



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

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

**SEMISÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE AZODERIVADOS HETEROCÍCLICOS DE
TRITERPENOS PENTACÍCLICOS DE LA FAMILIA EUPHORBIACEAE.**

**TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

M en C. FABIOLA ANGÉLICA LÓPEZ HUERTA

**TUTOR.
DR. EDUARDO GUILLERMO DELGADO LAMAS
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., abril 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

SEMISÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE AZODERIVADOS HETEROCÍCLICOS DE
TRITERPENOS PENTACÍCLICOS DE LA FAMILIA EUPHORBIACEAE.

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

M en C. FABIOLA ANGÉLICA LÓPEZ HUERTA

TUTOR.
DR. EDUARDO GUILLERMO DELGADO LAMAS
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., abril 2021

JURADO

Presidente: Dr. Leovigildo Quijano

Vocal: Dra. Laura Patricia Álvarez Berber

Vocal: Dr. Ricardo Reyes Chilpa

Vocal: Dr. Francisco Hernández Luis

Secretario: Dr. Alfonso Sebastián Lira Rocha

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

M en C. Fabiola Angélica López Huerta
Sustentante

Dr. E. Guillermo Delgado Lamas
Tutor

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (Becario 307784).

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

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

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM, por el apoyo recibido a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (Proyectos IG200318 y IG200821).

Al Dr. Guillermo Delgado Lamas, por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, así como por la asesoría y el apoyo brindados durante la realización de la presente tesis.

A los miembros del comité tutor, Dra María Isabel Aguilar Laurents y Dr. Alfonso Sebastián Lira Rocha, por el apoyo brindado, valiosas aportaciones y comentarios siempre motivantes, que permitieron enriquecer la presente tesis.

A los miembros del jurado del examen de grado, doctores Leovigildo Quijano, Laura Patricia Álvarez Berber, Francisco Hernández Luis, Ricardo Reyes Chilpa y Alfonso Sebastián Lira Rocha por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y por sus enriquecedores comentarios. Igualmente, a los investigadores que formaron parte de los jurados del examen de candidatura y tutelar ampliado, por sus aportaciones siempre atendibles y constructivas.

Al personal académico del Instituto de Química, especialmente a la M. en C. Elizabeth Huerta Salazar, la Q. María de los Ángeles Peña González, a las Doctoras Beatriz Quiroz García y María Isabel Chávez Uribe del laboratorio de resonancia magnética nuclear, a la Q.F.B. María del Rocío Patiño Maya, del laboratorio de espectroscopía y polarimetría; al Dr. Francisco Javier Pérez Flores y al I. Q. Luis Velasco Ibarra, 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 y del laboratorio de cristalografía al M en C. Simón Ortega-Hernández.

También expreso mi agradecimiento a la Dra. Bertha J. Espinoza Gutiérrez y al M. en C. Ignacio Martínez Martínez, del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM), por su participación en las evaluaciones antiparasitarias, al Dr. Carlos A. Méndez Cuesta, de la

Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, por su colaboración en la realización de los cálculos de reconocimiento molecular, y al Prof. Esteban Manuel Martínez Salas, del Instituto de Biología de la UNAM, por la colecta e identificación del material vegetal.

A los compañeros del laboratorio 1-C (en sus integraciones actual y anteriores).

A los Doctores José Luis González Ávila y José Luis Rodríguez Chávez por la discusión, los consejos y el constante aporte durante el trabajo de experimentación además de su invaluable amistad y apoyo.

A los Doctores Alfredo Ortega, Elihú Bautista y José Rivera por su apoyo a lo largo de mi formación académica.

A mis colegas Gustavo Pretelin, Nadia Mendoza, Mayela del Ángel, Gabriela Salazar, Sahid Aguilar, Patricia Cocoltzi Xochitiotzi y Francisco Domínguez, por lograr trascender del compañerismo a la amistad.

A Fernanda Prieto, Teresa Medina, Aline García, Andrés Delgadillo y Constantino Benítez, por su amistad que supera el tiempo y la distancia.

A Mario Villalobos y Armando Mayen por saber estar.

A todas las personas que con una palabra de aliento siempre me motivaron.

«Si he llegado a ver más lejos que otros es porque me subí a hombros de gigantes»

Isaac Newton.

A mis padres que con su esfuerzo, apoyo y amor hicieron posible esta realidad.
A los mejores compañeros de vida: Sandra, por tu apoyo incondicional mejor hermana y amiga, a mi
mejor amigo Francisco por cada palabra de aliento y a Ángel, Álvaro, Monse y Moni.



PUBLICACIONES:

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 *Cnidoscolus spinosus* and Their Bioactivities.** *Bioorg. Chem.* **2020**, *100*, 103919. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103919>.

López-Huerta, F. A.; Delgado, G. **Totaianes, a New Type of Triterpenes** (Comments on the Article “Antiproliferative Activity and Energy Calculations of a New Triterpene Isolated from the Palm Tree *Acrocomia totai*”). *Nat. Prod. Res.* **2020**, 1–4. <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1793151>.

En preparación:

-Synthesis, biological evaluation, molecular docking studies and in-silico ADMET evaluation of pyrazines of pentacyclic triterpenoids

- Synthesis of diheterocycles derived from lupeol

-Novel bioactive semisynthetic azoderivatives from hopenol

PRESENTACIONES INSTITUCIONALES Y EN CONGRESOS:

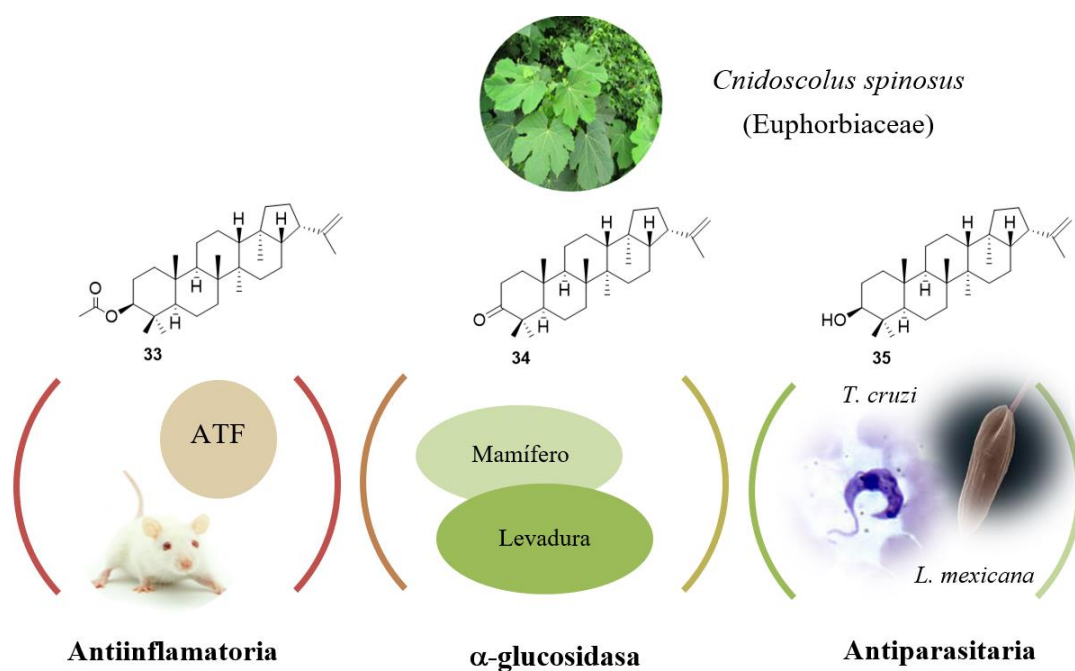
Hopanos de *Cnidoscolus spinosus* y su bioactividad. López-Huerta, F. A.; Nieto-Camacho, A.; Hernández-Ortega, S.; Delgado, G. Presentado en el Simposio Interno del Instituto de Química (UNAM), Ciudad de México, México, 13-15 de junio, 2018.

