de 10 y 100 μM . Se realizó el ensayo también con Celecoxib como fármaco de referencia inhibidor de COX-2. A la concentración de 10 μM

⁵⁷ Ferrer, M. D. *et al. Curr. Med. Chem.* **2019**, 26, 3225.

Resultados y Discusión

todas las sustancias, excepto el éter metílico **21**, inhibieron en más del 20 % la actividad de la enzima. A la misma concentración, todas las sustancias tienen una inhibición del 40% o superior, siendo la excepción en este caso el eufol (**1**) y la cetona **17**.

A 100 μM todos los compuestos también fueron activos; sin embargo, se observa un comportamiento no lineal en algunos de los derivados. Varios de los compuestos no tienen un aumento proporcional de la actividad a esta concentración, tal es el caso del eufol (**1**), el éster **20**, el epóxido **22**, la oxima **18** y el compuesto **27**. De hecho, en dos de los derivados el porcentaje de inhibición fue menor a esta concentración, siendo más drástico este efecto en la oxima **18** que disminuye de 43.6% a 10 μM , a 18.4% a 100 μM .

Los derivados más activos fueron la cetona **17**, y los aldehídos **14** y **23**, con porcentajes de inhibición de 70.1, 82.5 y 64.0%, respectivamente. Es interesante que estos mismos derivados fueron los más activos en el ensayo de inhibición de la proliferación de líneas celulares cancerosas (sección 4.3.1), y puede proponerse la misma hipótesis de que los grupos carbonilos de cetona y aldehído son los que confieren a estos derivados la actividad en este ensayo.

Tabla 6. Resultados del ensayo preliminar de inhibición de la enzima COX2 de los derivados del eufol.

Muestra	Concentración (μM)	Prostaglandina (ng/mL)	Inhibición (%)
1	10	72.06 \pm 24.00	36.3
	100	61.85 \pm 6.64	45.4
14	10	46.96 \pm 10.40	58.5
	100	19.80 \pm 5.53	82.5
17	10	84.73 \pm 19.55	25.1
	100	33.85 \pm 15.37	70.1
18	10	63.80 \pm 16.53	43.6
	100	92.35 \pm 31.17	18.4
20	10	62.24 \pm 14.64	45.0
	100	61.18 \pm 6.47	45.9
21	10	117.97 \pm 72.25	-4.2
	100	56.28 \pm 8.20	50.3
22	10	43.17 \pm 20.48	61.8
	100	51.50 \pm 6.71	54.5
23	10	55.00 \pm 4.22	51.4

	100	40.72±3.49	64.0
Celecoxib	10	8.73±3.54	92.3

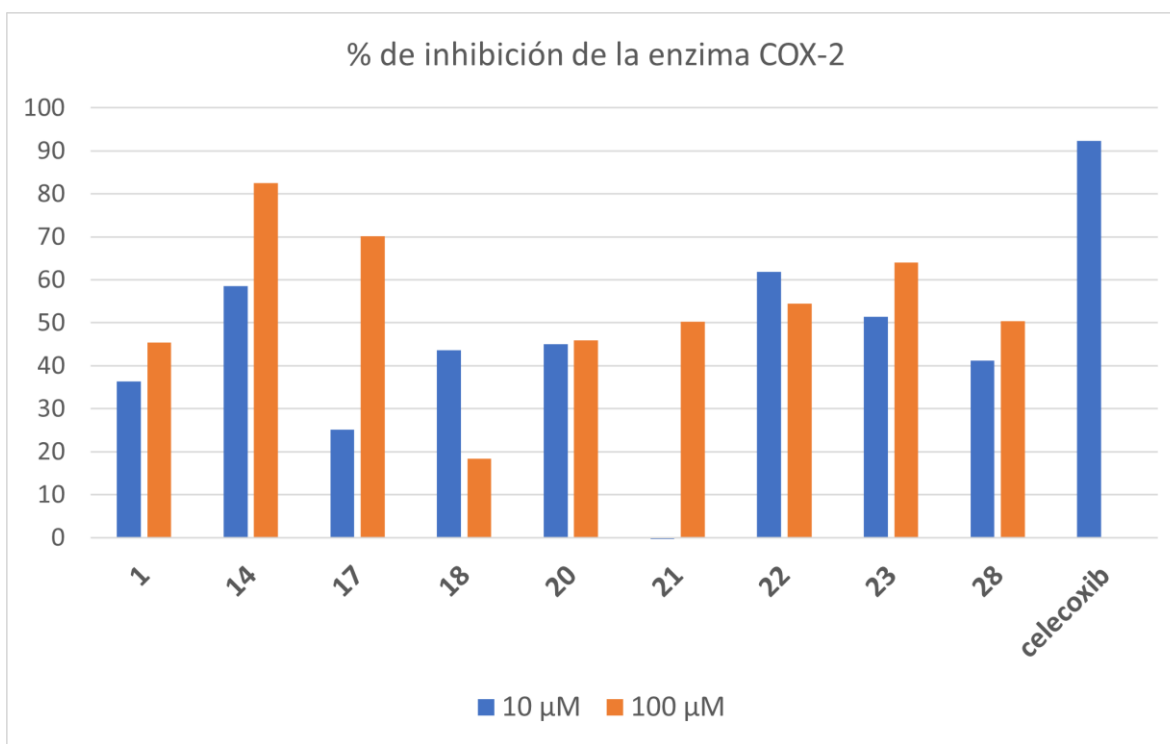


Figura 12. Porcentajes de inhibición de la enzima COX2 de los derivados del eufol.

Con base en los porcentajes de inhibición >50%, los derivados **14**, **17**, **22**, **23** y **28**, fueron seleccionados para determinar su concentración inhibitoria media (CI_{50}). No obstante, solo la cetona **17** tuvo un comportamiento ideal dosis-respuesta que permitió obtener la CI_{50} , que resultó ser de $40.58 \pm 2.42 \mu\text{M}$. Para comparación, el fármaco de referencia celecoxib tiene una $CI_{50} < 0.01 \mu\text{M}$, por lo que se concluye que el derivado **17** tiene una actividad moderada.

4.4.3 Inhibición de la formación del complejo Spike-ACE2

El proceso de infección del virus SARS-CoV-2, causante del Covid-19, requiere la entrada de éste a las células hospederas humanas. Este proceso de entrada es mediado por la interacción temprana entre la proteína *Spike* (S) del virus, presente en la superficie de las partículas virales, con el receptor de la enzima convertidora de angiotensina (ACE2),

Resultados y Discusión

localizada en la superficie de algunas células humanas. Por tanto, el complejo S-ACE2 ha sido considerado un blanco terapéutico atractivo, debido a que es el primer punto de contacto entre el virus y la célula.⁵⁸ Las entidades químicas que interfieran en la formación de este complejo, en principio deberían tener el potencial de prevenir o tratar la infección por este virus.

En un estudio de acoplamiento molecular llevado a cabo por Singh y Florez, el eufol resaltó junto con otros compuestos como fármacos inhibidores que podrían actuar contra la COVID-19.⁵⁹ En el estudio se llevó a cabo un cribado virtual de alta eficiencia de 1129 moléculas en la estructura principal de la proteasa del virus SARS-CoV-2, causante de la enfermedad Covid-19. El eufol fue una de las 40 moléculas con mejor energía de unión proteína-ligando, por lo que los autores concluyen que podría tener efecto anti Covid. Este resultado nos motivó a incluir al eufol y algunos de sus en el estudio in vitro que realizamos en el grupo de investigación para varios de nuestros productos naturales y derivados.

La capacidad de inhibir el complejo S-ACE2 fue evaluada de forma preliminar para las sustancias **1**, **20**, **21**, **17**, **18**, **23** a las concentraciones de 10, 100 y 1000 μM . Los porcentajes de inhibición se encuentran en la Tabla 7 y en la Figura 13.

⁵⁸ Lapailierie, D. *et al. Viruses*, **2021**, 13, 365.

⁵⁹ Singh, S.; Florez, H. *F1000 Research* 2020, 9, 502.

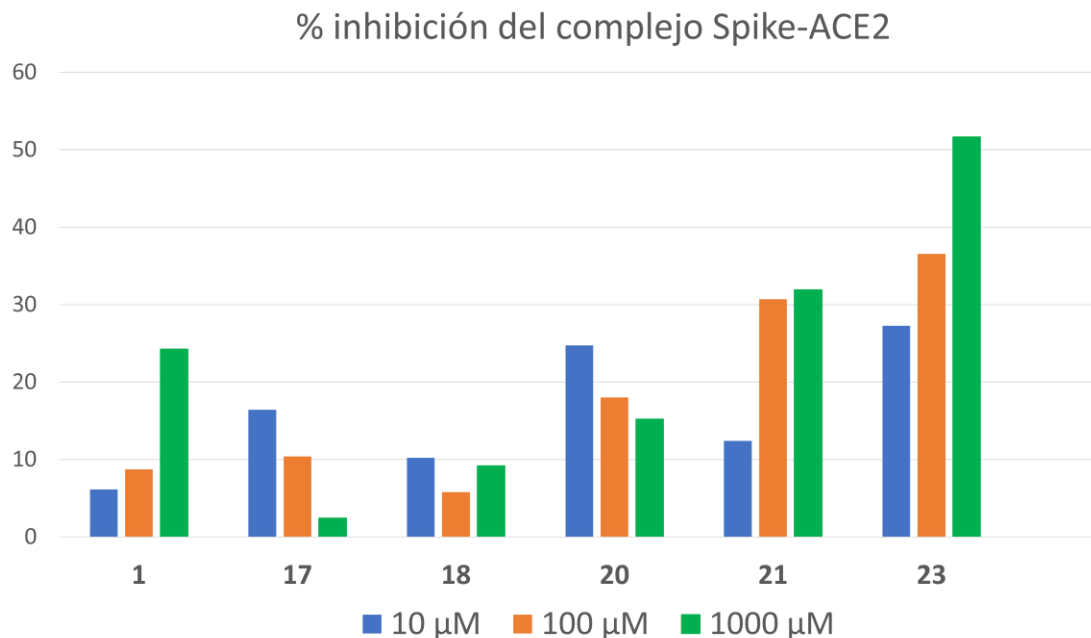


Figura 13. Porcentajes de inhibición del complejo Spike-ACE2.

Tabla 7. Porcentajes de inhibición de la formación del complejo Spike-ACE2 de **1** y sus derivados.

Comp.	% de inhibición		
	10 μM	100 μM	1000 μM
1	6.12	8.74	25.26
17	16.43	10.4	2.45
18	10.23	5.77	9.18
20	24.74	18.01	15.21
21	12.41	30.68	31.91
23	27.27	36.54	51.66

En la Figura 14 se observa que el aldehído α,β -insaturado **23** es el derivado con mayor actividad en este ensayo, con una inhibición del 51.7% a la concentración de 1000 μM . El

Resultados y Discusión

segundo derivado con mayor actividad es el éter metílico **21**, sin embargo, su porcentaje de inhibición apenas sobrepasa el 30% a la concentración más alta. El resto de los derivados evaluados tienen una inhibición por debajo del 28%, además de que es notorio que estos no tienen un comportamiento dosis-respuesta ideal.

Aunque los resultados muestran que estos derivados no tienen actividad sobresaliente en este ensayo en específico, sí permiten identificar un tipo de modificación más promisorio: el grupo aldehído α,β -insaturado de la cadena lateral del derivado **23**. Queda por determinar si es la naturaleza del grupo funcional, o su ubicación en la cadena lateral, lo que le confiere su mayor actividad, puesto que este derivado es el único del conjunto evaluado en este ensayo que tiene una modificación en la cadena lateral. Así, podría proponerse la preparación de derivados con grupos carbonilo α,β -insaturados en el anillo A, para determinar si el mismo tipo de grupo funcional tiene el mismo efecto al estar en otra parte de la molécula. O bien, determinar si las modificaciones en la cadena lateral son la condición necesaria hacia derivados más activos, independientemente de la naturaleza del grupo funcional.

CAPÍTULO 5.

CONCLUSIONES

El estudio químico de la especie vegetal *E. tanquahuete* permitió el aislamiento y determinación de la estructura molecular de varias sustancias, entre ellas una novedosa (compuesto 14). Este estudio permitió identificar que esta especie es una fuente relativamente abundante del producto natural eufol (aproximadamente 1 g en 650 g de hojas secas), lo cual permitió la preparación a escala semipreparativa de varios derivados de este compuesto en cantidades suficientes para evaluaciones biológicas preliminares.

Fueron preparados por semisíntesis nueve derivados del eufol (**14**, **17–23**, **28**). Para algunos de ellos no se encontraron informes previos sobre sus propiedades biológicas. En este trabajo se evaluó la actividad biológica del producto natural y de sus derivados, que en términos generales mantuvieron una actividad comparable a la del producto natural, tanto en términos de potencia como de selectividad; sin embargo, algunos compuestos fueron más activos (**14**, **17**, y **23**). Estos derivados tenían grupos carbonilos de tipo cetona o aldehído y destacaron por su actividad antiproliferativa y de inhibición de COX-2. Uno de ellos (**23**) fue también el más activo en el ensayo de inhibición del complejo S-ACE2.

Aún con el reducido número de derivados evaluados, fueron obtenidos resultados promisorios que sugieren que es pertinente continuar con la investigación de derivados semisintéticos del eufol para determinar la relación entre la presencia del grupo carbonilo y la actividad biológica. Es oportuno mencionar que se confirmó la hipótesis referente a la posibilidad de que algunos derivados semisintéticos posean mejor actividad biológica con respecto al producto natural original.

CAPÍTULO 6.

SECCIÓN EXPERIMENTAL

6.1 Información general

Los puntos de fusión fueron determinados en un equipo Fisher-Jones de la marca Cole-Palmer y no fueron corregidos. Las cromatografías en capa fina (ccf) fueron realizadas en cromatofolios de aluminio con gel de sílice (60 F₂₅₄, 0.2 mm) de la marca Merck. Las cromatografías en columna (cc) se realizaron con gel de sílice de malla 70–230 (cc por gravedad) y malla 230–400 (cc tipo flash) de la marca Supelco; como fase móvil se usaron mezclas de polaridad creciente de *n*-hexano/DCM, o *n*-hexano/acetato de etilo (AcOEt). Los espectros de masas de impacto electrónico fueron obtenidos en un espectrómetro JEOL JMS-AX505HA con un potencial de ionización de 70 eV. Los espectros de masas de alta resolución obtenidos por las técnicas DART o ionización electrospray fueron obtenidos en un espectrómetro AccuTOF JMS-T100LC. Los espectros de infrarrojo (IR) fueron obtenidos en solución de cloroformo (CHCl₃) en un espectrofotómetro FT-IR Bruker Tensor 750. La rotación específica fue determinada en un polarímetro PerkinElmer 343 usando CHCl₃ como disolvente y la línea D del sodio como fuente de luz. Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ¹H, ¹³C, y bidimensionales fueron obtenidos en diferentes equipos: Bruker Avance III (400 MHz), Bruker Fourier (300 MHz), y Jeol Eclipse (300 MHz). La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés) se llevó a cabo en un cromatógrafo Thermo Scientific Ultimate 3000, usando una columna analítica de fase reversa (C-18, 5 μm, 100 Å, 15 x 4.6 mm), y disolventes grado HPLC (isopropanol, *i*PrOH; metanol, MeOH; acetonitrilo, MeCN) y agua de filtro Mili-Q. Los datos de rayos X para la estructura cristalina se obtuvieron en un difractómetro Bruker APEX II Duo.

6.2 Material vegetal

Las partes aéreas de *E. tanquahuete* fueron recolectadas en octubre de 2014, y en noviembre de 2018, en el parque estatal “El Texcal”, en el municipio de Jiutepec, Morelos, México. La planta fue identificada por la Maestra Clara Hilda Ramos (Instituto de Biología, UNAM).

Una muestra del material vegetal fue depositada en el Herbario Nacional de México (MEXU) con el número de registro 1394140.

6.2.1 Aislamiento de la materia prima

Las partes aéreas de *E. tanquahuete* (0.65 kg) fueron extraídas con una mezcla de DCM/MeOH en proporción 1:1, a temperatura ambiente, con tres extracciones de 24 h cada una. El extracto obtenido (328.5 g) fue fraccionado por cc a gravedad (1 kg gel de sílice malla 70–230) usando un gradiente de elución *n*-hex/AcOEt 100:0 – 0:100, y, finalmente, un lavado de columna con MeOH, con lo que se obtuvieron ocho fracciones principales etiquetadas de la A a la H. De la fracción D se eliminó el exceso del alcohol graso 1-octacosanol por precipitación en mezcla *n*-hex/AcOEt y posterior decantación. La parte que permaneció en solución fue concentrada y sometida a otro fraccionamiento por cc para dar seis subfracciones (D1–D6). La subfracción D2 fue sometida a otro fraccionamiento por cc para obtener eufol (**1**, 1.35 g) como el constituyente mayoritario.

De la misma colecta también fueron trabajadas las ramas de la planta. Después de ser secadas a la sombra y temperatura ambiente, las ramas fueron cortadas en trozos y posteriormente molidas, antes de ser extraídas. En este caso, las ramas fueron extraídas primero con *n*-hexano con la intención de eliminar hidrocarburos, para posteriormente extraer con mezcla DCM/MeOH 1:1. Finalmente, se determinó que el extracto hexánico de ramas era rico en la mezcla de triterpenoides, en el que el eufol también era el constituyente mayoritario. El segundo extracto de DCM/MeOH tenía sólo trazas de triterpenoides y estaba constituido mayormente por material insoluble y compuestos muy polares.