Hopanos de *Cnidoscolus spinosus* y su bioactividad. López-Huerta, F. A.; Nieto-Camacho, A.; Ramírez-Apan, T.; Morales, F.; Hernández-Ortega, S.; García-Guzmán, G.; Delgado, G. Presentado Congreso Latinoamericano de Química (CLAQ 33), en el Simposio Interno del Instituto de Química (UNAM), La Habana, Cuba, México, México, 9-12 de octubre, 2018. **Premiado “For best poster” por la American Chemical Society (ACS).**

Triterpenos pentacíclicos de la familia Euphorbiaceae: aislamiento, semisíntesis y bioevaluaciones. López-Huerta, F. A.; Delgado, G. Presentado en el Seminario departamental de Productos Naturales del Instituto de Química (UNAM), Ciudad de México, México, febrero, 2019.

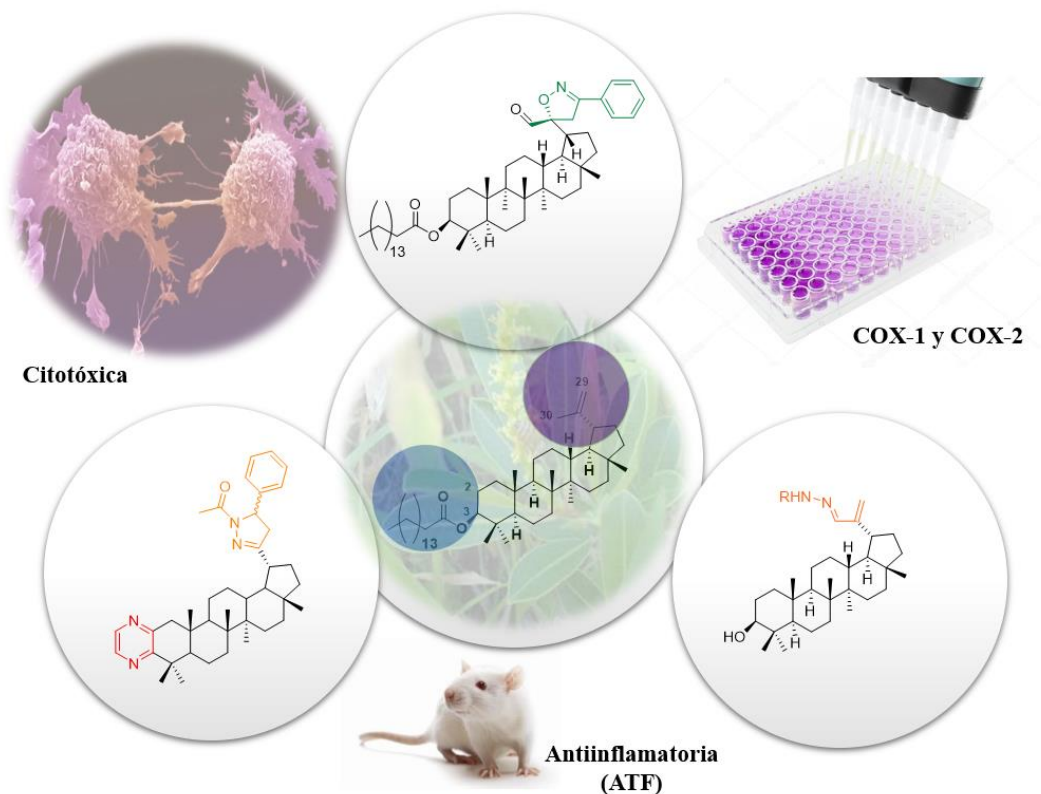
RESUMEN

Los triterpenos **33-35** de tipo hopano, relativamente poco frecuentes en la naturaleza, junto con otros compuestos conocidos se caracterizaron a partir de la especie vegetal *C. spinosus* (familia Euphorbiaceae). Ciertas actividades biológicas seleccionadas para los triterpenos de tipo hopano aislados se evaluaron a través de una serie de ensayos para determinar las actividades citotóxicas, antiinflamatorias, de inhibición de la α -glucosidasa y antiparasitarias. El compuesto **33**, reportado por primera vez aquí como producto natural mostró actividad antiinflamatoria en la prueba de edema inducido en oreja de ratón y alta actividad inhibidora hacia la α -glucosidasa de levadura (CI_{50} : $5.74 \pm 0.49 \mu\text{M}$, acarbosa: $7.26 \pm 0.34 \text{ mM}$). Los estudios *in silico* indicaron que existe reconocimiento molecular mediante la formación de enlaces de hidrógeno entre el grupo acetilo de **33** y el grupo amino del Arg-428 de la proteína.



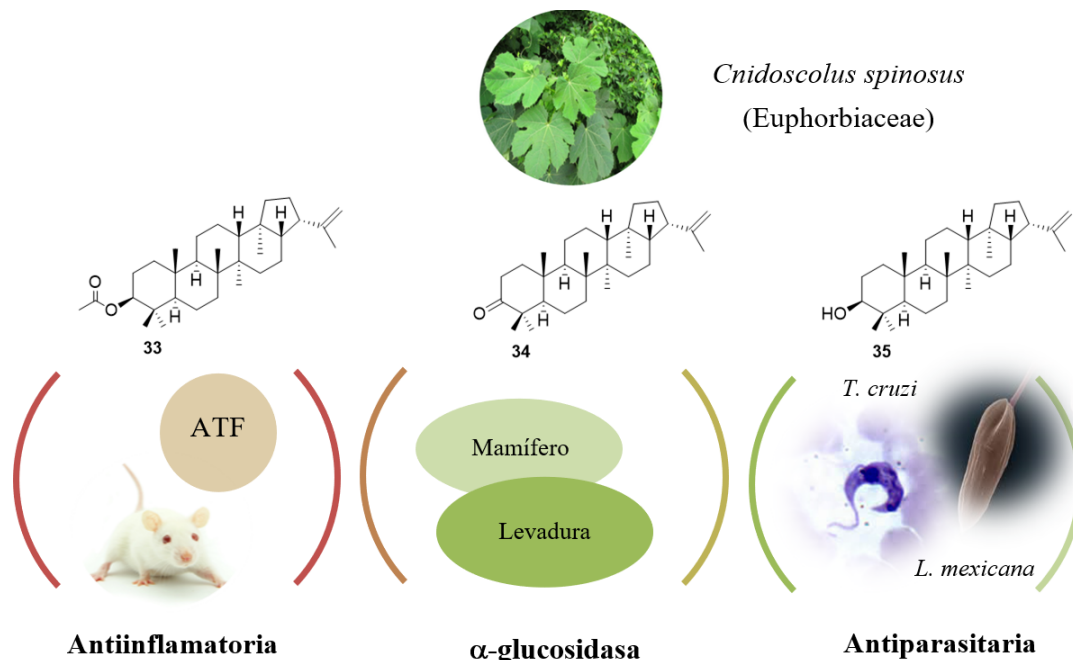
Se llevó a cabo la síntesis de derivados mediante la funcionalización en las posiciones C-2, C-3, y en las posiciones relativamente poco exploradas C-29 y C-30 del palmitato de lupeólo, lo que condujo a la formación de nuevos derivados que incluyen pirazinas, hidrazonas, 2-isoxazolininas y *N*-acetilpirazolininas. Las propiedades citotóxicas y antiinflamatorias de los derivados se evaluaron a través de una serie de ensayos selectos. Sobresale que la fenilhidrazona de 30-oxo-lupeol (**48**) presentó una actividad antiinflamatoria moderada (~50 %) respecto a la