6.3 Preparación de derivados semisintéticos

25,26,27-trisnor-3 β -hidroxieufan-24-al (14)

Este compuesto fue preparado a partir del eufol (**1**) con dos procedimientos distintos reportados en la literatura. El *procedimiento 1* consiste en la ruptura oxidativa de la olefina

Sección Experimental

en la cadena lateral con OsO₄ y NaIO₄.⁶⁰ El *procedimiento 2* reportado por O’Keeffe (2015) para el lanosterol, involucra dos pasos: primero la olefina de la cadena lateral es epoxidada con ácido *m*CPB, y posteriormente se realiza la ruptura oxidativa del epóxido con ácido peryódico (H₅IO₆).⁵²

Procedimiento 1: A una disolución de eufol (**1**, 50 mg, 0.12 mmol) en dioxano-agua 3:1 (5 mL), se agregó 2,6-lutidina (0.1 mL, 0.86 mmol), OsO₄ (dos gotas de una solución al 2.5 % en *t*-BuOH) y NaIO₄ (103 mg, 0.48 mmol). La reacción fue agitada por 20 h a t. a., y luego se agregó agua y CH₂Cl₂ a la reacción (5 mL c/u). La fase acuosa fue extraída con más CH₂Cl₂ (5 mL x 3), las fases orgánicas fueron combinadas, lavadas con salmuera, y tratadas con MgSO₄ anh. y filtrada. El disolvente fue evaporado a presión reducida y el crudo de reacción fue purificado por cromatografía en columna para obtener el compuesto **14** como agujas blancas por recristalización con hexano. Rendimiento: 25%.

Procedimiento 2: A una solución de **1** (101 mg, 0.23 mmol) en diclorometano (DCM) se agregó con agitación una mezcla sólida de ácido *meta*-cloroperbenzoico (ác. *m*CPB, 124 mg, 0.72 mmol) y NaHCO₃ (128 mg, 1.52 mmol). La primera mitad de la mezcla ác. *m*CPB/NaHCO₃ fue agregada a t. a. en un lapso de 30 min; la segunda mitad fue agregada de la misma forma, pero a 0 °C en un baño de hielo. La reacción se continuó durante 2 h más a 0 °C, y posteriormente la mezcla de reacción fue filtrada, lavada con soln. sat. de NaHCO₃ (hasta pH neutro en la fase acuosa), y finalmente con salmuera. La fase orgánica fue tratada con MgSO₄ anh. Después de la evaporación del disolvente el crudo de reacción fue purificado por cc para dar el epóxido **22** como un sólido blanco (rendimiento: 78%), que por recristalización en hexano dio nódulos blancos. Posteriormente, a una solución del epóxido **22** (100 mg, 0.23 mmol) en Et₂O (5 mL) fue agregado ácido peryódico (H₅IO₆, 61 mg, 0.27 mmol). La reacción fue agitada a t. a. hasta que la materia prima fue consumida (~30 min, determinado por ccf). La mezcla de reacción fue lavada con agua (5 mL x 2) hasta que la fase acuosa adquirió pH neutro. La fase orgánica fue tratada con MgSO₄, filtrada, y el disolvente evaporado a presión reducida. El crudo de reacción fue purificado por cromatografía en columna para dar el compuesto **14**. Rendimiento: 67%.

⁶⁰ Yu, W. *et al. Org. Lett.* **2004**, *6*, 3217–3219.

HRMS (ESI, m/z) calcd. para $C_{27}H_{45}O_2$ $[M+H]^+$ 401.34195, encontrado: 401.34118; m. p. 128–130 °C (hexano); $[\alpha]_D = +20.9$ (c 0.15, $CHCl_3$); Rf (ccf) 0.41 (hex/AcOEt 8:2, eluida dos veces). RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H (ppm) 9.78 (1H, t , $J = 1.8$ Hz, H-24), 3.23 (1H, dd , $J = 12$, 4.8 Hz, H-3), 2.68 (1H, dt , $J = 6$, 2.8 Hz, H-23), 1.00 (3H, s , H-29), 0.95 (3H, s , H-19), 0.88 (3H, s , H-30), 0.85 (3H, d , $J = 6$ Hz, H-21), 0.80 (3H, s , H-28), 0.77 (3H, s , H-18). RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C (ppm) 35.4 (C-1), 28.1 (C-2), 79.1 (C-3), 39.1 (C-4), 51.1 (C-5), 19.1 (C-6), 27.8 (C-7), 133.5 (C-8), 134.2 (C-9), 37.4 (C-10), 21.6 (C-11), 31.0 (C-12), 44.3 (C-13), 50.2 (C-14), 29.9 (C-15), 28.2 (C-16), 49.6 (C-17), 15.7 (C-18), 20.3 (C-19), 35.6 (C-20), 18.9 (C-21), 41.1 (C-22), 27.4 (C-23), 203.3 (C-24), 15.8 (C-28), 28.2 (C-29), 24.6 (C-30). (Espectros de RMN en Anexo, Figuras 17 y 18).

Eufona (17):

A una solución de eufol (**1**, 500 mg, 1.17 mmol) disuelto en acetona (15 mL) se adicionó reactivo de Jones (CrO_3 , H_2SO_4 , H_2O) gota a gota hasta que la mezcla de reacción permaneció de color naranja y la ccf indicó el consumo total de la materia prima. El exceso de reactivo de Jones fue tratado con *i*PrOH hasta que la mezcla de reacción cambió a color verde. Se añadió Celita a la mezcla para absorber el crudo en ella y se eliminó el disolvente por evaporación a presión reducida. La Celita con el crudo de reacción fue transferida a una columna cromatográfica que fue eluida con hex/AcOEt 49:1 para obtener la cetona **17** como un sólido amorfo (rendimiento 86%) que después de recrystalizar en *i*PrOH produjo agujas poliédricas. Las tablas de los datos cristalográficos se encuentran en el Anexo.

$[\alpha]_D +65.4$ (c 0.35, $CHCl_3$); EM (DART+, m/z) $[M+H]^+$ 425 (100), 407 (24), 191 (16), 117 (16); pf. 119–120 °C (*i*PrOH, lit. 117–118 °C,⁶¹ 119 °C⁶²); Rf (ccf) 0.40 (hex/AcOEt 49:1). RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H (ppm) 5.09 (1H, $br t$, $J = 7.0$ Hz, H24), 2.50 (2H, m , H2), 1.68 (3H, s , H26), 1.61 (3H, s , H27), 1.10 (3H, s , H29), 1.05 (3H, s , H28), 1.05 (3H, s , H19), 0.90 (3H, s , H30), 0.86 (3H, d , $J = 6.4$ Hz, H21), 0.75 (3H, s , H18). RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C (ppm) 35.7 (C1), 34.7 (C2), 218.3 (C3), 47.4 (C4), 51.6 (C5), 21.3 (C6), 27.6 (C7), 132.8 (C8), 134.9 (C9), 37.3 (C10), 21.6 (C11), 31.0 (C12), 44.3 (C13), 50.3 (C14), 29.9 (C15), 28.3 (C16), 49.8 (C17), 15.9 (C18), 20.4 (C19), 36.0 (C20), 19.0 (C21), 35.5 (C22), 24.9 (C23), 125.3 (C24), 131.1 (C25), 17.8 (C26), 25.9 (C27), 19.9 (C28), 26.9 (C29), 24.4 (C30). (Espectros de RMN en Anexo, Figuras 19 y 20). La asignación y los datos espectroscópicos no estaban informados en la literatura.

⁶¹ Bennet, R. N. E.; Warren, F. L. *J. Chem. Soc.* **1950**, 697–699.

⁶² Dutta, N. L.; Karimullah, A. *J. Sci. Ind. Res. India* **1944**, 3, 212.

Sección Experimental

Oxima de eufona (18):

Se siguió el procedimiento reportado para el lanosterol por O’Keeffe (2015).⁵²

A una solución de la cetona **17** (54 mg, 0.13 mmol) disuelta en EtOH (10 mL) se añadió clorhidrato de hidroxilamina (HONH₂·HCl, 25 mg, 0.39 mmol), NaOAc (48.6 mg, 0.59 mmol). La reacción fue calentada a reflujo durante dos horas, posteriormente, se evaporó el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción fue disuelto en AcOEt (10 mL) y la solución fue lavada con agua, solución al 10 % de NaHCO₃ y salmuera. La fase orgánica fue tratada con MgSO₄, filtrada, y el disolvente evaporado a presión reducida para obtener la oxima **18** como un sólido blanco con rendimiento cuantitativo. La recristalización con MeOH dio laminillas blancas.

[α]_D -3.43 (*c* 0.35, CHCl₃); HRMS (EI+, *m/z*) calcd. para C₃₀H₄₉O₁N₁: 439.3814, encontrado: 439.3833; pf. 188–190 °C (MeOH; lit. 192–193 °C,⁶¹ 194–195 °C⁶²). RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ _H (ppm) 5.09 (1H, *t*, *J* = 7.1 Hz, H24), 3.05 (1H, *ddd*, *J* = 15.4, 5.6, 3.7, H2), 2.34–2.21 (1H, *m*), 1.68 (3H, *s*, H26), 1.60 (3H, *s*, H27), 1.16 (3H, *s*), 1.08 (3H, *s*), 1.05 (3H, *s*), 0.88 (3H, *s*, H30), 0.85 (3H, *d*, *J* = 6 Hz, H21), 0.73 (3H, *s*, H18). RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ _C (ppm) 35.2 (C1), 23.2 (C2), 167.3 (C3), 40.5 (C4), 51.8 (C5), 19.9 (C6), 27.6 (C7), 133.5 (C8), 134.3 (C9), 37.5 (C10), 21.7 (C11), 31.0 (C12), 44.2 (C13), 50.2 (C14), 29.9 (C15), 28.3 (C16), 49.8 (C17), 15.7 (C18), 19.9 (C19), 36.0 (C20), 19.1 (C21), 35.5 (C22), 24.9 (C23), 125.3 (C24), 131.1 (C25), 17.8 (C26), 25.9 (C27), 17.8 (C28), 27.5 (C29), 24.5 (C30). (Espectros de RMN en Anexo, Figuras 21 y 22). La asignación y los datos espectroscópicos no estaban informados en la literatura.

3 β -acetoxi-eufano (19):

El eufol (**1**, 100 mg, 0.23 mmol) fue disuelto en piridina (1 mL), luego se agregó Ac₂O (2 mL) a la disolución. La reacción fue agitada a t. a. por al menos 12 h para después tratar la mezcla de reacción igual que con el compuesto **20**. Después de purificar por cromatografía en columna (eluida con hex/AcOEt 49:1) y recristalizar en metanol se obtuvo el compuesto **19** como agujas incoloras.

Rendimiento: 89%; pf. 100–103 °C (MeOH/CHCl₃, lit.⁵ 109 °C [α]_D = +32.5 (*c* 0.32, CHCl₃); MS (DART+, *m/z*) 469 (M+H)⁺; R_f (ccf) 0.52 (hex/AcOEt 49:1). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ _H (ppm) 5.09 (1H, *t*, *J* = 7.2 Hz, H24), 4.50 (1H, *dd*, *J* = 11.8, 4.6 Hz), 2.05 (3H, *s*, H2’), 1.68 (3H, *s*, H26), 1.60 (3H, *s*, H27), 0.97 (3H, *s*, H19), 0.88 (3H, *s*, H30), 0.87 (6H, *s*, H28, H29), 0.85 (3H, *d*, *J* = 6 Hz, H21), 0.74 (3H, *s*, H18). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ _C

(ppm) 35.1 (C1), 24.4 (C2), 81.1 (C3), 38.0 (C4), 51.2 (C5), 18.9 (C6), 27.7 (C7), 133.8 (C8), 134.0 (C9), 37.3 (C10), 21.7 (C11), 31.0 (C12), 44.2 (C13), 50.2 (C14), 29.9 (C15), 28.3 (C16), 49.8 (C17), 15.7 (C18), 20.3 (C19), 36.0 (C20), 19.1 (C21), 35.6 (C22), 24.9 (C23), 125.3 (C24), 131.0 (C25), 17.8 (C26), 25.9 (C27), 16.8 (C28), 28.1 (C29), 24.6 (C30), 171.2 (C1'), 21.5 (C2'). (Espectros de RMN en Anexo, Figuras 23 y 24).

Benzoato de eufilo (20):

A una solución de eufol (**1**, 50 mg, 0.12 mmol) en piridina (1 mL) se agregó cloruro de benzoílo (1 mL, 8.6 mmol). La mezcla de reacción fue agitada a t. a. durante 2 h hasta que la materia prima fue consumida (determinado por ccf). Se agregó agua fría (10 mL) a la mezcla de reacción y fue extraída con AcOEt (3mL x 3). Las fases orgánicas fueron reunidas y con solución de HCl hasta pH ácido de la fase acuosa, luego con NaHCO₃ al 10% hasta pH ligeramente básico de la fase acuosa, y finalmente con salmuera. La fase orgánica fue tratada con MgSO₄, filtrada, y el disolvente evaporado a presión reducida. Después de purificar por cromatografía en columna (eluida con hex/AcOEt 20:1) se obtuvo el compuesto **20** como laminillas blancas.

Rendimiento: 79%; $[\alpha]_D +53.5$ (*c* 0.29, CHCl₃); MS (DART+, *m/z*) [M+H]⁺ 531 (12), 445 (16), 409 (100), 117 (77); pf.: 151–153 °C (MeOH/CHCl₃, lit. 137–139 °C⁵), Rf (ccf) 0.70 (hex/AcOEt 19:1). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ_H (ppm) 8.05 (2H, br *d*, *J* = 9 Hz,), 7.59–7.52 (1H, *m*, *J* = 9 Hz), 7.47–7.40 (2H, *m*, *J* = 9 Hz), 5.10 (1H, *t*, *J* = 6 Hz), 4.75 (1H, *dd*, *J* = 12 Hz, *J* = 4.2 Hz), 1.69 (3H, *s*), 1.61 (3H, *s*), 1.04 (3H, *s*), 1.02 (3H, *s*), 0.96 (3H, *s*), 0.89 (3H, *s*), 0.86 (3H, *d*, *J* = 6 Hz), 0.77 (3H, *s*, H-18). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ_C (ppm) 35.1 (C-1), 24.4 (C-2), 81.7 (C-3), 38.4 (C-4), 51.3 (C-5), 19.1 (C-6), 27.7 (C-7), 133.8 (C-8), 134.0 (C-9), 37.3 (C-10), 21.7 (C-11), 31.0 (C-12), 44.3 (C-13), 50.2 (C-14), 29.9 (C-15), 28.3 (C-16), 49.8 (C-17), 15.7 (C-18), 20.4 (C-19), 36.0 (C-20), 19.0 (C-21), 35.6 (C-22), 24.9 (C-23), 125.4 (C-24), 131.0 (C-25), 17.8 (C-26), 25.9 (C-27), 17.1 (C-28), 28.3 (C-29), 24.6 (C-30), 166.5 (C-31), 131.2 (C-32), 129.7 (C-33, C-33'), 128.5 (C-34, C-34'), 132.8 (C35). (Espectros de RMN en Anexo, Figuras 25 y 26). Las asignaciones fueron realizadas por experimentos bidimensionales y los datos espectroscópicos no estaban informados en la literatura.

Sección Experimental

3-O-metil eufol (21):

A una solución de eufol (**1**, 52 mg, 0.12 mmol) en THF (10 mL) se agregó NaH (70 mg, 2.92 mmol) seguido de CH₃I (253 mg, 1.80 mmol). Después de agitar a t. a. durante la noche, se agregó agua fría (30 mL) a la mezcla de reacción y se extrajo con AcOEt (10 mL x3). Las fases orgánicas fueron reunidas y lavadas con agua, posteriormente con salmuera, y, finalmente, tratada con MgSO₄ anh., filtrada, y el disolvente evaporado a presión reducida. Después de purificar por cromatografía en columna (*n*-hex/AcOEt 95:5) se obtuvo el éter metílico del eufol (**21**) como un sólido blanco (rendimiento 68%), que después de recristalizar en MeOH dio agujas poliédricas largas apropiadas para difracción de rayos X.

HRMS (ESI, *m/z*): calcd. para C₃₁H₅₂O [M+H]⁺: 441.40964, encontrado: 441.41130; [α]_D +44.7 (*c* 0.34, CHCl₃); pf. 109–111 °C (MeOH); R_f (ccf) 0.66 (hex/AcOEt 19:1). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ _H (ppm) 5.09 (1H, *t*, *J* = 7.0 Hz, H24), 3.36 (3H, *s*, H31), 2.68 (1H, *dd*, *J* = 11.8, 4.2 Hz, H3), 1.68 (3H, *s*, H26), 1.60 (3H, *s*, H27), 0.98 (3H, *s*, H29), 0.95 (3H, *s*, H19), 0.87 (3H, *s*, H30), 0.85 (3H, *d*, *J* = 6.4 Hz), 0.78 (3H, *s*, H28), 0.75 (3H, *s*, H18). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ _C (ppm) 35.3 (C1), 22.9 (C2), 88.8 (C3), 39.0 (C4), 51.6 (C5), 19.1 (C6), 27.8 (C7), 133.6 (C8), 134.3 (C9), 37.4 (C10), 21.7 (C11), 31.0 (C12), 44.3 (C13), 50.2 (C14), 29.9 (C15), 28.3 (C16), 49.8 (C17), 15.7 (C18), 20.3 (C19), 36.0 (C20), 19.0 (C21), 35.6 (C22), 24.9 (C23), 125.4 (C24), 131.0 (C25), 17.8 (C26), 25.9 (C27), 16.4 (C28), 28.2 (C29), 24.6 (C30), 57.7 (C31). (Espectros de RMN en Anexo, Figuras 27 y 28). Este compuesto no había sido informado en la literatura.