indometacina (control positivo) en el ensayo de edema de ratón inducido por acetato de tetradecanoil forbol (ATF) mientras que la mezcla epimérica de *N*-acetilpirazolinas de lupeol (**59** + **60**) inhibió notablemente todas las líneas celulares cancerosas evaluadas, en particular, la concentración inhibitoria media para la línea de próstata ($CI_{50} 9.77 \pm 0.13 \mu M$), es tres veces menor que la del etopósido ($31.47 \pm 2.2 \mu M$), que se empleó como control positivo.



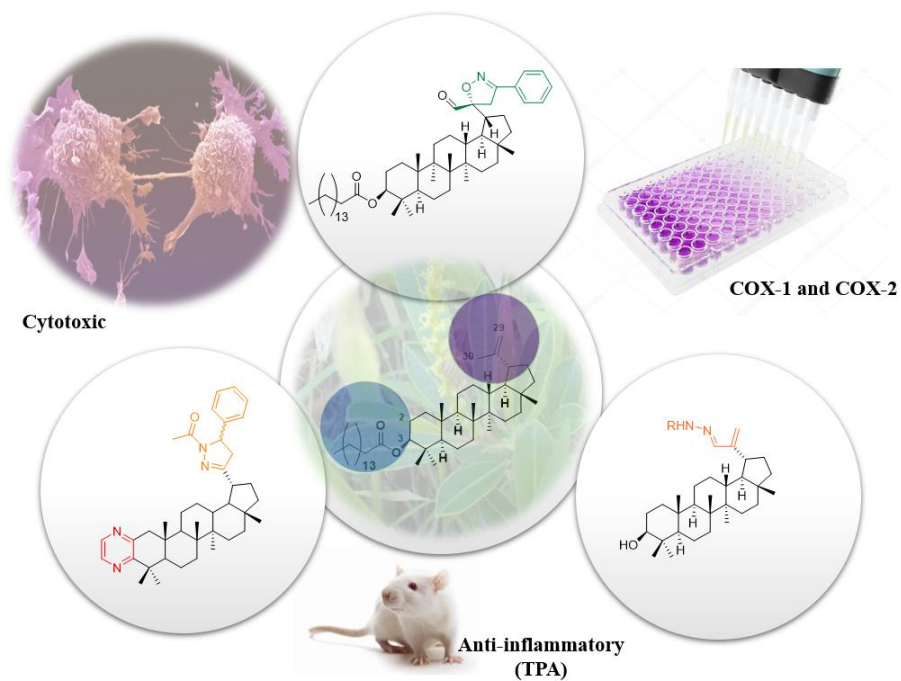
ABSTRACT

The relatively infrequent hopane-type triterpenes **33-35** together with other known compounds were characterized from the plant species *C. spinosus* (Euphorbiaceae). Some selected biological activities for the isolated hopane-type triterpenes were tested through a series of assays for determining the cytotoxic, anti-inflammatory, α -glucosidase inhibition and antiparasitic activity. Compound **33**, first reported here as natural product, displayed anti-inflammatory activity in the mouse ear induced edema test and high inhibitory activity towards yeast α -glucosidase (IC₅₀: 5.74 \pm 0.49 μ M, acarbose: 7.26 \pm 0.34 mM). *In silico* studies indicated the formation of hydrogen bonds between the acetyl group of **33** and the amino group of the Arg-428 of the protein.



The synthesis of derivatives was carried out through the functionalization of positions C-2, C-3, and the relatively less explored positions C-29 and C-30 of lupeyl palmitate, which led to the semisynthesis of new derivatives that include pyrazines, hydrazones, 2-isoxazolines and *N*-acetylpyrazolines. Cytotoxic and anti-inflammatory properties of the derivatives were evaluated through a series of selected assays. It should be noted that phenylhydrazone of 30-oxo-lupeol (**48**) displayed moderate anti-inflammatory activity (~ 50 %) compared to indomethacin (positive control) in the TPA-induced mouse edema test. On the other hand, while the epimeric mixture of

lupeol *N*-acetylpyrazolines (**59** + **60**) notably inhibited all the evaluated cell lines, in particular, the value of the half inhibitory concentration for the prostate line ($IC_{50} 9.77 \pm 0.13 \mu M$) is three times lower than that of etoposide ($31.47 \pm 2.2 \mu M$), used as positive control.



ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	29
2.	ANTECEDENTES.....	31
2.1	Triterpenos	31
2.1.1	Generalidades	31
2.2	Lupeol (10)	35
2.3	Familia Euphorbiaceae	36
2.3.1	Generalidades	36
2.3.2	Género <i>Cnidoscolus</i>	36
2.3.3	Género <i>Sapium</i>	38
2.4	Derivados semisintéticos	40
2.4.1	Pirazolinas	40
2.4.2	Isoxazolinas.....	41
2.4.3	Pirazinas	42
3.	HIPÓTESIS	47
4.	OBJETIVOS.....	48
4.1	General.....	48
4.2	Particulares.....	48
5.	JUSTIFICACIÓN.....	49
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
6.1	<i>Cnidoscolus spinosus</i>	52
6.1.2	Evaluación de la actividad antiproliferativa celular de líneas tumorales	58
6.1.3	Evaluación de la actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido de acetato de tetradecanoilforbol (ATF).....	58

6.1.4	Evaluación de la actividad inhibitoria de los hopanos en α -glucosidasa.....	61
6.1.5	Evaluación de la actividad antiparasitaria.....	65
6.1.6	Derivados de hopano.....	71
6.2	<i>Sapim lateriflorum</i>	76
6.2.1	Separación de palmitato de lupeño (15) y palmitato de β -amirilo (17) por derivatización química.....	76
6.2.2	Preparación de 30-azoderivados de palmitato de lupeño (15).....	77
6.2.3	Reacción del aldehído 26 con NH_2OH	83
6.2.4	Preparación de 30-azoderivados a partir de lupeol (10).....	86
6.2.5	Pirazina derivada de lupeol (10).....	87
6.2.6	Reacción del aldehído 15 con HBr	89
6.2.7	<i>N</i> -acetilpirazolinas.....	90
6.2.8	<i>N</i> -acetilpirazolinas derivadas de lupeol (10).....	101
6.2.9	<i>N</i> -acetilpirazolinas derivadas de pirazina de lupeol (30).....	104
6.2.10	Isoxazolina derivada de palmitato de lupeño (15).....	108
6.3	Evaluación de la actividad antiproliferativa celular en líneas cancerosas humanas 112	
6.3.1	Estudios de acoplamiento molecular con el factor nuclear κB (NF- κB) ...	116
6.4	Evaluación de la actividad antiinflamatoria.....	124
6.4.1	Evaluación de la actividad antiinflamatoria en el modelo de edema murino inducido por acetato de tetradecanoilforbol (ATF).....	124
6.4.2	Evaluación de la actividad inhibitoria de COX-1 y COX-2.....	126
7.	CONCLUSIONES	129
8.	SECCION EXPERIMENTAL	132
8.1	Materiales vegetales.....	132

8.1.1	Extracción y aislamiento	133
8.2	Ensayo citotóxico.....	133
8.2.1	Predicción de Espectros de Actividad para Sustancias” (Prediction Activity Spectra for Substances, PASS on line) ¹⁸⁰	134
8.2.2	Estudio de acoplamiento molecular	135
8.3	Actividad antiinflamatoria	135
8.3.1	Actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido con ATF	135
8.3.2	Cortes histológicos	137
8.3.3	Actividad inhibitoria en las enzimas COX-1 y COX-2.....	137
8.4	Actividad inhibitoria en α -glucosidasa.....	137
8.4.1	Actividad inhibitoria en α -glucosidasa de levadura (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	137
8.4.2	Actividad inhibitoria en α -glucosidasa de mamífero	138
8.5	Estudio de acoplamiento molecular	138
8.6	Actividad antiparasitaria	139
8.6.1	Cultivo de parásitos.....	139
8.6.2	Ensayos tripanocidas	139
8.6.3	Ensayos de citotoxicidad.....	140
8.7	Síntesis y caracterización	141
8.8	Procedimiento general para la síntesis de 3 α -oxoderivados	144
8.9	Procedimiento general para síntesis de pirazinas	145
8.10	Hidrólisis del palmitato de lupeól (15). Obtención de lupeol (10)	147
8.11	Oxidación con PCC de 10. Obtención de lupenona (28).....	148
8.12	Procedimiento general para la síntesis de 3 α -hidrazonas	152
8.13	Procedimiento general para la obtención de 3 α -fenilhidrazonas	154

8.14	Procedimiento general para la síntesis de isoxazolina.....	156
8.15	Procedimiento general para la síntesis de 20-oxoderivados ¹⁶⁷	157
8.16	Procedimiento general para la síntesis de 30-bencilidenderivados.....	160
8.17	Procedimiento general para la síntesis de <i>N</i> -acetilpirazolinás.....	163
9.	REFERENCIAS	167
10.	ANEXO.....	182

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Secuencia de búsqueda de entidades químicas que puedan desarrollarse como prototipos de interés farmacológico a partir de triterpenos pentacíclicos.	49
Esquema 2. Reacción de Riley del hopano 33	71
Esquema 3. Reacción de Riley del hopenol (35)	72
Esquema 4. Mecanismo propuesto para la formación de pirazinas ¹⁰¹	73
Esquema 5. Preparación de la pirazina 40	73
Esquema 6. Reacción de Riley realizada a la mezcla 15 + 17 para su separación.....	77
Esquema 7. Intento de preparación de la 2-pirazolina (41)	77
Esquema 8. Preparación de la hidrazona del 30-oxo-palmitato de lupeño (42)	78
Esquema 9. Mecanismos propuestos para la síntesis de 2-pirazolinas	80
Esquema 10. Intento de preparación de la fenilpirazolina (43)	81
Esquema 11. Preparación de la hidrazona del 30-oxo-palmitato de lupeño (44).	82
Esquema 12. Mecanismo propuesto para la formación de 2-isoxazolininas catalizada por un ácido de Lewis.....	83
Esquema 13. Intento de preparación de isoxazolina 45	84
Esquema 14. Preparación de la oxima 46	84
Esquema 15. Intento de preparación de la isoxazolina 45	85
Esquema 16. Correlaciones selectas NOESY y HMBC de H-30, compuesto 46	85
Esquema 17. Preparación de 30-oxo-lupeol (24) a partir de 15	86
Esquema 18. Preparación de la hidrazona del 30-oxo-lupeol (47)	86
Esquema 19. Preparación de la fenilhidrazona del 30-oxo-lupeol (48).....	87
Esquema 20. Preparación de lupenona (28) a partir de 15	87
Esquema 21. Preparación de la pirazina 30	88
Esquema 22. Preparación de β -bromoderivado 49	89

Esquema 23. Esquema sintético para la obtención de <i>N</i> -acetilpirazolinas.	91
Esquema 24. Preparación de la cetona 53	91
Esquema 25. Preparación de la enona 54	92
Esquema 26. Preparación de las <i>N</i> -acetilpirazolinas 55 y 56	93
Esquema 27. Fragmento estructural que genera al sistema ABX de las <i>N</i> -acetilpirazolinas	94
Esquema 28. Equilibrio conformacional de los diasterómeros 5'' <i>R</i> (55) y 5'' <i>S</i> (56).....	95
Esquema 29. Denominación de los hidrógenos diasterotópicos en C4'' de los diasterómeros 5'' <i>R</i> (55) y 5'' <i>S</i> (56).....	95
Esquema 30. Comparación de los desplazamientos químicos de los hidrógenos 19, 4'' y 5'' de los diasterómeros 5'' <i>R</i> (55) y 5'' <i>S</i> (56).....	96
Esquema 31. Correlaciones selectas NOESY de diasterómeros 5'' <i>R</i> (55) y 5'' <i>S</i> (56).....	97
Esquema 32. Mecanismos propuestos para la formación de <i>N</i> -acetilpirazolinas	100
Esquema 33. Preparación de la cetona 57	101
Esquema 34. Preparación de la enona 58	102
Esquema 35. Preparación de las <i>N</i> -acetilpirazolinas 59 y 60	103
Esquema 36. Preparación de la cetona 61	104
Esquema 37. Estereovista ORTEP de la pirazina 61	105
Esquema 38. Preparación de la enona 62	106
Esquema 39. Preparación de las <i>N</i> -acetilpirazolinas 63 y 64	107
Esquema 40. Preparación de la isoxazolina 65	108
Esquema 41. Propuesta mecanística para la formación de 2-isoxazolinas catalizada por cloramina T.....	109
Esquema 42. Equilibrio conformacional de la cicloadición 1,3-dipolar del oxido de nitrilo a la olefina C20-C29 de 15	110