3 β -hidroxi-24,25-epoxi-eufano (22):

A una solución de **1** (101 mg, 0.23 mmol) en diclorometano (DCM) se agregó con agitación una mezcla sólida de ácido *meta*-cloroperbenzoico (ác. *m*CPB, 124 mg, 0.72 mmol) y NaHCO₃ (128 mg, 1.52 mmol). La primera mitad de la mezcla ác. *m*CPB/NaHCO₃ fue agregada a t. a. en un lapso de 30 min; la segunda mitad fue agregada de la misma forma, pero a 0 °C en un baño de hielo. La reacción se continuó durante 2 h más a 0 °C, y posteriormente la mezcla de reacción fue filtrada, lavada con soln. sat. de NaHCO₃ (hasta pH neutro en la fase acuosa), y finalmente con salmuera. La fase orgánica fue tratada con MgSO₄ anh. Después de la evaporación del disolvente el crudo de reacción fue purificado por cc para dar el epóxido **22** como un sólido blanco (rendimiento: 78%), que por recristalización en hexano dio nódulos blancos.

HRMS (EI, m/z) calcd. para $C_{30}H_{50}O_2$ 442.3811, observado: 442.3817; pf. 134–137 °C, $[\alpha]_D +28.3$ (c 0.43, $CHCl_3$); Rf (ccf) 0.51 (hex/AcOEt 7:3). RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H (ppm) 3.23 (1H, *dd*, $J = 12.4$ Hz, $J = 5.2$ Hz, H3), 2.70 (1H, *t*, $J = 6$ Hz, H24), 1.31 (3H, *s*, H26), 1.26 (3H, *s*, H27), 1.00 (3H, *s*, H29), 0.95 (3H, *s*, H19), 0.87 (3H, *s*, H30), 0.85 (3H, *d*, $J = 6$ Hz, H21), 0.79 (3H, *s*, H28), 0.76 (3H, *s*, H18). RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C (ppm) 35.4 (C1), 28.1 (C2), 79.1 (C3), 39.1 (C4), 51.1 (C5), 19.1 (C6), 27.8 (C7), 133.6 (C8), 134.2 (C9), 37.4 (C10), 21.7 (C11), 31.1 (C12), 44.3 (C13), 50.2 (C14), 29.9 (C15), 28.3 (C16), 49.5 (C17), 15.7 (C18), 20.3 (C19), 35.9 (C20), 19.2 (C21), 31.8 (C22), 25.4 (C23), 64.9 (C24), 58.5 (C25), 25.1 (C26), 18.9 (C27), 15.8 (C28), 28.2 (C29), 24.6 (C30). (Espectros de RMN en Anexo, Figuras 29 y 30). Este compuesto no había sido informado en la literatura.

3 β -hidroxi-eufan-26-al (23):

A una disolución en 2-metoxietanol (2-ME, 3 mL) de dióxido de selenio recién sublimado (SeO_2 , 64 mg, 0.58 mmol) se agregó eufol (**1**, 103 mg, 0.24 mmol) disuelto en 2-ME (4 mL). La reacción fue calentada a reflujo por 6 h, se retiró el calentamiento y se dejó enfriar a t. a. El disolvente fue evaporado a pres. red. y el residuo fue sometido a cc en Florisil como fase estacionaria usando una mezcla de hex/AcOEt como eluyente para dar el aldehído α,β -insaturado **23** como un sólido blanco (rendimiento: 78 %).

HRMS (IE, m/z): calcd. para $C_{30}H_{48}O_2$: 440.3654, observado: 440.3666; $[\alpha]_D +21.1$ (c 0.28, $CHCl_3$); Rf (ccf) 0.53 (hex/AcOEt 7:3); RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ_H (ppm) 9.39 (1H, *s*, H26), 6.49 (1H, *t*, $J = 7.3, 1.3$ Hz, H24), 3.23 (1H, *dd*, $J = 11.6, 4.6$ Hz, H3), 1.75 (3H, *s*, H27), 1.00 (3H, *s*, H29), 0.95 (3H, *s*, H19), 0.90 (3H, *d*, $J = 6$ Hz, H21), 0.88 (3H, *s*, H30), 0.80 (3H, *s*, H28), 0.76 (3H, *s*, H18). RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ_C (ppm) 35.4 (C1), 28.0 (C2), 79.1 (C3), 39.1 (C4), 51.1 (C5), 19.0 (C6), 27.8 (C7), 133.6 (C8), 134.2 (C9), 37.4 (C10), 21.6 (C11), 31.2 (C12), 44.3 (C13), 50.2 (C14), 29.8 (C15), 28.3 (C16), 49.7 (C17), 15.7 (C18), 20.3 (C19), 36.0 (C20), 19.1 (C21), 34.0 (C22), 26.0 (C23), 155.7 (C24), 139.2 (C25), 195.6 (C26), 9.4 (C27), 15.9 (C28), 28.2 (C29), 24.6 (C30). (Espectros de RMN en Anexo, Figuras 31 y 32). Este compuesto no había sido informado en la literatura.

CAPÍTULO 7.

REFERENCIAS

- (1) Aranda-Ledesma, N. E.; Bautista-Hernández, I.; Rojas, R.; Aguilar-Zárate, P.; Medina-Herrera, N. P.; Castro-López, C.; Martínez-Ávila, G. C. G. Candelilla Wax: Prospective Suitable Applications within the Food Field. *LWT – Food. Sci. Technol.* **2022**, *159*, 113170–113182.
- (2) Ruatpuia, J. V. L.; Changmai, B.; Pathak, A.; Alghamdi, L. A.; Kress, T.; Halder, G.; Wheatley, A. E. H.; Rokhum, S. L. Green Biodiesel Production from *Jatropha curcas* Oil using a Carbon-Based Solid Acid Catalyst: A Process Optimization Study. *Renewable Energy* **2023**, *206*, 597–608.
- (3) Shi, Q.-W.; Su, X.-H.; Kiyota, H. Chemical and Pharmacological Research of the Plants in Genus *Euphorbia*. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 4295–4327.
- (4) Jury, S. L. *The Euphorbiales: Chemistry, Taxonomy and Economic Botany*, Academic Press, **1987**.
- (5) Newbold, G. T.; Spring, F. S. The Isolation of Euphol and α -Euphorbol from Euphorbium. *J. Chem. Soc.* **1944**, 249–252.
- (6) Zhang, Q.; Zhou, Q.-R.; Lou, J.-W.; Chen, P.-D.; Yao, W.-F.; Tao, W.-W.; Tang, Y.-P.; Dai, G.-C.; Wang, K.; Zhang, L. Chemical Constituents from *Euphorbia kansui*. *Molecules* **2017**, *22*, 2176–2184.
- (7) Gascoigne, R. M.; Simes, J. J. The Tetracyclic Triterpenes. *Q. Rev., Chem. Soc.* **1955**, *4*, 328–361.
- (8) Azfa, N.; Khan, A. Q.; Malik, A.; Badar, Y. Cyclocaducinol, a Cycloartane Type Triterpene from *Euphorbia caducifolia*. *Phytochemistry* **1989**, *28*, 1982–1984.
- (9) Ruzicka, L.; Rey, E.; Muhr, A. C. 55. Zur Kenntnis der Triterpene. Über verschiedene Unwanlungsprodukte des Lanosterins. *Helv. Chim. Acta* **1944**, *27*, 472–489.
- (10) Silva, V. A. O.; Rosa, M. N.; Tansini, A.; Oliveira, R. J. S.; Martinho, O.; Lima, J. P.; Pianowski, L. F.; Reis, R. M. *In vitro* Screening of Cytotoxic Activity of Euphol on a Large Panel of Human Cancer-Derived Cell Lines. *Exp. Ther. Med.* **2018**, *16*, 557–566.
- (11) 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*, 2224–2226.
- (12) Nes, W. D.; Zhou, W.; Ganapathy, K.; Liu, J.; Vatsyayan, R.; Chamala, S.; Hernandez, K.; Miranda, M. Sterol 24-Methyltransferase: An Enzymatic Target for the Disruption of Ergosterol Biosynthesis and Homeostasis in *Cryptococcus neoformans*. *Arch. Biochem. Biophys.* **2009**, *481*, 210–218.

- (13) Warren, F. L.; Watling, K. H. The *Euphorbia* Resins. Part X. The Structural Difference between Euphol and Tirucallol. *J. Chem. Soc.* **1958**, 179–184.
- (14) Singh, G. B.; Singh, S.; Sharma, M. L.; Suri, O. P.; Chopra, C. L.; Ammon, H. P. T. Hypotensive Activity of 8,24-Euphadiene-3 β -ol (Euphol). *Planta Med.* **1989**, 55, 498–500.
- (15) Yasukawa, K.; Akihisa, T.; Yoshida, Z.-Y.; Takido, M. Inhibitory Effect of Euphol, a Triterpene Alcohol from the Roots of *Euphorbia kansui*, on Tumor Promotion by 12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-acetate in Two-Stage Carcinogenesis in Mouse Skin. *J. Pharm. Pharmacol.* **2000**, 52, 119–124.
- (16) Anjali, P.; Sarang, B. Inhibition of Proinflammatory Cytokines and Mediators by Euphol. *J. Appl. Pharm. Sci.* **2013**, 3, 020–025.
- (17) Passos, G. F.; Medeiros, R.; Marcon, R.; Nascimento, A. F. Z.; Calixto, J. B.; Pianowski, L. F. The Role of PKC/ERK1/2 Signaling in the Anti-Inflammatory Effect of Tetracyclic Triterpene Euphol on TPA-Induced Skin Inflammation in Mice. *Eur. J. Pharmacol.* **2013**, 698, 413–420.
- (18) Dutra, R. C.; Claudino, R. F.; Bento, A. F.; Marcon, R.; Schmidt, É. C.; Bouzon, Z. L. Pianowski, L. F.; Calixto, J. B. Preventive and Therapeutic Euphol Treatment Attenuates Experimental Colitis in Mice. *PLoS ONE* **2011**, 6, e27122.
- (19) Lin, M.-W.; Lin, A.-S.; Wu, C.-D.; Wang, S. S. W.; Chang, F.-R.; Wu, Y.-C.; Huang, Y.-B. Euphol from *Euphorbia tirucalli* Selectively Inhibits Human Gastric Cancer Cell Growth through the Induction of ERK1/2-Mediated Apoptosis. *Food Chem. Toxicol.* **2012**, 50, 4333–4339.
- (20) Wang, L.; Wang, G.; Yang, D.; Guo, X.; Xu, Y.; Feng, B.; Kang, J. Euphol Arrests Breast Cancer Cells at the G1 Phase through the Modulation of Cyclin D1, p21 and p27 Expression. *Mol. Med. Rep.* **2013**, 8, 1279–1285.
- (21) Silva, V. A. O.; Rosa, M. N.; Miranda-Gonçalves, V.; Costa, A. M.; Tansini, A.; Evangelista, A. F.; Martinho, O.; Carloni, A. C.; Jones, C.; Lima, J. P.; Pianowski, L. F.; Reis, R. M. Euphol, a Tetracyclic Triterpene, from *Euphorbia tirucalli* Induces Autophagy and Sensitizes Temozolomide Cytotoxicity on Glioblastoma Cells. *Invest. New Drugs* **2018**, 37, 223–237.
- (22) Dutra, R. R.; Silva, K. B.; Bento, A. F.; Paszcuk, A. F.; Marcon, R.; Meiotto, F. C.; Motta, E. M.; Pianowski, L. F.; Calixto, J. B. Euphol, a Novel Cannabinoid Agonist, Prevents Inflammatory and Neuropathic Persistent Pain in Rodents. *Planta Med.* **2011**, 12, SL46.
- (23) Dutra, R. C.; Bortolini-Simão da Silva, K. A.; Bento, A. F.; Marcon, R.; Paszcuk, A. F.; Meiotto, F. C.; Pianowski, L. F.; Calixto, J. B. Euphol, a Tetracyclic Triterpene Produces Antinociceptive Effects in Inflammatory and Neuropathic Pain: The Involvement of Cannabinoid System. *Neuropharmacology* **2012**, 63, 593–605.

Referencias

- (24) Dutra, R. C.; Bicca, M. A.; Segat, G. C.; Silva, K. A. B. S.; Motta, E. M.; Pianowski, L. F.; Costa, R.; Calixto, J. B. The Antinociceptive Effects of the Tetracyclic Triterpene Euphol in Inflammatory and Neuropathic Pain Models: The Potential Role of PKC ϵ . *Neuroscience* **2015**, *303*, 126–137.
- (25) Dutra, R. C.; de Cezaro de Souza, P. R.; Bento, A. F.; Marcon, R.; Bicca, M. A.; Pianowski, L. F.; Calixto, J. B. Euphol Prevents Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice: Evidence for the Underlying Mechanisms. *Biochem. Pharmacol.* **2012**, *83*, 531–542.
- (26) de Oliveira, T. L.; Bavia, L.; Fontana, P. D.; Cruz, L. S.; Paludo, K. S.; Crisma, A. R.; Messias-Reason, I. J.; Beltrame, F. L. Immunomodulatory and Cytotoxic Activities of Euphol. *Life Sciences* **2021**, *280*, 119700–119710.
- (27) Hill, R. & Connolly, J. Triterpenoids. *Nat. Prod. Rep.* **2020**, *37*, 962–998.
- (28) Salvador, J. A. R.; Leal, A. S.; Valdeira, A. S.; Gonçalves, B. M. F.; Alho, D. P. S.; Figueiredo, S. A. C.; Silvestre, S. M.; Mendes, S. M. Oleanane-, Ursane-, and Quinone Methide Friedelane-Type Triterpenoid Derivatives: Recent Advances in Cancer Treatment. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *142*, 95–130.
- (29) Zhou, M.; Zhang, R.-H.; Wang, M. Xu, G.-B.; Liao, S.-G. Prodrugs of Triterpenoids and their Derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *131*, 222–236.
- (30) Ríos, J. L.; Máñez, S. New Pharmacological Opportunities for Betulinic Acid. *Planta Med.* **2018**, *84*, 8–19.
- (31) Peron, G.; Marzaro, G.; Dall'Acqua, S. Known Triterpene and their Derivatives as Scaffolds for the Development of New Therapeutic Agents for Cancer. *Curr. Med. Chem.* **2018**, *25*, 1259–1269.
- (32) Kumar, P.; Bhadauria, A. S.; Singh, A. K.; Saha, S. Betulinic Acid as Apoptosis Activator: Molecular Mechanisms, Mathematical Modeling and Chemical Modifications. *Life Sciences* **2018**, *209*, 24.
- (33) Sousa, J. L. C.; Freire, C. S. R.; Silvestre, A. J. D.; Silva, A. M. S. Recent Developments in the Functionalization of Betulinic Acid and Its Natural Analogues: A Route to New Bioactive Compounds. *Molecules* **2019**, *24*, 355–389.
- (34) Mlala, S.; Oyedeji, A. O.; Gondwe, M.; Oyedeji, O. O. Ursolic acid and Its Derivatives as Bioactive Agents. *Molecules* **2019**, *24*, 2751–2775.
- (35) Hodon, J.; Borkova, L.; Pokorny, J.; Kazakova, A.; Urban, M. Design and Synthesis of Pentacyclic Triterpene Conjugates and their Use in Medicinal Research. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *182*, 111653–111677
- (36) Khwaza, V.; Oyedeji, O. O.; Aderibigbe, B. A. Ursolic Acid-Based Derivatives as Potential Anti-Cancer Agents: An Update. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5920–5926.