Esquema 43. Correlaciones selectas NOESY de (5''S)-2-isoxazolina (**65**) 110

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Paclitaxel (Taxol ^{MR}) (1).....	30
Figura 2. Algunos esqueletos de triterpenos tetracíclicos.....	32
Figura 3. Algunos esqueletos de triterpenos pentacíclicos.	32
Figura 4. Estructuras de betulina (2) (R=CH ₂ OH) y ácido betulínico (3) (R=COOH)	33
Figura 5. Ejemplos de triterpenos pentacíclicos con actividad antiinflamatoria	34
Figura 6. Estructura del lupeol (10)	35
Figura 7. Algunos ejemplos de triterpenos pentacíclicos aislados del género <i>Cnidoscolus</i>	37
Figura 8. Metabolitos secundarios aislados de <i>Sapium lateriflorum</i>	39
Figura 9. Tautómeros de pirazolina	40
Figura 10. Estructura de las 2-isoxazolininas.....	41
Figura 11. Estructura de las pirazinas	42
Figura 12. Estructura de la cefalostatina 1 (20)	43
Figura 13. Ejemplos de pirazinas derivadas de triterpenos pentacíclicos con actividad citotóxica.	44
Figura 14. Derivados de palmitato de lupeflo (15) ¹⁰¹	45
Figura 15. Metabolitos secundarios de <i>C. spinosus</i> ¹⁰⁸	52
Figura 16. Correlaciones selectas COSY y HMBC de 33	54
Figura 17. Correlaciones selectas NOESY del hopano 33	54
Figura 18. Estereovista ORTEP de 33	54
Figura 19. Estructura molecular de moretenona (36).....	54
Figura 20. Estereovista ORTEP del compuesto 34	56
Figura 21. Espectros de RMN ¹ H de los hopanos de <i>C. spinosus</i> (33 , azul), (34 , verde) y (35 , rojo)	57

Figura 22. Comparación de los porcentajes de inhibición de inflamación (a diferentes concentraciones) de los epímeros C-21.....	59
Figura 23. Análisis de secciones histológicas de orejas de ratones teñidas con hematoxilina-eosina (400x e insertos a aumentos de 100x), después de la aplicación de ATF y el compuesto 33 a una dosis de 0.31 μmol / oreja. (A) Basal, (B) ATF, (C) ATF más tratamiento con 33	60
Figura 24. Interacciones del compuesto 33 con α -glucosidasa.	63
Figura 25. Interacciones del compuesto 34 con α -glucosidasa.....	64
Figura 26. A y B. Interacción del compuesto 35 con α -glucosidasa. Se observa un puente de hidrógeno con Glu-707. C. Diagrama 2D de la interacción ligando-proteína, interacciones de tipo Van der Waals son observadas.....	64
Figura 27. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	66
Figura 28. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.	68
Figura 29. Gráficas del efecto antiparasitario sobre la viabilidad de <i>T. cruzi</i> , <i>T. rangeli</i> , <i>L. mexicana</i> y células Vero de los compuestos 34 y 35 a las 24 h. (El porcentaje de viabilidad se muestra como promedio más desviación estándar).	69
Figura 30. Efecto antiparasitario sobre la viabilidad de <i>T. cruzi</i> , <i>T. rangeli</i> , <i>L. mexicana</i> y células Vero de los compuestos 34 y 35 a las 48 h. (El porcentaje de viabilidad se muestra como promedio más desviación estándar).....	70
Figura 31. Proyecciones conformacionales del palmitato de lupeólo (15) y palmitato de β -amirilo (17).....	76
Figura 32. Espectros apilados de los compuestos 26 y 42 en donde se compara el desplazamiento de H-30.	79
Figura 33. Espectros apilados de los compuestos 26 y 44	82
Figura 34. Ejemplos de <i>N</i> -acetilpirazolininas derivadas de esteroides	90
Figura 35. Espectro NOESY, diasterómero 5'' <i>R</i> (55)	97
Figura 36. Espectro NOESY, diasterómero 5'' <i>S</i> (56).....	98

Figura 37. Cromatograma de la mezcla de 59 y 60 . Flujo: 1 mL/min Isocrático: Acetonitrilo. 35 °C, columna C-18 fase reversa (Agilent technologies 30m x 0.320 mm).....	104
Figura 38. Gráfica de CI_{50} de las <i>N</i> -acetilpirazolinas 59 y 60	115
Figura 39. Derivados con mayor actividad antiproliferativa	118
Figura 40. A, B y C: Interacciones del compuesto 25 con NF- κ B. D: Diagrama 2D de la interacción ligando-proteína con los residuos Arg-59, Arg-57 y Ser-249. Las interacciones se representan como: enlace H con la cadena principal de aminoácidos (círculo verde y línea discontinua).	120
Figura 41. Interacciones del compuesto 31 con NF- κ B. D: Diagrama 2D de la interacción ligando-proteína, interacciones de tipo Van der Waals son observadas con los residuos Lys-275, Phe-310 y Arg-57	120
Figura 42. Interacciones del compuesto 32 con NF- κ B. D: Diagrama 2D de la interacción ligando-proteína con los residuos Lys-244 y Ala-245. Las interacciones se representan como: enlace H con la cadena principal de aminoácidos (círculo verde y línea discontinua).	121
Figura 43. (A) y (B) Interacción del compuesto 59 con el complejo NF- κ B-IRF7-IRF3. (C) Formación de dos puentes de hidrógeno de 59 con los residuos Ser-1132 y Leu-1108. (D) Imagen 2D de la interacción de 59 con NF- κ B mostrando la formación de puentes de hidrógeno e interacciones de tipo van der Waals.	122
Figura 44. (A) y (B) Interacción del compuesto 60 con la proteína NF- κ B. (C) Formación de una interacción de tipo π - π entre 60 con el residuo Trp-1070. (D) Imagen 2D de la interacción de 60 con NF- κ B mostrando la interacción de tipo π - π	123
Figura 45. Gráfica de la actividad antiinflamatoria de los derivados evaluados	125
Figura 46. Gráfica de inhibición enzimática en COX-1 de 44 , 48 , 55-60 , 62 y 65	128
Figura 47. Gráfica de inhibición enzimática en COX-2 de 44 , 48 , 55-60 , 62 y 65	128

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. CI_{50} de los compuestos 25 , 31 y 32	46
Tabla 2. Datos de RMN de 1H y ^{13}C de 33 y 36	55
Tabla 3. Evaluación de actividad inhibitoria de la proliferación celular de los compuestos 33-35 (25 μM).	58
Tabla 4. Efecto antiinflamatorio de los compuestos 33-35 sobre edema murino inducido por ATF.....	59
Tabla 5. Curva dosis-respuesta de 33 sobre el edema inducido por ATF.....	59
Tabla 6. Actividad de la enzima mieloperoxidasa del compuesto 33	61
Tabla 7. Actividad inhibitoria de 33-35 en α -glucosidasa de levadura	62
Tabla 8. Actividad inhibitoria de 33 en α -glucosidasa de levadura.....	62
Tabla 9. Evaluación de actividad inhibitoria de la proliferación celular de 40 (25 μM). ..	74
Tabla 10. Condiciones para la obtención de 41	78
Tabla 11. Condiciones para la obtención de 43	81
Tabla 12. Condiciones para la obtención de 46	84
Tabla 13. Condiciones para la obtención de 45	85
Tabla 14. Condiciones para la obtención de 49*	89
Tabla 15. Condiciones para la obtención de 65	108
Tabla 16. Evaluación de actividad inhibitoria de la proliferación celular de 42 , 44 , 47 , 48 , 53-62 (25 μM).	112
Tabla 17. CI_{50} de la mezcla epimérica 59 + 60	115
Tabla 18. Probabilidad (Pa >0.7) de actividad de acuerdo a la predicción realizada por PASS online ¹⁸⁰ para los compuestos 25 , 31 , 32 , 59 y 60	117
Tabla 19. Energía de unión para los compuestos 25 , 31 , 32 , 59 y 60	119

Tabla 20. Evaluación antiinflamatoria en el modelo de edema murino de los derivados del lupeol (**10**). 124

Tabla 21. Evaluación de inhibición (%) en COX-1 y COX-2 de **44, 48, 55-60, 62 y 65** 127

ÍNDICE DE ESPECTROS

Espectro 1. RMN ¹ H (700 MHz, CDCl ₃) de acetato de hopenilo (33)	183
Espectro 2. RMN ¹³ C (175 MHz, CDCl ₃) de acetato de hopenilo (33)	184
Espectro 3. RMN ¹ H (700 MHz, CDCl ₃) de hopenona (34).....	185
Espectro 4. RMN ¹³ C (175 MHz, CDCl ₃) de hopenona (34).....	186
Espectro 5. RMN ¹ H (700 MHz, CDCl ₃) de hopenol (35).....	187
Espectro 6. RMN ¹³ C (175 MHz, CDCl ₃) de hopenol (35)	188
Espectro 7. RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de 30-oxo-acetato de hopenilo (38).....	189
Espectro 8. RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de 30-oxo-hopenol (39).....	190
Espectro 9. RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de [2,3- <i>b</i>]-pirazina de hopenol (40)	191
Espectro 10. RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de hidrazona de 30-oxo-palmitato de lupeño (42)	192
Espectro 11. RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) fenilhidrazona de 30-oxo-palmitato de lupeño (44)	193
Espectro 12. RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) fenilhidrazona de 30-oxo-palmitato de lupeño (44)	194
Espectro 13. RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de hidrazona de 30-oxo-lupeol (47)	195
Espectro 14. RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de fenilhidrazona de 30-oxo-lupeol (48).....	196
Espectro 15. RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de [2,3- <i>b</i>]-pirazina de lupeol (30)	197
Espectro 16. RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de [2,3- <i>b</i>]-pirazina de lupeol (30)	198
Espectro 17. RMN ¹ H (700 MHz, CDCl ₃) de palmitato de 29-nor-20-oxolupeño (53). 199	
Espectro 18. RMN ¹³ C (175 MHz, CDCl ₃) de palmitato de 29-nor-20-oxolupeño (53) 200	
Espectro 19. RMN ¹ H (700 MHz, acetona d ₆) de palmitato de 29-nor-20-bencilidenlupeño (54)	201

Espectro 20. RMN ¹³ C (175 MHz, acetona d ₆) de palmitato de 29-nor-30-bencilidenlupeilo (54)	202
Espectro 21. RMN ¹ H (700 MHz, CDCl ₃) de (5'' <i>R</i>)- <i>N</i> -acetil-5''-fenil-pirazolina derivada de palmitato de lupeño (55).....	203
Espectro 22. RMN ¹³ C (175 MHz, CDCl ₃) de (5'' <i>R</i>)- <i>N</i> -acetil-5''-fenil-pirazolina derivada de palmitato de lupeño (55).....	204
Espectro 23. RMN ¹ H (700 MHz, CDCl ₃) de (5'' <i>S</i>)- <i>N</i> -acetil- 5''-fenil-pirazolina derivada de palmitato de lupeño (56).....	205
Espectro 24. RMN ¹³ C (175 MHz, CDCl ₃) de (5'' <i>S</i>)- <i>N</i> -acetil- 5''-fenil-pirazolina derivada de palmitato de lupeño (56).....	206
Espectro 25. RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de 29-nor-20-bencilidenlupeol (58)	207
Espectro 26. RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de 29-nor-20-bencilidenlupeol (58)	208
Espectro 27. RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del crudo de (5'' <i>R</i>)- <i>N</i> -acetil-5''-fenil-pirazolina de lupeol (59) +(5'' <i>S</i>)- <i>N</i> -acetil-5''-fenil-pirazolina de lupeol (60).....	209
Espectro 28. RMN ¹ H (700 MHz, CDCl ₃) de [2,3- <i>b</i>]-pirazina de 29-nor-20-oxolupeol (61)	210
Espectro 29. RMN ¹³ C (175 MHz, CDCl ₃) de [2,3- <i>b</i>]-pirazina de 29-nor-20-oxolupeol (61)	211
Espectro 30. RMN ¹ H (700 MHz, acetona d ₆) de [2,3- <i>b</i>]-pirazina de 29-nor-20-bencilidenlupeol (62).....	212
Espectro 31. RMN ¹³ C (175 MHz, acetona d ₆) de [2,3- <i>b</i>] pirazina de 29-nor-20-bencilidenlupeol (62).....	213
Espectro 32. RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del crudo de (5'' <i>R</i>)- [2,3- <i>b</i>]-pirazina de (<i>N</i> -acetil-5''-fenil)-pirazolina de lupeol (63) y (5'' <i>S</i>)- [2,3- <i>b</i>]-pirazina de (<i>N</i> -acetil-5''-fenil)-pirazolina de lupeol (64)	214
Espectro 33. RMN ¹ H (700 MHz, CDCl ₃) de 19-isoxazolina derivada del 30-oxo-palmitato de lupeño (65).....	215

Espectro 34. RMN ^{13}C (175 MHz, CDCl_3) de 19-isoxazolina derivada del 30-oxo-palmitato de lupeól (65).....	216
--	-----

ABREVIATURAS

Å- Ångström

AcOEt- Acetato de etilo

c- Cuarteto

°C- Grados Celsius

ccf- Cromatografía en capa fina

CCDC- Cambridge Crystallographic DataCenter

CI₅₀- Concentración inhibitoria media

d- Señal doble

dd- Señal doble de dobles

ddd- Doble de doble de dobles

dt- Señal doble de triples

δ- Desplazamiento químico

DART- Análisis directo en tiempo real (Direct Analysis in Real Time)

EtOH- Etanol

EMAR- Espectrometría de Masas de Alta Resolución

HMBC- Correlación Heteronuclear a través de Múltiples Enlaces (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)

HSQC- Correlación Heteronuclear ¹³C-¹H a un enlace (Heteronuclear Single Quantum Coherence ó Heteronuclear Single Quantum Correlation)

Hz- Hertz

Hex- Hexano

IES- Ionización por electrospray

IR- Infrarrojo

J- Constante de acoplamiento

L- Litro

m- Señal múltiple

m/z- Relación masa/carga

MeOH- Metanol

Me₂CO- Acetona

min- Minuto

mL- Mililitro

MHz- Megahertz

NOESY-Espectroscopía de Efecto Nuclear Overhauser (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)

PCC-Clorocromato de piridinio

p.f.- Punto de fusión.

ppm- Partes por millón.

RMN- Resonancia Magnética Nuclear.

RMN ¹H- Resonancia Magnética Nuclear de hidrógeno.

RMN ¹³C- Resonancia Magnética Nuclear de carbono 13.

s- Señal simple.