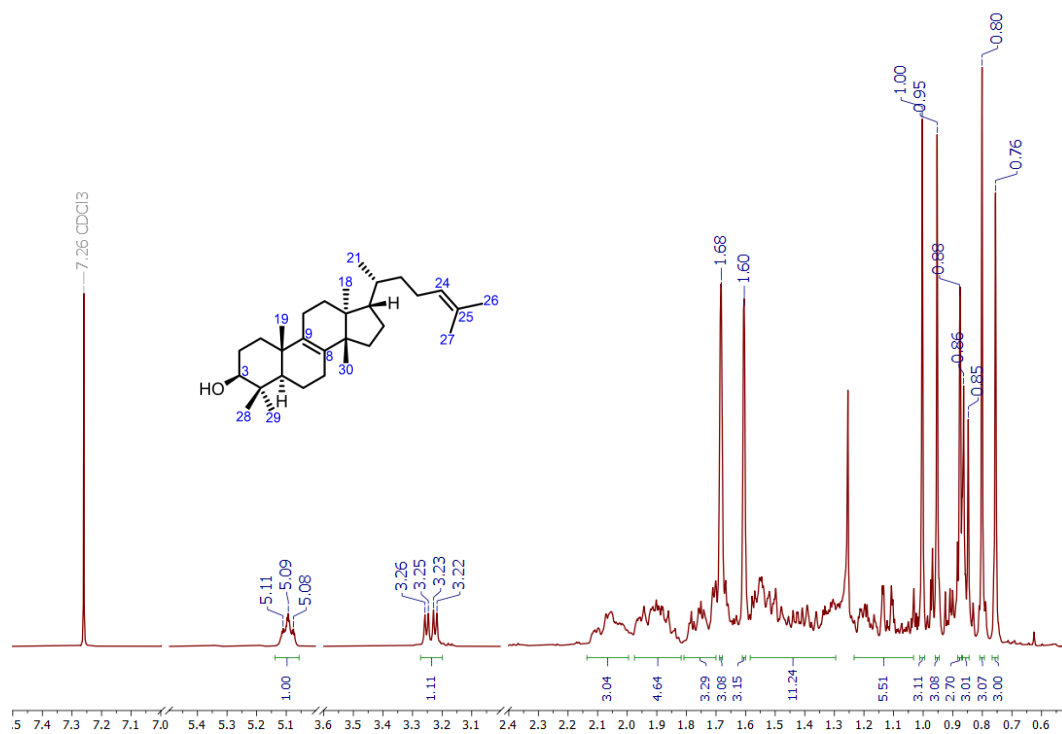
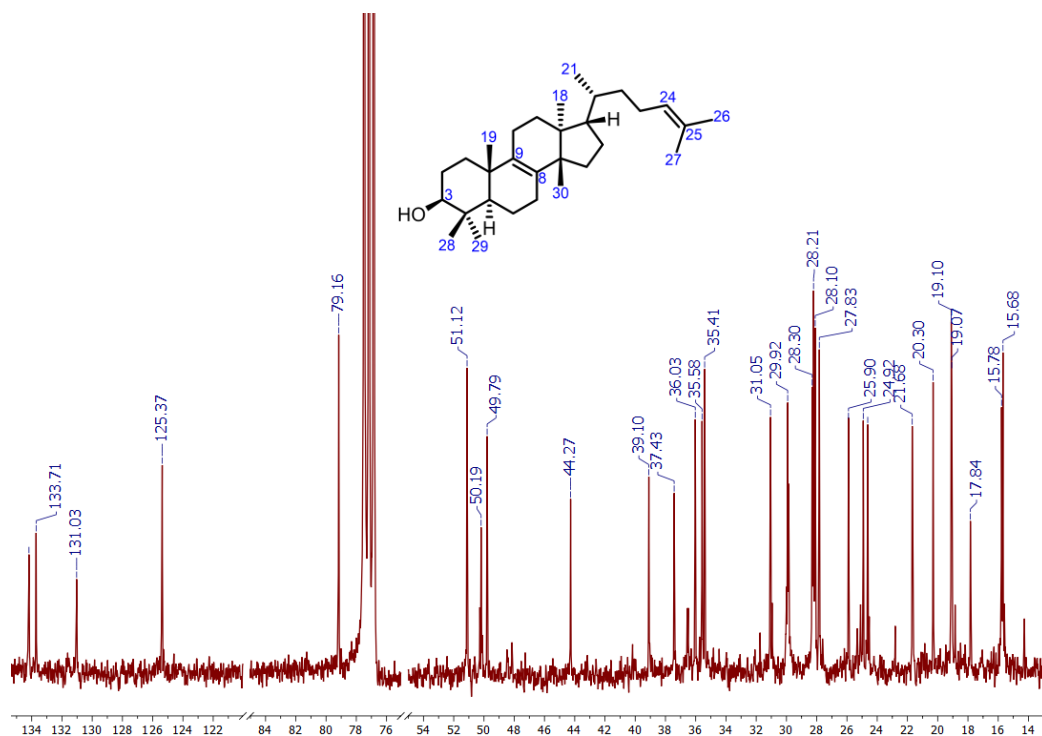
- (37) Zhang, Z.-J.; Morris-Natschke, S. L.; Cheng, Y.-Y.; K. Development of Anti-Influenza Agents from Natural Products. *Med. Res. Dev.* **2020**, *40*, 2290–2338.
- (38) Amiri, S.; Dastghaib, S.; Ahmadi, M.; Mehrbod, P.; Khadem, F.; Behrouj, H.; Aghanoori, M.-R.; Machaj, F.; Ghamsari, M.; Rosik, J. Hudecki, A.; Afkhami, A.; Hashemi, M.; Los, M. J.; Mokarram, P.; Madrakian, T.; Ghavami, S. Betulin and Its Derivatives as Novel Compounds with Different Pharmacological Activities. *Biotechnol. Adv.* **2020**, *38*, 107409–107447.
- (39) Wang, M.; Li, H.; Liu, W.; Cao, H.; Hu, X.; Gao, X.; Xu, F.; Li, Z.; Hua, H.; Li, D. Dammarane-Type Leads Panaxadiol and Protopanaxadiol for Drug Discovery: Biological Activity and Structural Modification. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *189*, 112087–112123.
- (40) Cunha, A. B.; Batista, R.; Castro, M. A.; David, J. M. Chemical Strategies towards the Synthesis of Betulinic Acid and Its More Potent Antiprotozoal Analogues. *Molecules* **2021**, *26*, 1081–1096.
- (41) Paquín, A.; Reyes-Moreno, C.; Bérubé, G. Recent Advances in the Use of the Dimerization Strategy as a Means to Increase the Biological Potential of Natural or Synthetic Molecules. *Molecules* **2021**, *26*, 2340–2370.
- (42) Liu, H.; Ahmad, N.; Lv, B.; Li, C. Harnessing Pivotal Advances for Production and Structural Derivation of the Promising Molecule Ursolic Acid. *Authorea Preprints* **2021**, DOI: [10.22541/au.161051738.80208321/v1](https://doi.org/10.22541/au.161051738.80208321/v1).
- (43) Majhi, S.; Das, D. Chemical Derivatization of Natural Products: Semisynthesis and Pharmacological Aspects- A Decade Update. *Tetrahedron* **2021**, *78*, 131801.
- (44) Héctor, R. F.; Bierer, D. E. New β -Glucan Inhibitors as Antifungal Drugs. *Expert Opin. Ther. Patents* **2011**, *21*, 1597–1610.
- (45) McCallister, S. *et al.* *Antivir. Ther.* **2008**, *13*, A10.
- (46) Zhang, B.-W.; Xing, Y.; Wen, C.; Yu, X.-X.; Sun, W.-L.; Xiu, Z.-L.; Dong, Y.-S. Pentacyclic Triterpenes as α -Glucosidase and α -Amylase Inhibitors: Structure-Activity Relationships and the Synergism with Acarbose. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 5065–5070.
- (47) Xu, J.; Nie, X.; Hong, Y.; Jian, Y.; Wu, G.; Yin, X.; Wang, C.; Wang, X. Synthesis of Water Soluble Glycosides of Pentacyclic Dihydroxytriterpene Carboxylic Acids as Inhibitors of α -Glucosidase. *Carbohydrate Res.* **2016**, *424*, 42–53.
- (48) Liu, X.; Zang, X.; Yin, X.; Yang, W.; Huang, J.; Huang, J.; Yu, C.; Ke, C.; Hong, Y. Semi-Synthesis of C28-Modified Triterpene Acid Derivatives from Maslinic Acid or Corosolic Acid as Potential α -Glucosidase Inhibitors. *Bioorg. Chem.* **2020**, *97*, 103694–103705.

Referencias

- (49) Khusnutdinova, E. F.; Petrova, A. V.; Thu, H. N. T.; Tu, A. L. T.; Thanh, T. N.; Thi, C. B.; Babkov, D. A.; Kazakova, O. B. Structural Modifications of 2,3-Indolobetulinic Acid: Design and Synthesis of Highly Potent α -Glucosidase Inhibitors. *Bioorg. Chem.* **2019**, *88*, 102957–102968.
- (50) Mazoir, N.; Benharref, A.; Bailén, M.; Reina, M.; González-Coloma, A.; Martínez-Díaz, R. A. *Z. Naturforsch.* **2011**, *66c*, 360–366.
- (51) Rykaczewski, K. A.; Wearing, E. R.; Blackmun, D. E.; Schindler, C. S. Reactivity of Oximes for Diverse Methodologies and Synthetic Applications. *Nat. Synth.* **2022**, *1*, 24–36.
- (52) O’Keeffe, R.; Kenny, O.; Brunton, N. P.; Hossain, M. B.; Rai, D. K.; Jones, P. W.; O’Brien, N.; Maguire, A. R.; Collins, S. G. Synthesis of Novel 24-Amino-25,26,27-Trisnorlanost-8-enes: Cytotoxic and Apoptotic Potential in U937 Cells. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 2270–2280.
- (53) Nakamura, A.; Nakada, M. Allylic Oxidations in Natural Product Synthesis. *Synthesis* **2013**, *45*, 1421–1451.
- (54) Heller, L.; Schwarz, S.; Perl, V.; Köwitsch, A.; Siewert, B.; Csuk, R. Incorporation of Michael Acceptors Enhances the Antitumor Activity of Triterpenoic Acids. *Euro. J. Med. Chem.* **2015**, *101*, 391–399.
- (55) Lee, S.; LaCour, R. G.; Fuchs, P. L. Chemistry of Trisdecacyclic Pyrazine Antineoplastics: The Cephalostatins and Ritterazines. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2275–2314.
- (56) Nes, W. D.; Wong, R. Y.; Benson, M.; Landrey, J. L.; Nes, W. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1984**, *81*, 5896–5900.
- (57) Ferrer, M. D.; Busquets-Cortés, C.; Capó, X.; Tejada, S.; Tur, J. A.; Pons, A.; Sureda, A. Cyclooxygenase-2 Inhibitors as a Therapeutic Target in Inflammatory Diseases. *Curr. Med. Chem.* **2019**, *26*, 3225–3241.
- (58) Lapaillerie, D.; Charlier, C.; Fernandes, H. S.; Sousa, S. F.; Lesbats, P.; Weigel, P.; Favereaux, A.; Guyonnet-Duperat, V.; Parissi, V. *In Silico, In Vitro* and *In Cellulo* Models for Monitoring SARS-CoV-2 Spike/Human ACE2 Complex, Viral Entry and Cell Fusion. *Viruses*, **2021**, *13*, 365–381.
- (59) Singh, S.; Florez, H. Coronavirus Disease 2019 Drug Discovery Through Molecular Docking. *F1000Research* **2020**, *9*, 502–516.
- (60) Yu, W.; Mei, Y.; Kang, Y.; Hua, Z.; Jin, Z. Improved Procedure for the Oxidative Cleavage of Olefins by OsO₄-NaIO₄. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3217–3219.
- (61) Bennet, R. N. E.; Warren, F. L. The Euphorbia Resins. Part III. The Epimerisation and Dehydration of Euphol. *J. Chem. Soc.* **1950**, 697–699.
- (62) Dutta, N. L. Karimullah, A. Chemical Examination of the Dried Latex from *Euphorbia tirucalli*. *J. Sci. Ind. Res. India* **1944**, *3*, 212.

CAPÍTULO 8.

ANEXO: ESPECTROS

Figura 15. Espectro de RMN ^1H del eufol, 1 (CDCl_3 , 400 MHz).Figura 16. Espectro de RMN ^{13}C del eufol, 1 (CDCl_3 , 100 MHz).

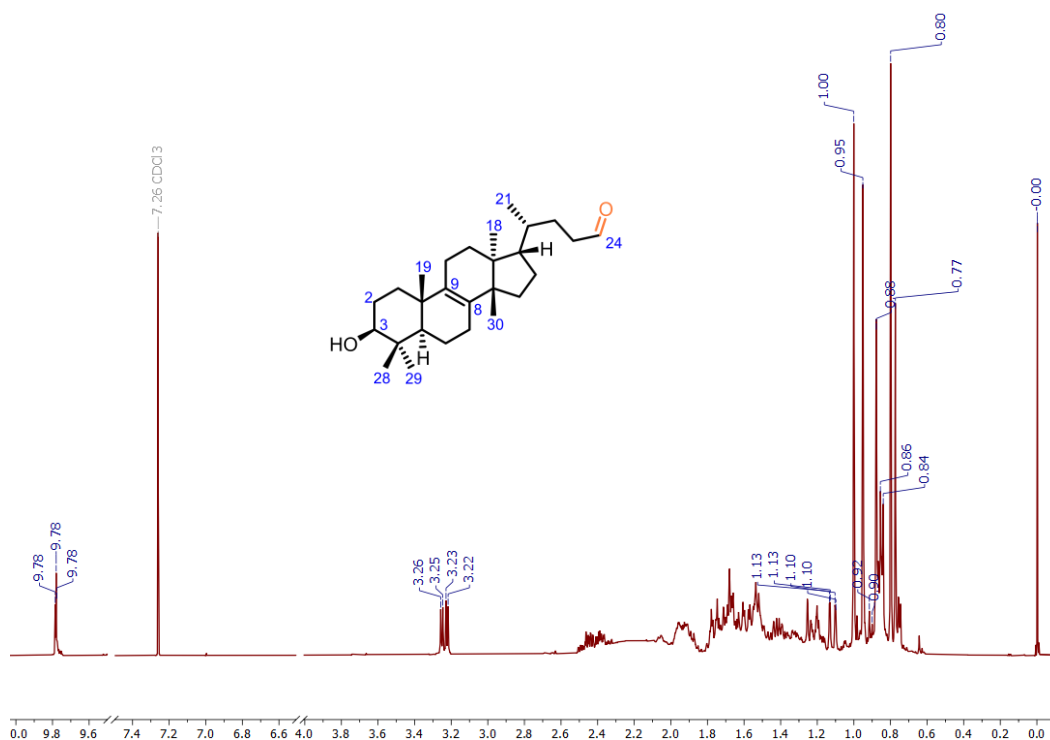


Figura 17. Espectro de RMN ¹H del 25,26,27-trisnor-3β-hidroxi-eufan-24-al, **14** (CDCl₃, 400 MHz).

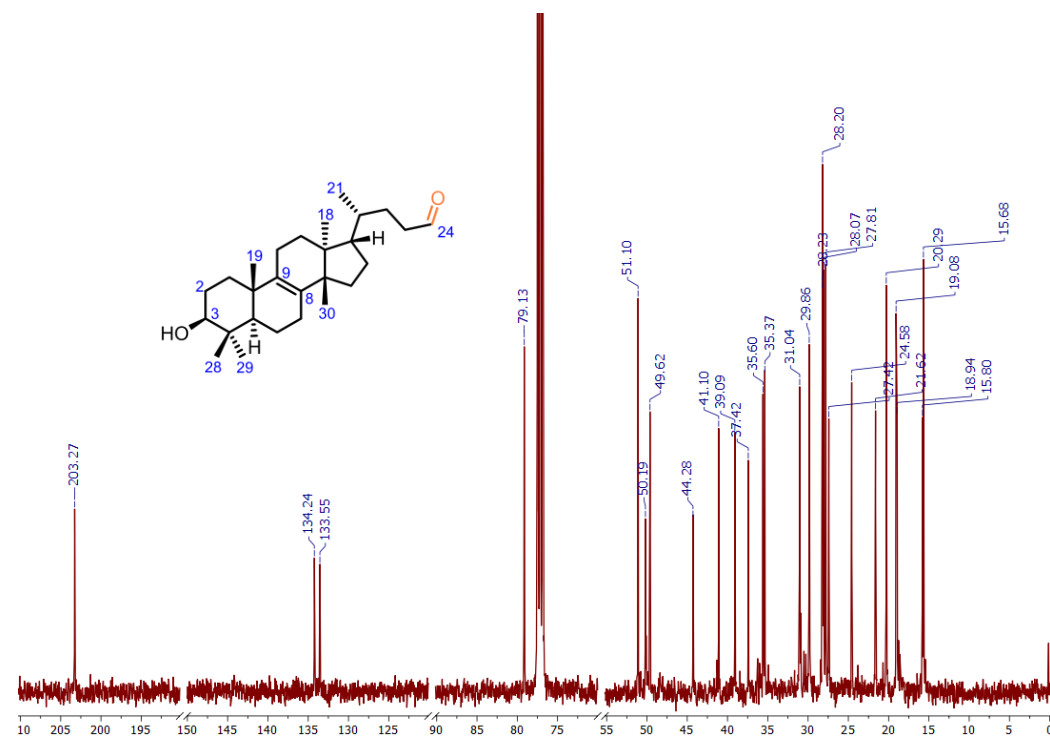


Figura 18. Espectro de RMN ¹³C del 25,26,27-trisnor-3β-hidroxi-eufan-24-al, **14** (CDCl₃, 100 MHz).

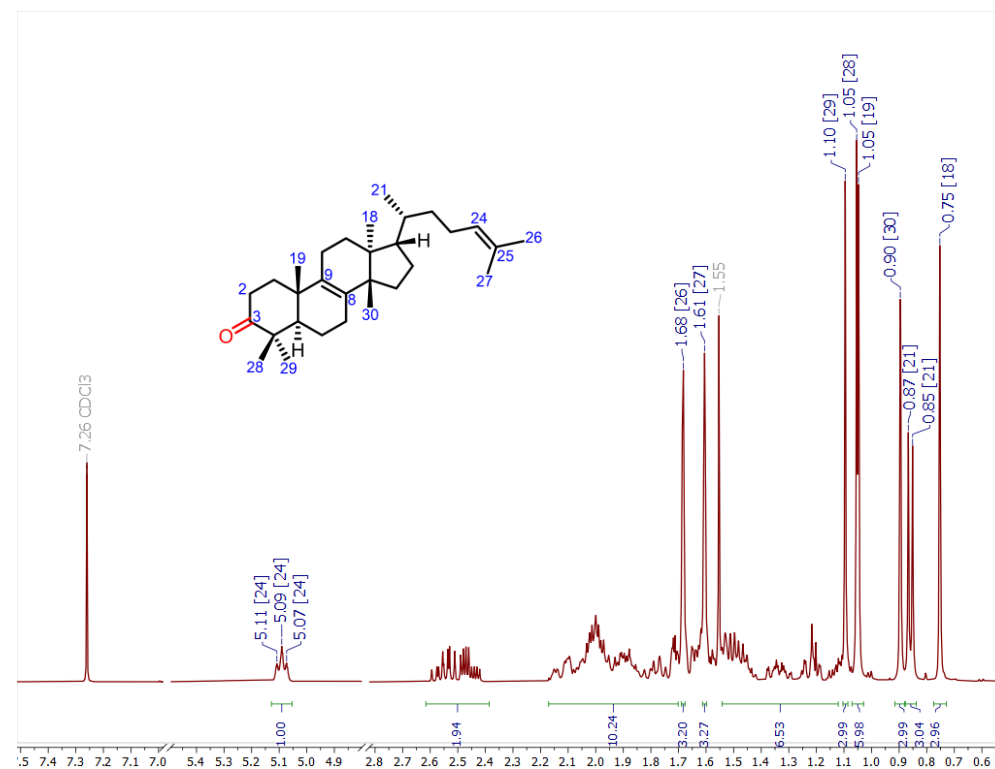


Figura 19. Espectro de RMN ¹H de la eufona, 17. (CDCl₃, 400 MHz).

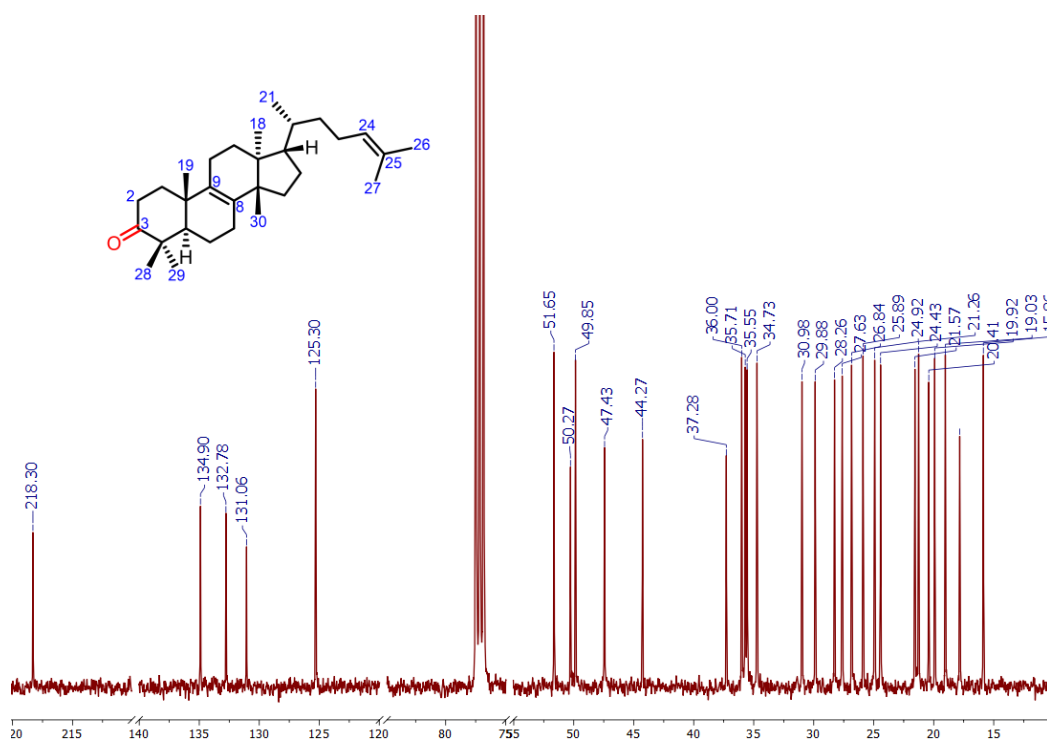


Figura 20. Espectro de RMN ¹³C de la eufona, 17. (CDCl₃, 100 MHz).

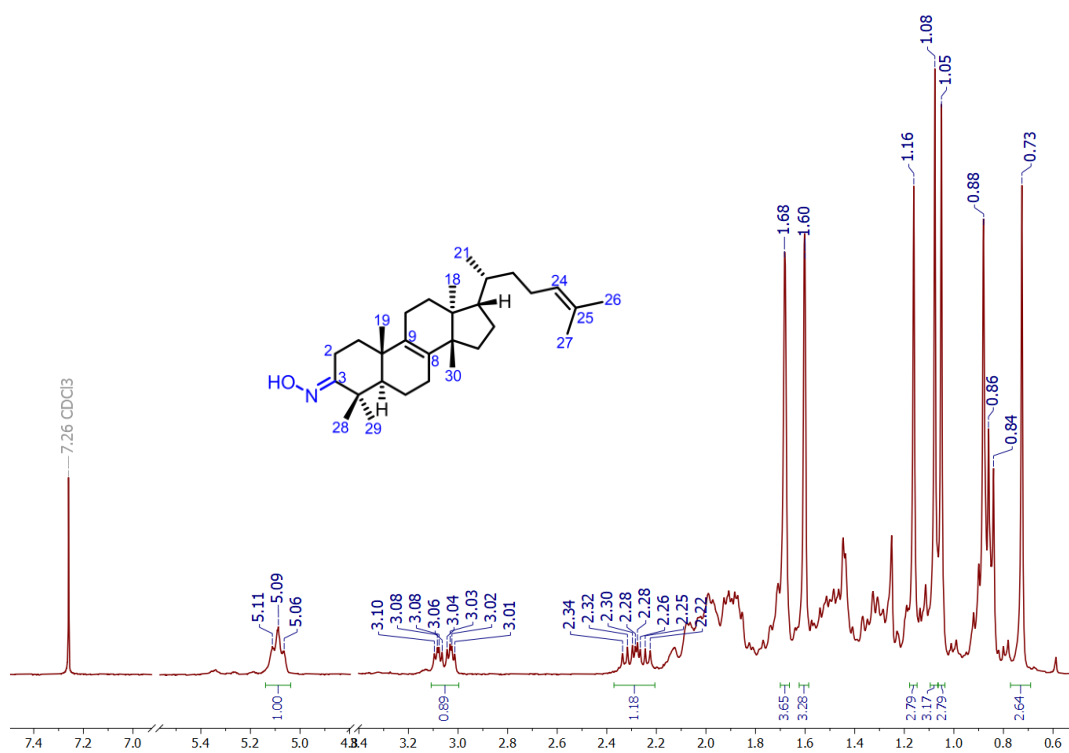


Figura 21. Espectro de RMN ^1H de la oxima de eufonia, **18** (CDCl₃, 300 MHz).

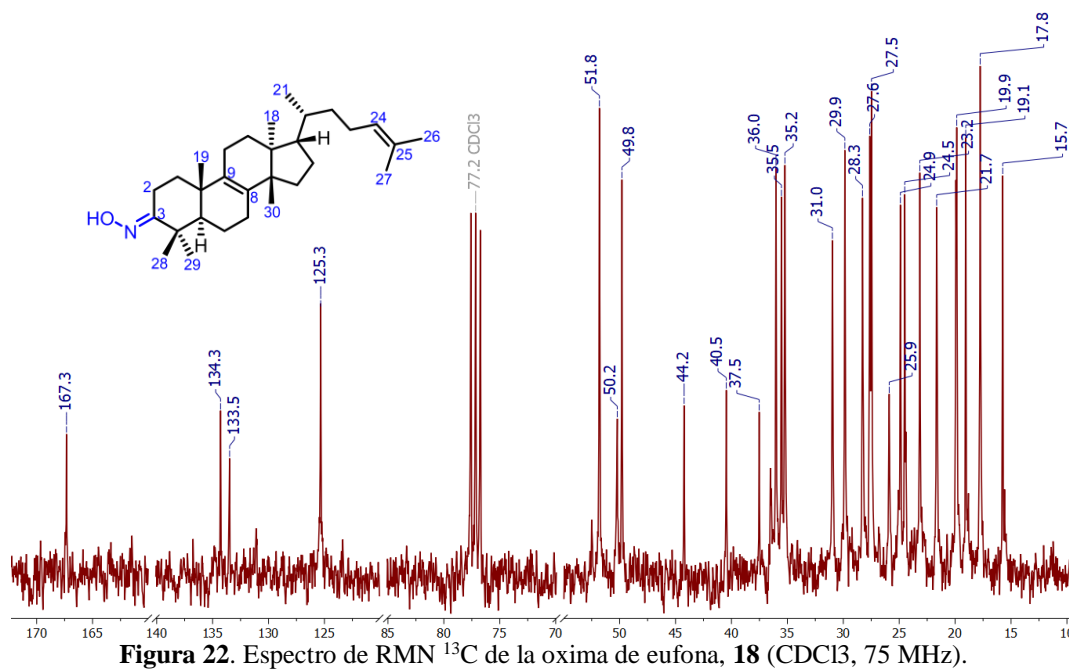


Figura 22. Espectro de RMN ^{13}C de la oxima de eufonia, **18** (CDCl₃, 75 MHz).

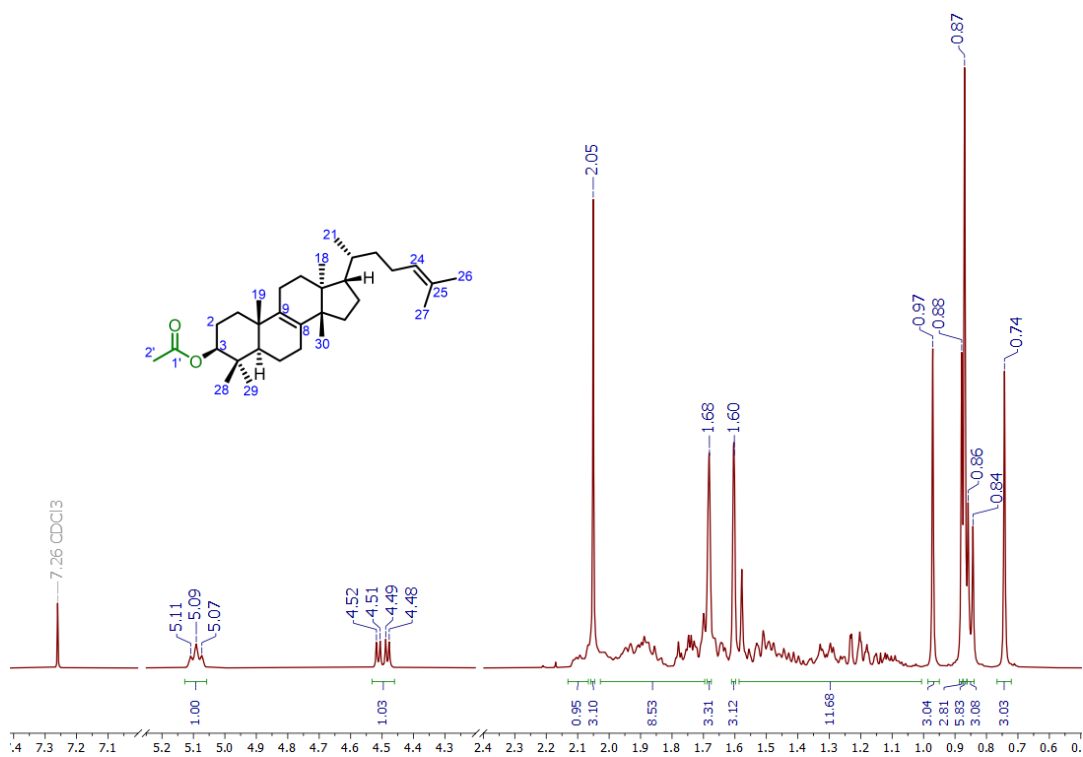


Figura 23. Espectro de RMN ¹H del acetato de eufilo, **19** (CDCl₃, 400 MHz).

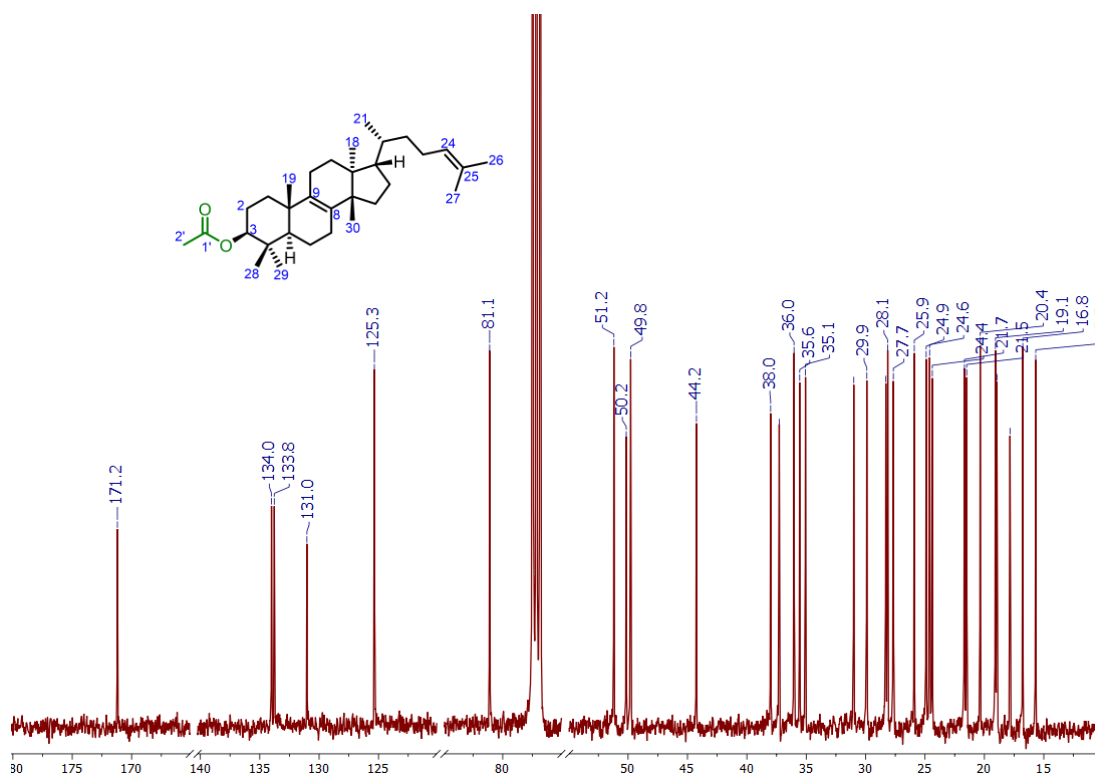


Figura 24. Espectro de RMN ¹³C del acetato de eufilo, **19** (CDCl₃, 100 MHz).

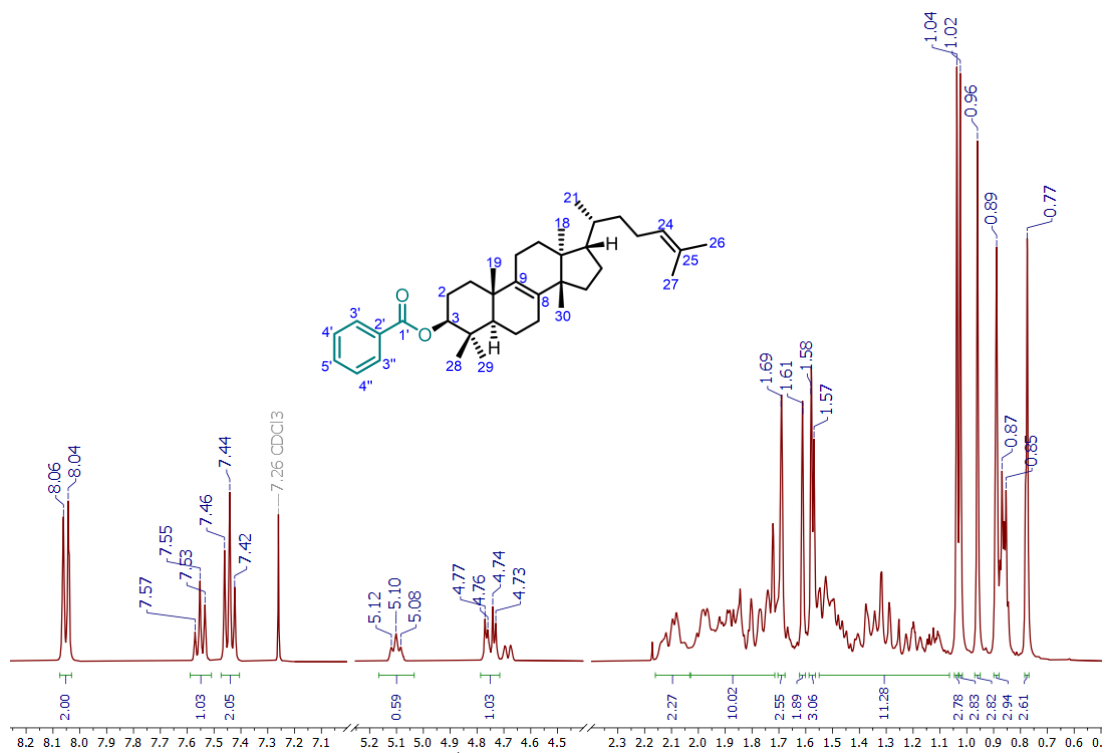


Figura 25. Espectro de RMN ^1H del benzoato de eufilo, **20** (CDCl_3 , 400 MHz).

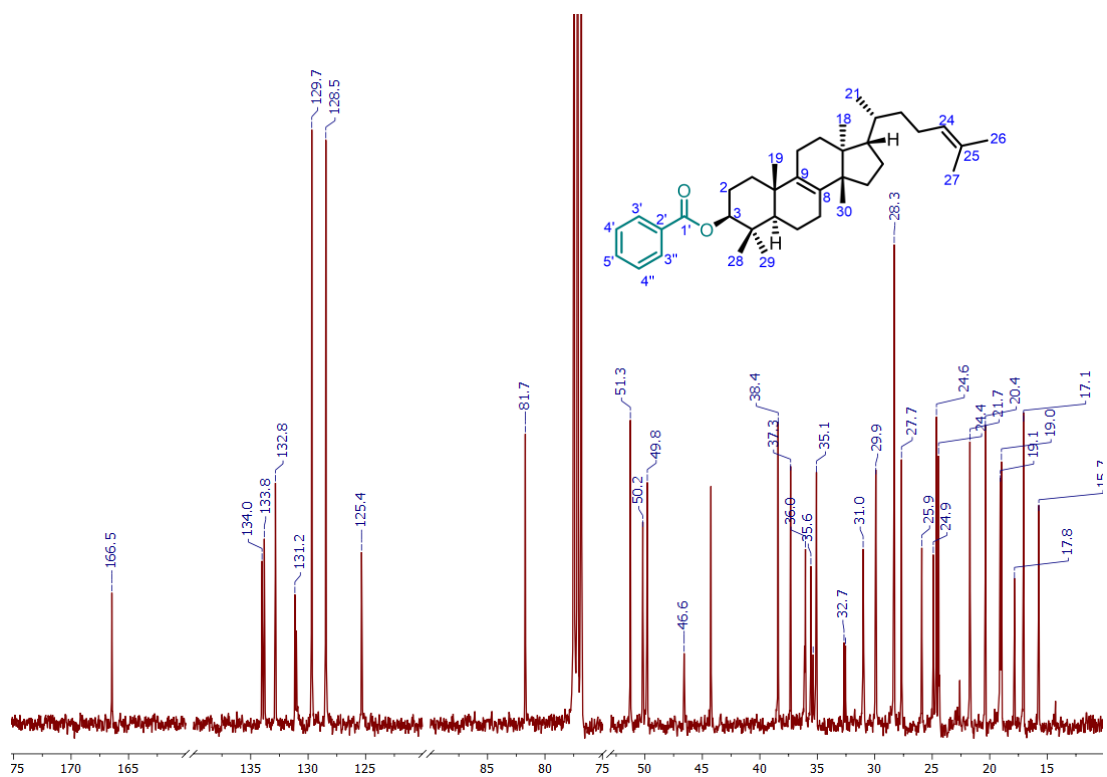


Figura 26. Espectro de RMN ^{13}C del benzoato de eufilo, **20** (CDCl_3 , 100 MHz).