SRB- Sulforrodamina B

UV- Espectroscopia en el ultravioleta

μM- Micromolar

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer, definido como un grupo de enfermedades caracterizadas por la proliferación celular descontrolada, es una problemática importante de salud.¹ El cáncer es la tercera causa de muerte en México, después de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes, y entre enero y agosto de 2020 se registraron 683 823 defunciones, de las cuales 9% se deben a tumores malignos (60 421).²

Por otro lado, la inflamación es un proceso asociado a varias enfermedades que está estrechamente relacionada con la progresión del cáncer y es un componente indispensable que orchestra el microambiente tumoral.³ En los últimos años se han descrito varias vías convergentes entre inflamación y cáncer, y una mayor investigación sobre ellas podría resultar en el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas, debido a que a pesar de la mejora en la farmacoterapia del cáncer, los efectos secundarios, que incluyen anemia y una respuesta inmunitaria reducida, siguen siendo bastante evidentes y además, se han reconocido casos de resistencia a los agentes quimioterápicos de forma recurrente.⁴ En este sentido, está plenamente justificada la búsqueda de nuevos compuestos capaces de actuar como agentes más potentes, selectivos y/o seguros.

Los productos naturales poseen alta diversidad química, especificidad bioquímica, así como propiedades farmacológicas que los hacen estructuras líderes para el descubrimiento de nuevos fármacos. Más del 50 % de los fármacos disponibles en el tratamiento del cáncer son productos naturales o derivados de estos.⁵ Un ejemplo de ello es el taxol (**1**, Figura 1) metabolito aislado de ciertas especies del género *Taxus* (principalmente *Taxus brevifolia* Nutt.),⁶ el cual se utiliza en el tratamiento de cáncer de mama, de ovario y que también ha demostrado eficacia contra el sarcoma de Kaposi.⁷

En este sentido, los productos naturales pueden ser empleados de forma directa o como material de partida para el diseño y la síntesis de análogos que posean mejor actividad farmacológica y/o menor toxicidad.^{8,9} Por lo tanto, las modificaciones estructurales de los productos naturales son fundamentales en la búsqueda y eventual desarrollo de nuevos fármacos, considerando la reactividad de las diversas funcionalidades presentes en estas sustancias.

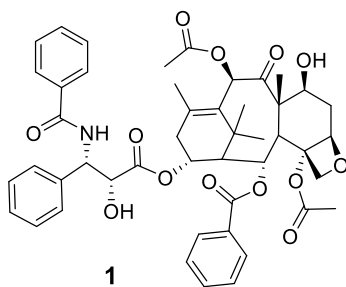


Figura 1. Paclitaxel (Taxol^{MR}) (1).

La presente investigación inició con el análisis químico de dos especies vegetales *Cnidioscolus spinosus* y *Sapium lateriflorum* (Euphorbiaceae), lo que permitió la caracterización estructural de una serie de sustancias, entre ellas a ciertos triterpenos, los cuales fueron sometidos a diversas bioevaluaciones. El contenido metabólico de *C. spinosus* y las propiedades citotóxica, antiinflamatoria, inhibidora de α -glucosidasa (levadura y ratón) y antiprotozoaria de los triterpenos tipo hopano constituyen la primera parte del presente trabajo. La disposición práctica de algunos triterpenos permitió la continuación de la investigación, la cual condujo a la exploración de la reactividad química de lupanos y hopanos dirigida a la introducción de heteroátomos. Se logró la síntesis de una serie de azo derivados no informados en la literatura química, los cuales fueron investigados como agentes citotóxicos y antiinflamatorios. La semisíntesis de los compuestos, la ponderación y racionalización de las propiedades biológicas y su discusión en el contexto de la relación entre la estructura y la bioactividad constituyen las partes subsiguientes del presente trabajo.

2. ANTECEDENTES

2.1 Triterpenos

2.1.1 Generalidades

Los triterpenos policíclicos son metabolitos secundarios constituidos por 30 átomos de carbono provenientes de la incorporación de seis unidades de isoprenilo. Biosintéticamente provienen de la ciclación del escualeno y del (2,3)-óxido de escualeno, que dan lugar a diferentes tipos de esqueletos de triterpenos y esteroides mediante la formación de carbocationes, intermediarios que experimentan reordenamientos moleculares de acuerdo a la posición de la carga y la estereoquímica del producto de ciclación.¹⁰

Para que se lleve a cabo la policiclación (del escualeno y el óxido de escualeno) es necesario que adopten una conformación plegada adecuada en donde los centros electrónicamente deficientes queden próximos a los fragmentos nucleofílicos, lo que da origen a compuestos mono-, bi-,..., policíclicos, que posteriormente son modificados por catálisis combinatoria de enzimas (por ejemplo, citocromo P450, glicosiltransferasas y aciltransferasas), lo que conduce a una enorme diversidad estructural de los triterpenos.¹¹

Se conocen alrededor de 20,000 triterpenos naturales que se distribuyen ampliamente en la naturaleza de forma libre o combinados con carbohidratos.¹² La mayoría de los triterpenos se produce en el reino vegetal, aunque otros organismos como los hongos, líquenes y bacterias también los producen,¹¹ y comprende diferentes tipos de compuestos que pueden ser divididos en familias en función de su estructura química (número y tamaño de los anillos).

Los principales grupos están representados por derivados tetracíclicos de protostano, eufano o cicloartano¹³ (Figura 2) y derivados pentacíclicos de tipo ursano, lupano y hopano entre otros (Figura 3).¹⁴

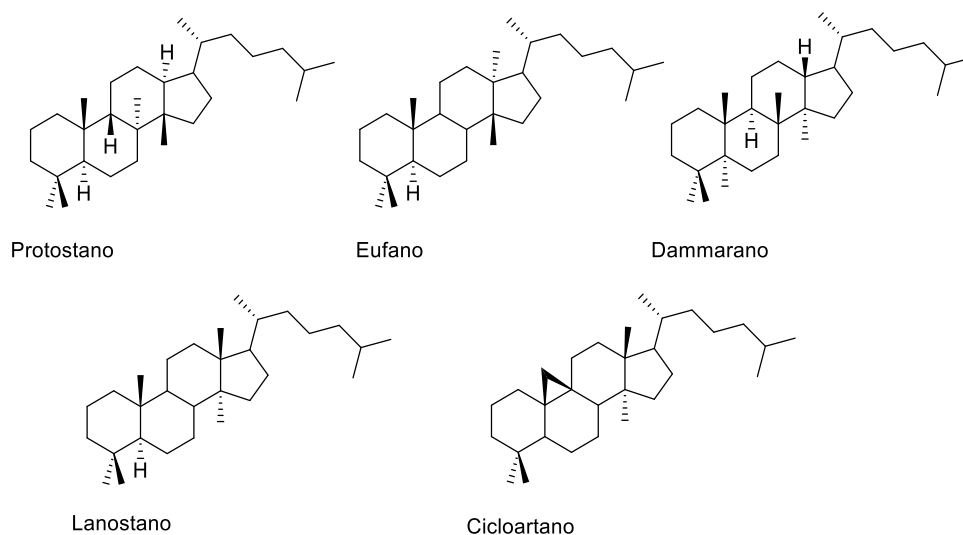


Figura 2. Algunos esqueletos de triterpenos tetracíclicos.