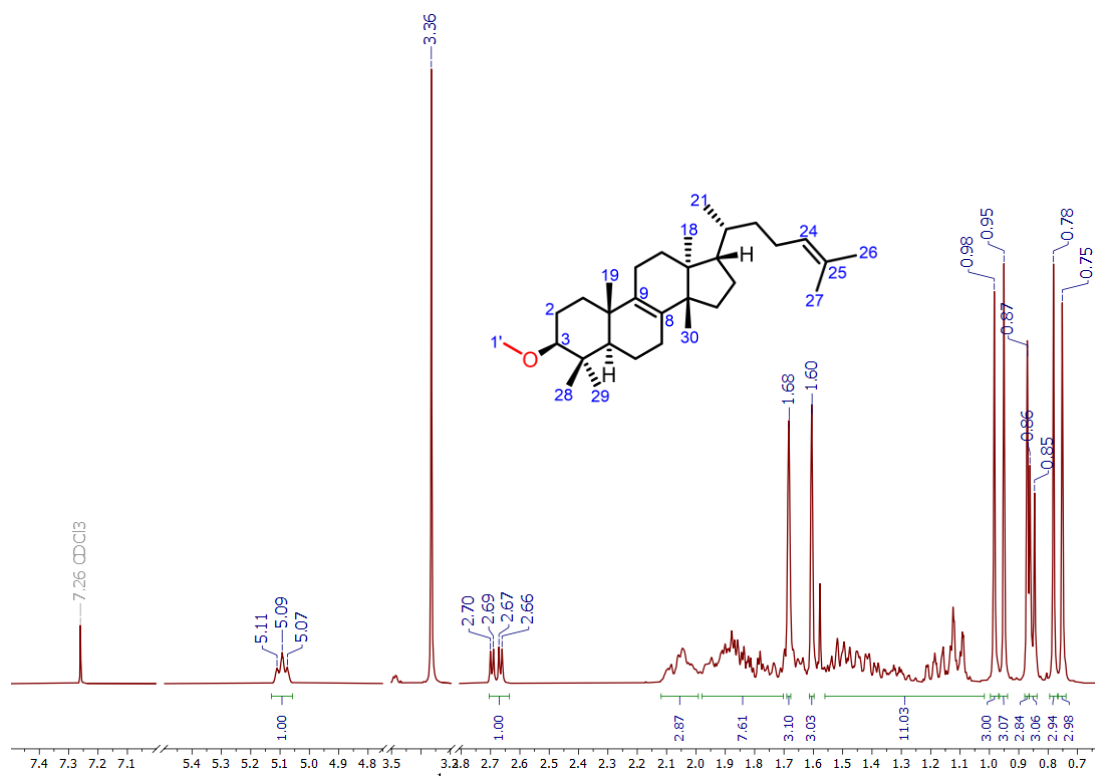


Figura 27. Espectro de RMN ¹H del éter metílico del eufol, **21** (CDCl₃, 400 MHz).

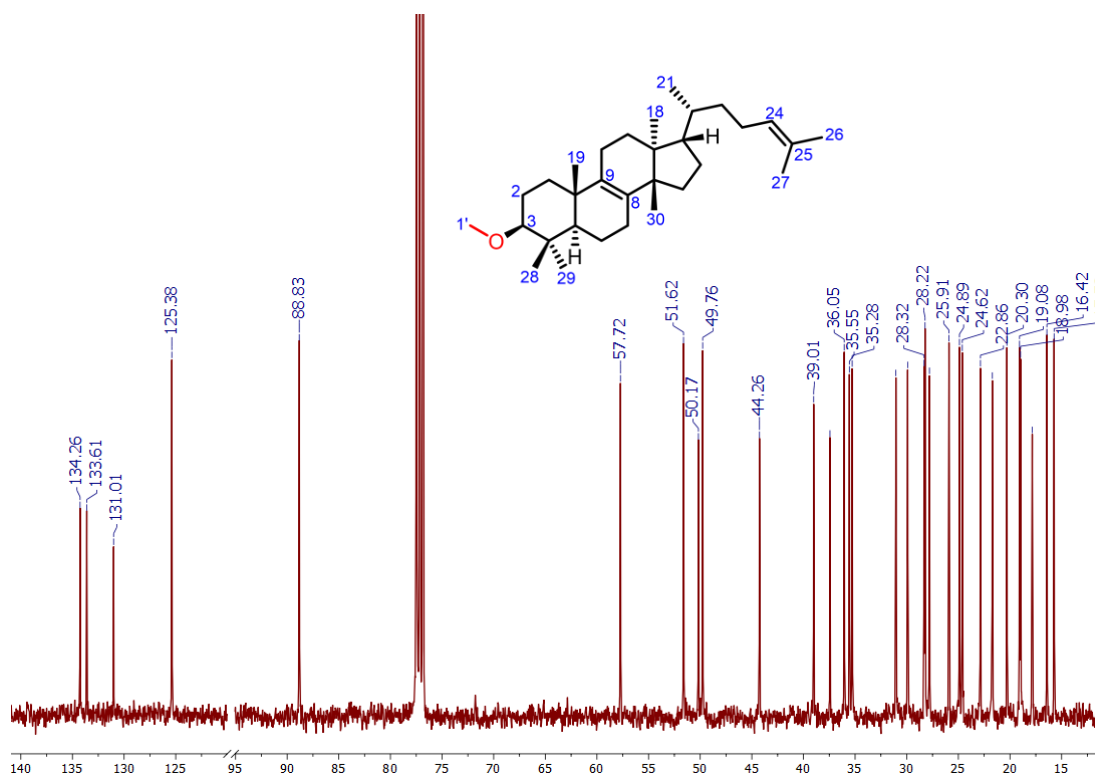


Figura 28. Espectro de RMN ¹³C del éter metílico del eufol, **21** (CDCl₃, 100 MHz).

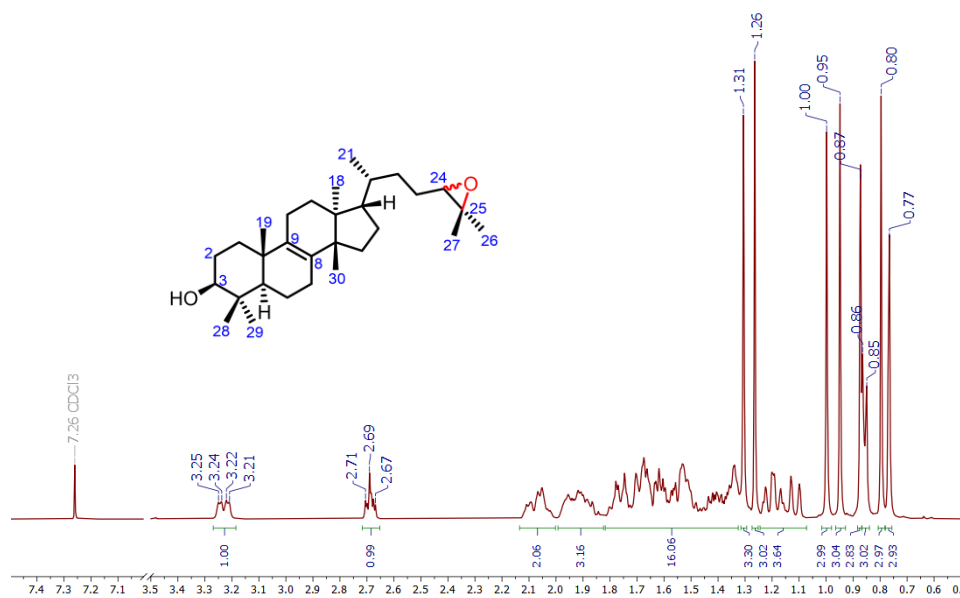


Figura 29. Espectro de RMN ^1H del 24,25-óxido de eupol, **22** (CDCl_3 , 400 MHz).

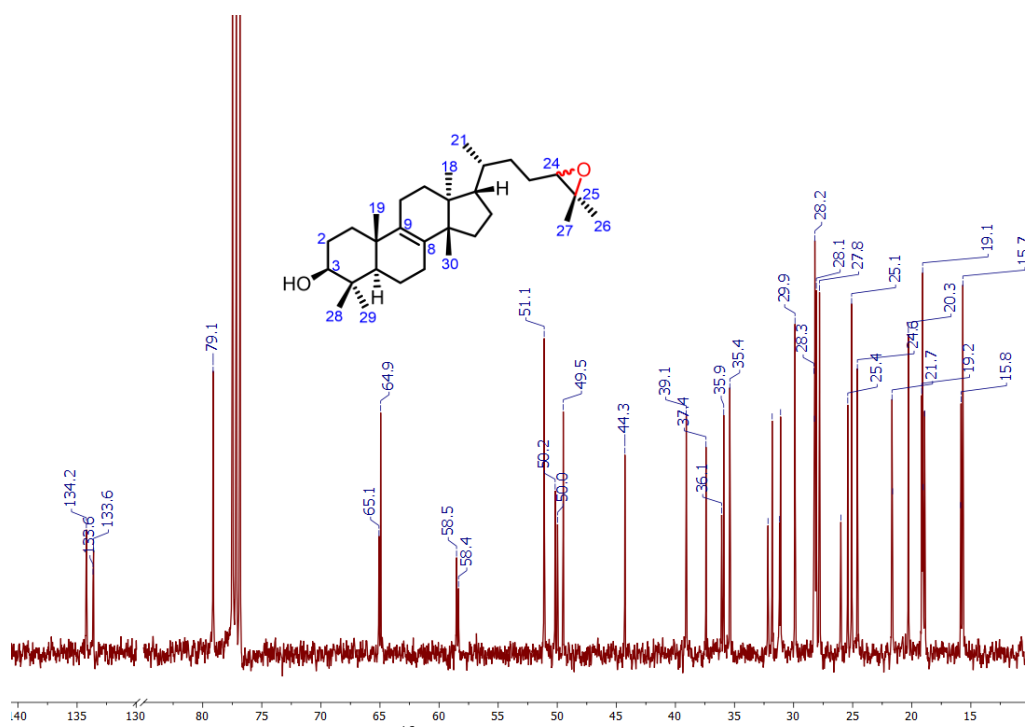


Figura 30. Espectro de RMN ^{13}C del 24,25-óxido de eupol, **22** (CDCl_3 , 100 MHz).

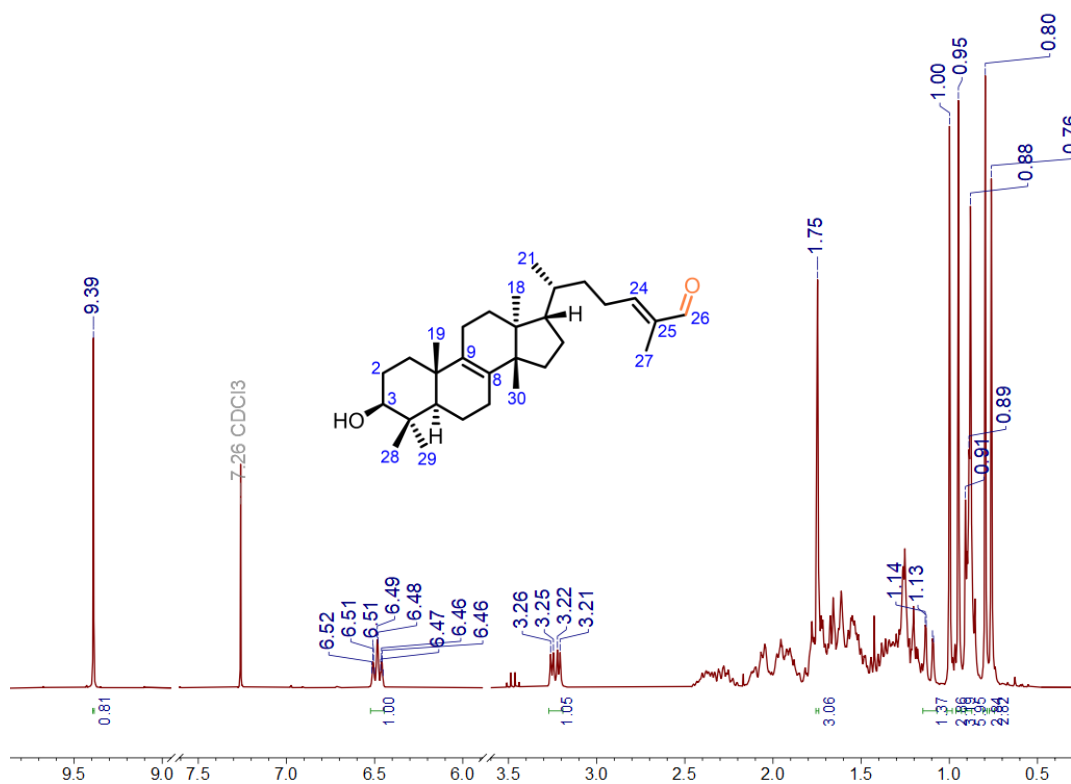


Figura 31. Espectro de RMN ^1H del 3β-hidroxi-eufan-26-al, **23** (CDCl_3 , 400 MHz).

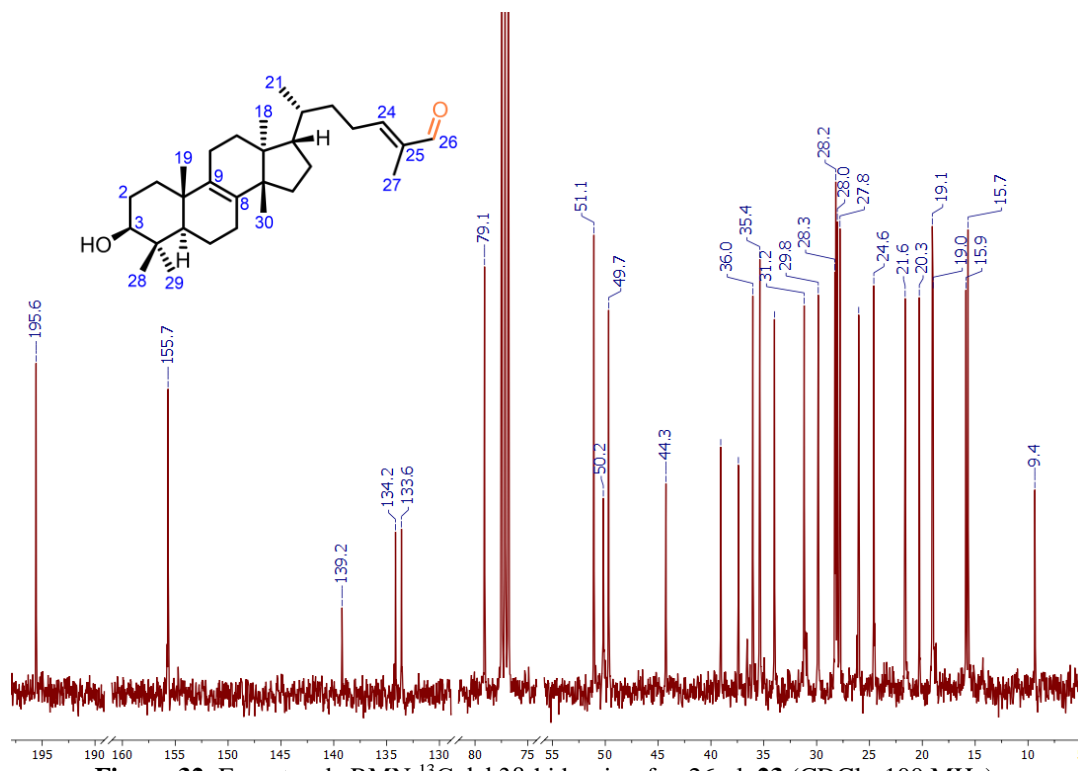


Figura 32. Espectro de RMN ^{13}C del 3β-hidroxi-eufan-26-al, **23** (CDCl_3 , 100 MHz).

Trisnor-Euphane-Type Triterpenoid and Other Constituents Isolated from *Euphorbia tanquahuete* Sessé & Moc.: Preparation and Cytotoxic Evaluation of Semisynthetic Derivatives of Euphol

Luis J. Romero-Morán, María Teresa Ramírez-Apan, Simón Hernández-Ortega, Diego Martínez-Otero, and Guillermo Delgado*



Cite This: *ACS Omega* 2022, 7, 35077–35082



Read Online

ACCESS |



Metrics & More

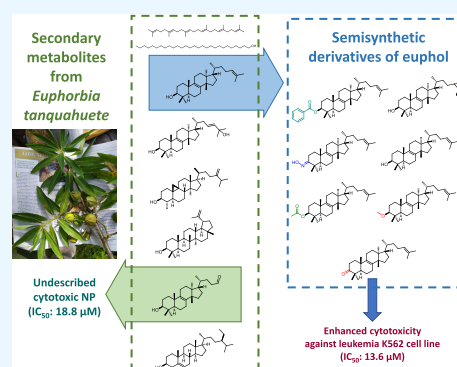


Article Recommendations



Supporting Information

ABSTRACT: The natural compound 25,26,27-trisnor-3 β -hydroxy-euphan-24-al (**1**) was isolated for the first time from the bioactive extract of the leaves of *Euphorbia tanquahuete*, together with the known compounds euphol, eupa-8,23-dien-3 β ,25-diol, lupeol, cycloeucaleanol, β -sitosterol, squalene, and 1-octacosanol. The structure of the new compound was elucidated based on extensive analysis of spectroscopic data and by semisynthesis from euphol. The chemical modification of the alcohol at C3 and the side chain of euphol afforded seven derivatives (**6**–**12**). The cytotoxic activity of the natural and semisynthetic compounds evaluated against a panel of human cancer cell lines showed selectivity for certain cell lines and indicated that natural compound **1** and semisynthetic **8** were the most active against leukemia (K562) cell line.



INTRODUCTION

The genus *Euphorbia* (family Euphorbiaceae, subfamily Euphorbioideae) is one of the largest groups of the angiosperms comprising ~2000 species that are distributed worldwide.¹ Its recognized morphological variety is reflected in the great diversity of secondary metabolites, including terpenoids, steroids, glycerols, acetophenones, and flavonoids, *inter alia*, displaying a wide array of biological activities^{2–4} considered relevant in human health.⁵ *Euphorbia* is also recognized as one of the most diverse genera of Mexican vascular plants.^{6,7} Following our research on the bioactive constituents of the spurge family,^{8,9} here we report (i) the chemical constituents of the bioactive extract of the aerial parts of *Euphorbia tanquahuete* Sessé & Moc. (Euphorbiaceae), a tree found in the central-southern region of Mexico that is used in traditional medicine to treat bone fractures^{10,11} from which we identify the cytotoxic compounds and (ii) the preparation and preliminary cytotoxic evaluation of a series of derivatives of euphol,^{12,13} the major bioactive metabolite of this plant, which led to the discovery of selectivity and enhanced cytotoxicity of the derivatives.

RESULTS AND DISCUSSION

Structural Elucidation of Isolated Compounds. The methylene chloride/methanol extract of the aerial parts of *E. tanquahuete* exhibited activity against a panel of human cancer cells (see Table 2). This extract was subjected to successive chromatographic procedures affording an undescribed trisnor

triterpene (**1**) and seven known compounds eupa-8,24-dien-3 β -ol (euphol, **2**),^{14,15} eupa-8,23-dien-3 β ,25-diol (**3**),^{16,17} lupeol (**4**),¹⁸ cycloeucaleanol (**5**),¹⁹ β -sitosterol,²⁰ squalene,²¹ and 1-octacosanol,^{22,23} whose structures were confirmed by comparison of spectroscopic data with those reported in the literature (Figure 1).

The undescribed natural compound **1** was obtained as colorless needles (*n*-hexane). Its molecular formula was determined as C₂₇H₄₄O₂ by HRESIMS, which showed a pseudo-molecular ion peak at *m/z* 401.34118 [M + H]⁺ (calcd. for C₂₇H₄₅O₂ 401.34195), indicating six unsaturations. The IR spectrum indicated absorption bands for hydroxyl (3613 cm⁻¹) and carbonyl (1709 cm⁻¹) groups. A total of 27 carbon signals were observed in the ¹³C NMR spectrum (Table 1), consistent with the found molecular formula; based on DEPT-90 and DEPT-135 experiments, these carbons were classified as six methyls, ten methylenes, five methines, and six quaternary carbons including two vinylic carbons, which indicated the presence of a tetrasubstituted olefin. The ¹³C spectrum also showed a carbonyl signal at δ_C 203.30, justifying the absorption band observed in the IR spectrum, and the signal at δ_H 9.78

Received: June 24, 2022

Accepted: September 8, 2022

Published: September 20, 2022



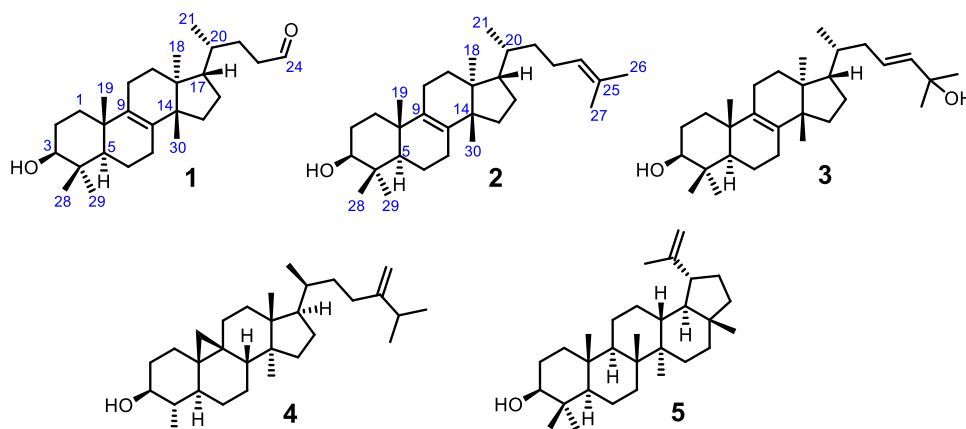


Figure 1. Chemical structures of natural compounds 1–5.

Table 1. ^1H (400 MHz) and ^{13}C NMR (100 MHz) Data, DEPT, and HMBC Correlations of Compound 1 in CDCl_3

position	δ_{C} , type	δ_{H} (J in Hz)	HMBC
1	35.37, CH_2	1.19, 1.75, <i>m</i>	C19, C10,
2	28.07, CH_2	0.82, 1.38, <i>m</i>	C1, C3, C4, C10
3	79.00, CH	3.24, <i>dd</i> (11.3, 4.4)	C4, C28, C29
4	39.09, C		
5	51.10, CH	1.25, <i>dd</i> (12.4, 2.0)	C19, C28, C29
6	19.08, CH_2	1.42, 1.69, <i>m</i>	C4, C5, C10, C8, C7
7	27.80, CH_2	1.38, 2.13, <i>m</i>	C5, C6, C8, C9, C14
8	133.55, C		
9	134.24, C		
10	37.42, C		
11	21.62, CH_2	1.95, 2.07, <i>m</i>	C8, C9, C10, C12, C13
12	31.03, CH_2	1.61–1.75, <i>m</i>	C9, C11, C13, C14, C18
13	44.28, C		
14	50.19, C		
15	29.86, CH_2	1.22, 1.52, <i>m</i>	C30, C13, C14, C16, C17
16	28.23, CH_2	0.92–1.09, <i>m</i>	
17	49.62, CH	1.50, <i>m</i>	C13, C18, C20, C21, C16
18	15.68, CH_3	0.77, <i>s</i>	C12, C13, C14, C17
19	20.29, CH_3	0.95, <i>s</i>	C1, C5, C9, C10
20	35.61, CH	1.52, <i>m</i>	C21, C22, C17, C13
21	18.94, CH_3	0.85, <i>d</i> (6.4)	C17, C20, C22
22	41.10, CH_2	2.32–2.50, <i>m</i>	C20, C23, C24
23	27.40, CH_2	1.43, 1.99, <i>m</i>	
24	203.30, CH	9.78, <i>t</i> (2.0)	C22, C23
28	15.80, CH_3	0.80, <i>s</i>	C4, C5, C3, C29
29	28.20, CH_3	1.00, <i>s</i>	C3, C4, C5, C28
30	24.59, CH_3	0.88, <i>s</i>	C8, C13, C14, C15

established the presence of an aldehyde. Therefore, this compound was determined as a tetracyclic compound with a tetrasubstituted olefin and an aldehyde, in agreement with the number of unsaturations. The ^1H NMR spectrum (Table 1) showed five methyl singlets at δ_{H} 0.77, 0.80, 0.88, 0.95, and 1.00 (each 3H), a secondary methyl signal at δ_{H} 0.85 (3H, *d*, $J = 6.4$ Hz), and an oxy-methine proton at δ_{H} 3.24 (1H, *dd*, $J = 11.3, 4.4$ Hz), which could be assigned, according to the coupling constants, to a hydrogen geminal to a β -oriented hydroxyl group at C3 of the tetracyclic triterpenes. Taken together, this information suggested that compound 1 was a euphane- or tirucallane-like triterpenoid with three missing carbons. Comparison of ^1H and ^{13}C NMR data of compound 1 with our sample of eupha-8,24-dien-3 β -ol (2) showed very similar chemical shifts with a remarkable absence of the vinylic

methyl singlets in 1, indicating the loss of C25, C26, and C27, and that the aldehyde group is located at C24.^{24,25} HMBC cross-peaks of H3 (δ_{H} 3.24) with C2/C4/C5/C28/C29, of H₃-19 (δ_{H} 0.95) with C1/C5/C10/C9, of H₃-18 (δ_{H} 0.77) with C13/C12/C17/C14, and of H₃-20 (δ_{H} 1.52) with C21/C22/C17/C13 confirmed the molecular connectivity for compound 1.

For further identification, compound 1 was semisynthesized from eupha-8,24-dien-3 β -ol (2) via oxidative cleavage of the olefin by treatment with *m*CPBA followed by H_5IO_6 , as described by O’Keeffe et al.²⁶ The properties of semisynthetic 1 were identical to those of the natural compound. Furthermore, the acetylated form of compound 1 was previously reported, and its ^1H NMR is in agreement with

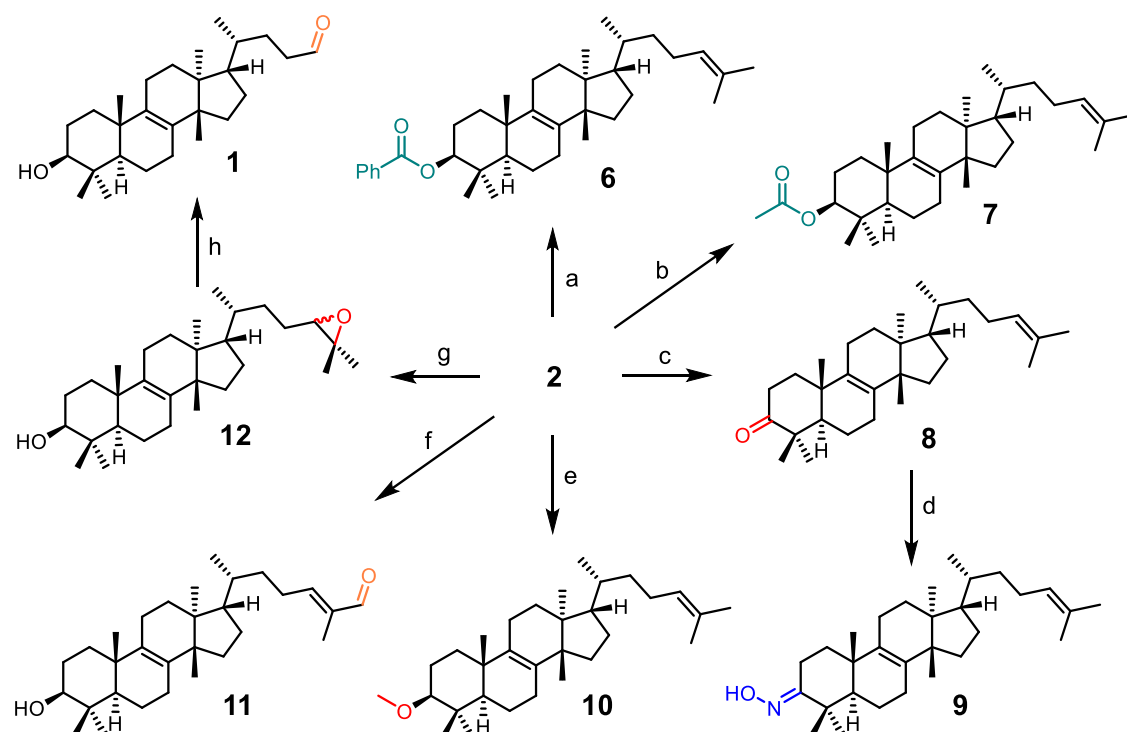


Figure 2. Reaction scheme for the preparation of derivatives of euphol (2). (a) BzCl, py; (b) Ac₂O, py; (c) Jones reagent; (d) NH₂OH·HCl, NaOAc; (e) CH₃I, NaH; (f) SeO₂; (g) *m*CPBA; and (h) H₅IO₆.

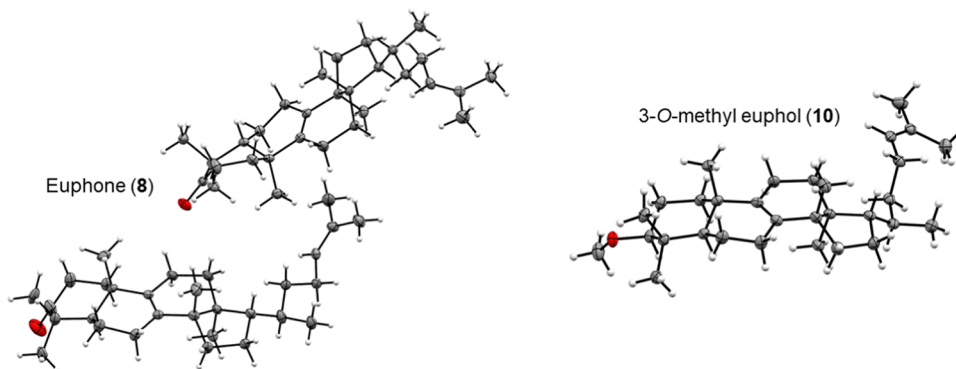


Figure 3. ORTEP drawing of X-ray structure of euphone (8) and 3-O-methyl euphol (10).

the expected chemical shift changes of H3 (δ_{H} 4.48 for the ester and δ_{H} 3.24 for the isolated compound).¹⁴

Preparation of Semisynthetic Derivatives of Euphol (6–12). Taking into account the functional groups of euphol (2), we decided to modify the A ring and the side chain and to identify the changes in the cytotoxicity of the derivatives. Compound 2 was used as starting material for the preparation of the semisynthetic derivatives 6–12 (Figure 2). Ring A modifications consisted in varying the C3 functional group (as in 6–10), and compounds 11 and 12 carried modifications at the side chain. As mentioned previously, the oxidative cleavage of eupa-8,24-dien-3 β -ol (2) allowed the chemical correlation to obtain a new natural compound (1).

Esters 6 and 7 were synthesized by reacting euphol (2) with benzoyl chloride and acetic anhydride, respectively. Euphone (8) was obtained by reaction of 2 with Jones reagent, and ketone 8 in turn served as the starting material for the preparation of the oxime 9. The preparation of methyl ether 10 was achieved by reaction with methyl iodide in the presence of

NaH. Allylic oxidation of euphol (2) with SeO₂ afforded α,β -unsaturated aldehyde 11. Derivative 12 was prepared by reaction of compound 2 with *m*CPBA. Epoxide 12 was used in turn for the preparation of compound 1 through oxidative cleavage with H₅IO₆. Semisynthetic compounds 6–12 were characterized by their physical and spectroscopic characteristics. It is noteworthy that although derivatives 6–9 were previously prepared, here we report the complete characterization for these compounds. Furthermore, this is the first report for semisynthetic derivatives 10–12.

X-ray Structure Analysis. Ketone 8 and methyl ether 10 afforded appropriate crystals for X-ray diffraction by recrystallization from *i*PrOH and MeOH, respectively. X-ray crystal diffraction analysis confirmed the absolute configuration of these compounds [Flack parameter: 0.09(6) and 0.09(4), respectively], and therefore, the starting material and the other derivatives have the connectivity and stereochemistry of an euphane core. Inspection of the crystalline structure (Figure 3) shows that the asymmetric unit for the crystal of derivative 8 is

Table 2. Cytotoxic Activities (% of Inhibition) of the Extract, Natural Products, and Derivatives^a

sample	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1	COS7
CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH 1:1 (leaves extract)	52.31	43.6	74.63	34.5	62.45	58.35	NP
(1)	59.8	87.2	100	74.6	61.4	88.4	22.0
euphol (2)	NA	NA	26.9	2.18	36.62	4.9	NA
lupeol (5)	27.3	50.7	48.8	10.4	22.3	13.0	NP
(6)	NA	NA	33.1	15.6	1.3	10.9	NA
(7)	NA	NA	39.8	39.4	20.1	40.0	NA
(8)	NA	NA	95.0	12.2	1.5	31.3	17.2
(10)	NA	NA	57.8	4.3	4.3	21.6	NA
(12)	NA	NA	34.1	16.4	NA	4.6	NA
etoposide ^b	91.1 ^c	51.4 ^d	60.2 ^d	80.8 ^d	56.8 ^d	81.7 ^d	NP

NA: no activity; ND: not determined. Human tumor cell lines: U251 (glioblastoma), PC-3 (prostate), K562 (leukemia), HCT-15 (colon), MCF-7 (breast), and SKLU-1 (lung). COS7: noncancerous cell line of monkey kidney. ^aConcentrations: 50 μg/mL for the extract, 50 μM for pure compounds, DMSO vehicle. ^bPositive control. ^cConcentration at 10 μM. ^dConcentration at 31 μM.

composed of two stacked molecules, each one with a different orientation and conformation. For both derivatives, the side chain orientation in the crystalline structure is defined by the *R* configuration of C20, which favors an anti-periplanar arrangement of the hydrogens at the C17–C20 bond. This is consistent with the conformation found in the crystalline structure of acetyl derivative 7 reported in the literature.²⁷ Parameters on the crystallographic information file (CIF) format of compounds 8 and 10 were deposited at the Cambridge Crystallographic Data Centre [CCDC2178145 (8) and CCDC2181277 (10)] (details in the [Supporting Information](#)).

Cytotoxic Activity. The cytotoxic activity was evaluated for the extract, natural products 1, 2, and 5, and derivatives 6–8, 10, and 12 as percentages of inhibition of proliferation against the following tumor cell lines (see Table 2): glioblastoma (U251), prostate (PC-3), leukemia (K562), colon (HCT-15), breast (MCF-7), and lung (SKLU-1). The cytotoxic evaluation indicated that compound 1 was the most active among the natural products, in agreement with the observed activity of the extract. Complementarily, the most abundant secondary metabolites of the extract of *E. tanquahuete*, euphol (2) and lupeol (5), showed activity in some cell lines. The results also indicated remarkable selectivity of euphol (2) and its derivatives since they did not display activity in two cell lines (U251 and PC-3) and in the noncancerous cell line (COS7). The IC₅₀ values are determined for compounds 1 and 8 and are shown in Table 3, indicating that ketone 8 displayed better activity than the natural product 1 in the leukemia cell line.

CONCLUSIONS

Squalene, 1-octacosanol, β-sitosterol, and compounds 1–5 have been reported for the first time from the aerial parts of *E. tanquahuete*, compound 1 being identified as a new natural

Table 3. IC₅₀ (μM) for Compounds 1 and 8

sample	cancerous cell lines			
	U251	K562	HCT-15	SKLU-1
(1)	30.9 ± 1.3	18.8 ± 0.5	39.0 ± 2.9	39.9 ± 1.6
(8)	ND	13.6 ± 0.7	ND	ND
etoposide	2.4 ± 0.2	2.2 ± 0.7	4.8 ± 0.5	2.6 ± 0.3

ND: not determined. Human tumor cell lines: U251 (glioblastoma), K562 (leukemia), HCT-15 (colon), and SKLU-1 (lung).

product displaying high toxicity against some cancer cell lines. Derivatives 6–12 were prepared from the majoritarian constituent, euphol (2). The cytotoxic evaluation of euphol (2) and its derivatives (6–8, 10, and 12) showed that they were inactive against U251 and PC-3 cell lines. Nevertheless, all of the semisynthetic derivatives showed higher cytotoxicity than the parent natural compound against the K562 and SKLU-1 cell lines, displaying significant selectivity. Derivative 8 showed the best activity in the leukemia cell line (K562). Therefore, compound 1 and the semisynthetic derivatives of the natural compound euphol (2) represent compounds of interest for further investigation as selective antiproliferative agents for certain types of cancer.

MATERIALS AND METHODS

General Experimental Procedure. Melting points were determined in a Cole–Palmer apparatus and are uncorrected. TLC was performed on Merck aluminum-backed plates coated with 0.2 mm thick silica gel 60 F₂₅₄. Column chromatography was carried out on silica gel 70–230 or 230–400 mesh from Sigma-Aldrich, eluting with mixtures of increasing polarity of *n*-hexane/methylene chloride or *n*-hexane/ethyl acetate. Electronic impact mass spectra (EIMS) were obtained in a JEOL JMS-AX505HA spectrometer with an ionization potential of 70 eV. DART and high-resolution electro-spray ionization mass spectra (HRESIMS) were obtained in an AccuTOF JMS-T100LC spectrometer. IR spectra were recorded using a Bruker Tensor 750 FT-IR spectrophotometer. The specific rotation was determined on a PerkinElmer 343 polarimeter using chloroform as the solvent and sodium D line as the source of light. ¹H, ¹³C, and bidimensional NMR spectra were recorded in Bruker Avance III (400/100 MHz), Bruker Fourier (300/75 MHz), and Jeol Eclipse (300/75 MHz). HPLC was carried out in a Thermo Scientific Ultimate 3000 chromatographer using analytical C18 (5 μm, 100 Å, 15 × 4.6 mm, 5 μm). The HPLC-grade solvents employed (*i*PrOH, MeOH, MeCN) were from the brand Fermont. The X-ray data were collected on a Bruker APEX II Duo diffractometer.

Plant Material. The aerial parts of *E. tanquahuete* were collected in October 2014 at the State Park “El Texcal” in the municipality of Jiutepec, Morelos, Mexico. The plant was identified as *E. tanquahuete* (synonym: *E. fulva*) by Prof. Clara H. Ramos (Instituto de Biología, UNAM) and a voucher specimen was deposited in the Herbario Nacional de México (MEXU) with registry number 1394140.

Extraction and Isolation. The air-dried powdered leaves (0.65 kg) of *E. tanquahuete* were extracted by maceration with a mixture of methylene chloride/methanol (DCM/MeOH) 1:1 (r.t., three times, 24 h each), affording a polar extract (328.5 g).

The methylene chloride/methanol extract was fractionated by open-column chromatography using a gradient with a mixture of *n*-hexane/EtOAc from 100:0 to 0:100 and washing the column with MeOH, affording eight major fractions (A–H). Fraction B (which was eluted with *n*-hexane/EtOAc 19:1) was further fractionated by column chromatography (CC) with a mixture of *n*-hexane/CHCl₃ of increasing polarity to afford squalene as a colorless oil (175 mg).²¹ From fraction D precipitated a white solid that after filtration and recrystallization from *n*-hexane/EtOAc afforded 1-octacosanol (1.15 g).^{22,23} The mother liquors of fraction D were concentrated and subjected to further CC to yield six subfractions (D1–D6). Subsequent CC of subfraction D2 afforded euphol (2, 1.35 g) as the majoritarian constituent. Subfraction D3 contained a mixture of 2 and a second component that was identified as lupeol (5, 234 mg).¹⁸ Subfraction D4 contained a mixture of euphol, lupeol, and a third component that after successive column chromatography was identified as cyclo-eucalenol (4, 10 mg).¹⁹ Subfraction D5 contained two major components that were isolated by preparative TLC using a mixture of *n*-hexane/DCM/EtOAc/EtOH 70:20:9:1. These compounds were identified as 25,26,27-trisnor-3 β -hydroxy-eupha-24-al (1, 7 mg) and eupha-8,23-dien-3 β ,25-diol (3, 6 mg) according to the extensive spectroscopic analysis and comparison with data reported in the literature.^{16,17} The purity of the compounds (>96%) was determined by HPLC.

Evaluation of Cytotoxic Activity. The cytotoxicity of the extract and the pure compounds was tested in six human tumor cell lines as percent inhibition of proliferation using the colorimetric method of sulforhodamine B (SRB, protein binding dye).²⁸ Human tumor cell lines tested were central nervous system (U251), prostate (PC-3), leukemia (K562), colon (HCT-15), breast (MCF-7), and lung (SKLU), provided by the National Cancer Institute (NCI). Colored solutions were extracted, and optical densities were read on an Ultra Reader of Microplate (Elx 808, Bio-Tek Instruments, Inc.) at a wavelength of 515 nm.

Single-Crystal X-ray Diffraction Analysis. Crystallographic data for compounds 8 and 10 were collected on a Bruker SMART APEX DUO three-circle diffractometer equipped with an Apex II CCD detector using Cu K α radiation ($\lambda = 1.54178 \text{ \AA}$, Incoatec I μ microsource and Helios optic monochromator) for the correct estimation of the anomalous dispersion and an adequate determination of the absolute structure parameter due to the nature of the sample (only carbon, oxygen, and hydrogen atoms), at $-173 \text{ }^\circ\text{C}$. Suitable crystals were coated with Paratone hydrocarbon oil, picked up with a nylon cryoloop, and mounted on the diffractometer.

■ ASSOCIATED CONTENT

SI Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.2c03963>.

Spectroscopic description of the natural compounds, squalene, 1-octacosanol, β -sitosterol, and compounds 2–5; preparation of compounds 1 and 6–12; 1D and

2D NMR spectra, IR, and HRESIMS of compound 1; NMR spectra of compounds 6–12; and crystal data and structure refinement of euphone (8) and 3-O-methyl euphol (10) (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Guillermo Delgado – Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510 Ciudad de México, México; orcid.org/0000-0002-1394-6300; Email: delgado@unam.mx

Authors

Luis J. Romero-Morán – Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510 Ciudad de México, México; orcid.org/0000-0002-6204-7037

María Teresa Ramírez-Apan – Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510 Ciudad de México, México

Simón Hernández-Ortega – Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510 Ciudad de México, México

Diego Martínez-Otero – Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable UAEM-UNAM, Toluca 50200, México

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.2c03963>

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Universidad Nacional Autónoma de México for financial support (Dirección General de Asuntos del Personal Académico PAPIIT IG200821) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT Grant 651375). This work was taken in part from the PhD Thesis submitted by L.J.R.M. to Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas de la UNAM. The authors thank Prof. Clara H. Ramos (Instituto de Biología, UNAM) for the collection and identification of the plant material. The authors also thank María de los Ángeles Peña, Elizabeth Huerta, María Isabel Chávez, Beatriz Quiroz, Rubén Gaviño, Rocío Patiño Maya† (1965–2021), Javier Pérez Flores, and María del Carmen García González (Instituto de Química de la UNAM) for technical assistance.

■ REFERENCES

- (1) Dorsey, B. L.; Haevermans, T.; Aubriot, X.; Morawetz, J. J.; Riina, R.; Steinmann, V. W.; Berry, P. E. Phylogenetics, morphological evolution, and classification of *Euphorbia* subgenus *Euphorbia*. *Taxon* 2013, 62, 291–315.
- (2) Shi, Q.-W.; Su, X.-H.; Kiyota, H. Chemical and pharmacological research of the plants in genus *Euphorbia*. *Chem. Rev.* 2008, 108, 4295–4327.
- (3) Vasas, A.; Hohmann, J. *Euphorbia* diterpenes: isolation, structure, biological activity, and synthesis (2008–2012). *Chem. Rev.* 2014, 114, 8579–8612.

- (4) Kemboi, D.; Peter, X.; Langat, M.; Tembu, J. A review of the ethnomedicinal uses, biological activities, and triterpenoids of *Euphorbia* species. *Molecules* **2020**, *25*, 4019.
- (5) Salehi, B.; Iriti, M.; Vitalini, S.; Antolak, H.; Pawlikowska, E.; Kregiel, D.; Sharifi-Rad, J.; Oyeleye, S. I.; Ademiluyi, A. O.; Czopek, K.; Staniak, M.; Custódio, L.; Coy-Barrera, E.; Segura-Carretero, A.; Cádiz-Gurrea, M. L.; Capasso, R.; Cho, W. C.; Seca, A. M. L. Euphorbia-derived natural products with potential for use in health maintenance. *Biomolecules* **2019**, *9*, 337.
- (6) Villaseñor, J. L. Checklist of the native vascular plants of México. *Rev. Mex. Biodiv.* **2016**, *87*, 559–902.
- (7) Jiménez-Ramírez, J.; Martínez-Gordillo, M.; Cruz-Durán, R.; Juárez-Arriaga, E.; García, R.; Cervantes, A.; Mejía-Hernández, R. Los géneros de la familia Euphorbiaceae en México. *An. Inst. Biol. UNAM Ser. Bot.* **2002**, *73*, 155–281.
- (8) Novillo, F.; Velasco-Barrios, E.; Nieto-Camacho, A.; López-Huerta, F. A.; Méndez-Cuesta, C. A.; Ramírez-Apan, M. T.; Chávez, M. I.; Martínez, E. M.; Hernández-Delgado, T.; Espinosa-García, F. J.; Delgado, G. 3 β -Palmitoyloxy-olean-12-ene analogs from *Sapium lateriflorum* (Euphorbiaceae): Their cytotoxic and anti-inflammatory properties and docking studies. *Fitoterapia* **2021**, *155*, No. 105067.
- (9) López-Huerta, F. A.; Nieto-Camacho, A.; Morales-Flores, F.; Hernández-Ortega, S.; Chávez, M. I.; Méndez-Cuesta, C. A.; Martínez, I.; Espinoza, B.; Espinosa-García, F. J.; Delgado, G. Hopane-type triterpenes from *Cnidioscolus spinosus* and their bioactivities. *Bioorg. Chem.* **2020**, *100*, No. 103919.
- (10) Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. 2022, <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/apmtm/termino.php?l=3&t=pegahueso> (accessed June 23, 2022).
- (11) Monroy Ortiz, C.; Castillo España, P. *Las plantas medicinales utilizadas en el Estado de Morelos*; Centro de Investigaciones Biológicas. UAE Morelos, 2000; p 207.
- (12) Passos, G. F.; Medeiros, R.; Marcon, R.; Nascimento, A. F. Z.; Calixto, J. B.; Pianowski, L. F. The role of PKC/ERK1/2 signaling in the anti-inflammatory effect of tetracyclic triterpene euphol on TPA-induced skin inflammation in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **2013**, *698*, 413–420.
- (13) Dutra, R. C.; Bicca, M. A.; Segat, G. C.; Silva, K. A. B. S.; Motta, E. M.; Pianowski, L. F.; Costa, R.; Calixto, J. B. The antinociceptive effects of the tetracyclic triterpene euphol in inflammatory and neuropathic pain models: the potential role of PKC ϵ . *Neuroscience* **2015**, *303*, 126–137.
- (14) 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*, 2215–2224.
- (15) Knight, S. A. Carbon-13 NMR spectra of some tetra- and pentacyclic triterpenoids. *Org. Magn. Reson.* **1974**, *6*, 603–611.
- (16) 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 ansui*. *Molecules* **2012**, *17*, 11826–11838.
- (17) Leong, Y. W.; Harrison, L. J. (20R,23E)-Eupha-8,23-diene-3 β ,25-diol from *Tripetalum cymosum*. *Phytochemistry* **1999**, *50*, 849–857.
- (18) Burns, D.; Reynolds, W. F.; Buchanan, G.; Reese, P. B.; Enríquez, R. G. Assignment of ^1H and ^{13}C spectra and investigation of hindered side-chain rotation in lupeol derivatives. *Magn. Reson. Chem.* **2000**, *38*, 488–493.
- (19) Kikuchi, T.; Kadota, S.; Tsubono, K. Studies on the constituents of orchidaceous plants. IV. Proton and carbon-13 signal assignments of cycloeucaenol-type triterpenes from *Nervilia purpurea* Schlechter by two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, *34*, 2479–2486.
- (20) Zhang, X.; Geoffroy, P.; Miesch, M.; Julien-David, D.; Raul, F.; Aoudé-Werner, D.; Marchion, E. Gram-scale chromatographic purification of β -sitosterol. Synthesis and characterization of β -sitosterol oxides. *Steroids* **2005**, *70*, 886–895.
- (21) Pogliani, L.; Ceruti, M.; Ricchiardi, G.; Viterbo, D. An NMR and molecular mechanics study of squalene and squalene derivatives. *Chem. Phys. Lipids* **1994**, *70*, 21–34.
- (22) Cravotto, G.; Gaudino, E. C.; Barge, A.; Binello, A.; Albertino, A.; Aghemo, C. Synthesis of 1-octacosanol and GC-C-IRMS discrimination of samples from different origins. *Nat. Prod. Res.* **2010**, *24*, 428–439.
- (23) Kunkuma, V. L.; Kaki, S. S.; Rao, B. V. S. K.; Prasad, R. B. N.; Devi, B. L. A. P. A simple and facile method for the synthesis of 1-octacosanol. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2013**, *115*, 921–927.
- (24) De Pascual Teresa, J.; Urones, J. G.; Marcos, I. S.; Basabe, P.; Sexmero Cuadrado, M. J.; Fernández Moro, R. Triterpenes from *Euphorbia broteri*. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 1767–1776.
- (25) Ponomarenko, L. P.; Kalinovsky, A. I.; Martyyas, E. A.; Doudkin, R. V.; Gorovoy, P. G.; Stonik, V. A. Terpenoid metabolites from the aerial parts of *Artemisia lagocephala*. *Phytochem. Lett.* **2012**, *5*, 118–122.
- (26) O’Keeffe, R.; Kenny, O.; Brunton, N. P.; Hossain, M. B.; Rai, D. K.; Jones, P. W.; O’Brien, N.; Maguire, A. R.; Collins, S. G. Synthesis of novel 24-amino-25,26,27-trinorlanost-8-enes: Cytotoxic and apoptotic potential in U937 cells. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 2270–2280.
- (27) Nes, W. D.; Wong, R. Y.; Benson, M.; Landrey, J. R.; Nes, W. R. Rotational isomerism about the 17(20)-bond of steroids and euphoids as shown by the crystal structures of euphol and tirucallol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1984**, *81*, 5896–5900.
- (28) Vichai, V.; Kirtikara, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1112–1116.

Recommended by ACS

Anti-inflammatory Activity of Tanshinone-Related Diterpenes from *Perovskia artemisioides* Roots

Zahra Sadeghi, Sonia Piacente, *et al.*

APRIL 11, 2023
JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS

READ 

Phthalides Isolated from the Endolichenic *Arthrinium* sp. EL000127 Exhibits Antiangiogenic Activity

Chathurika D. B. Gamage, Hangun Kim, *et al.*

MARCH 21, 2023
ACS OMEGA

READ 

Secondary Metabolites of Bird’s Nest Fungi: Chemical Structures and Biological Activities

Jianzhao Qi, Jin-Ming Gao, *et al.*

APRIL 18, 2023
JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY

READ 

Antioxidant and Neuroprotective Xenicane Diterpenes from the Brown Alga *Dictyota coriacea*

Yu Qi, Pengcheng Yan, *et al.*

FEBRUARY 16, 2023
ACS OMEGA

READ 

Get More Suggestions >