2.1.2 Triterpenos pentacíclicos

La estructura de los triterpenos pentacíclicos (TP) puede estar constituida de cinco anillos de seis carbonos o cuatro anillos de seis carbonos y un anillo de cinco carbonos. Algunos ejemplos de esqueletos se ilustran en la Figura 3:^{11,15}

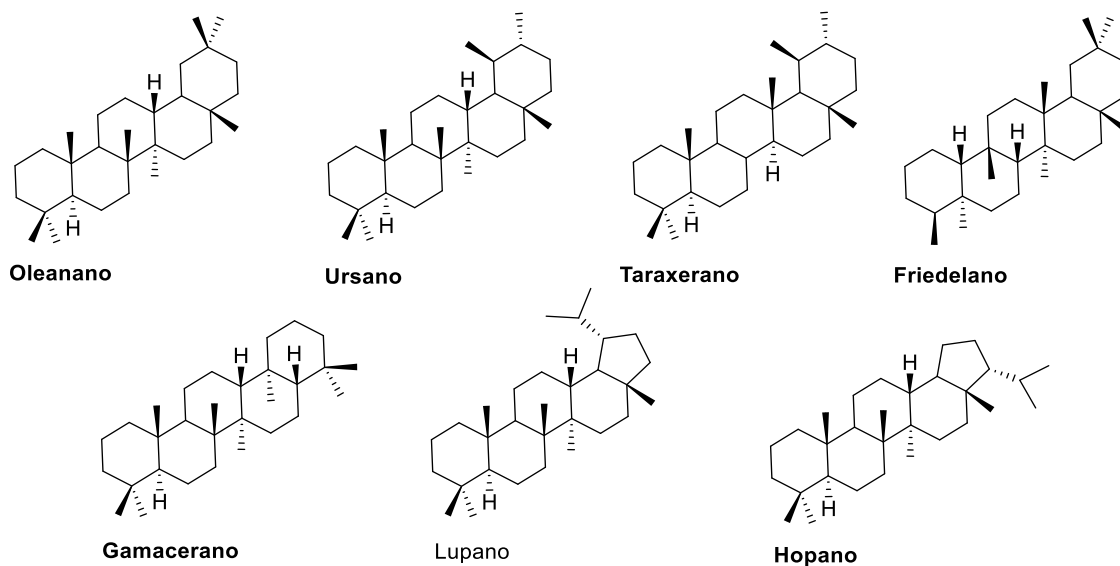


Figura 3. Algunos esqueletos de triterpenos pentacíclicos.

Los triterpenos han mostrado diversas actividades farmacológicas entre las que se encuentran la actividad antiinflamatoria, antimicrobiana, antiviral, citotóxica, hepatoprotectora, anti-VIH, antimalárica y antihelmíntica, por lo que constituyen una fuente importante de estructuras bioactivas.¹⁵⁻¹⁷

2.1.2.1 Actividad citotóxica

El interés en la actividad anticancerígena de los TP surgió con el descubrimiento en 1976 de que el ácido betulínico (**3**, Figura 3), inhibió notablemente el crecimiento de la línea celular de leucemia linfocítica P-388.¹⁸ Desde entonces un gran número de triterpenos y sus derivados han resultado citotóxicos para diversas líneas celulares cancerosas y algunos también presentan actividad tumoral en modelos animales.

Algunos triterpenos inhiben directamente el crecimiento tumoral, la progresión del ciclo celular e inducen la apoptosis de las células tumorales *in vitro* e *in vivo*,¹⁹ lo anterior procede por varios mecanismos, entre los cuales se pueden mencionar, la activación del factor nuclear NF- κ B, la inhibición de las señales de transducción, la supresión de la angiogénesis o daño mitocondrial.²⁰ Además, los TP pueden modular el microambiente tumoral y el sistema inmune y en muchas ocasiones son selectivos entre las células tumorales y no tumorales.²¹

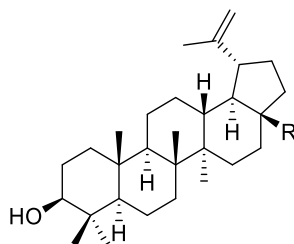


Figura 4. Estructuras de betulina (**2**) (R=CH₂OH) y ácido betulínico (**3**) (R=COOH).

2.1.2.2 Actividad antiinflamatoria

Triterpenos como el ácido asiático (4), la betulina (2), el ácido betulínico (3), el ácido boswélico (5), celastrol (6), el ácido maslínico (7), el ácido oleanólico (8) o el ácido ursólico (9) tienen un papel importante en la reducción de la inflamación.²² (Figura 5)

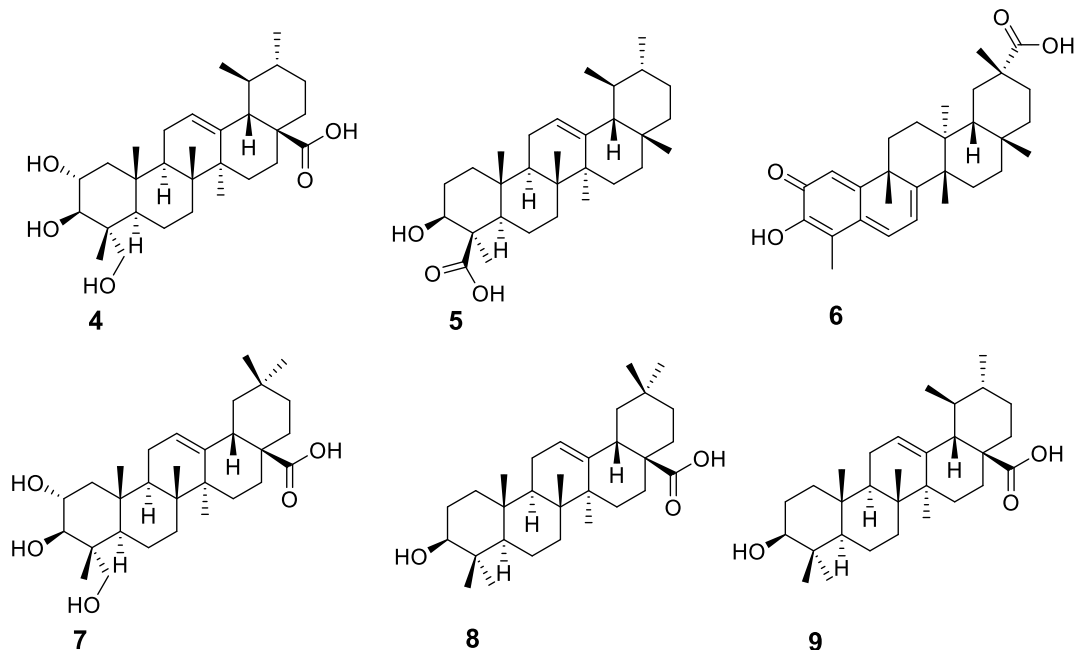


Figura 5. Ejemplos de triterpenos pentacíclicos con actividad antiinflamatoria.

Parte de los mecanismos de la actividad antiinflamatoria de los triterpenos pentacíclicos puede atribuirse a su capacidad para inhibir la 5-lipooxigenasa y la elastasa de leucocitos humanos, así como su potencial para la modulación de la respuesta inmune y la producción de anticuerpos.²³

2.1.2.3 Actividad antidiabética

Los triterpenos pentacíclicos participan en varios mecanismos para su actividad antidiabética,²⁴ pueden inhibir las enzimas involucradas en el metabolismo de la glucosa como las enzimas α -glucosidasas y amilasas que retrasan la absorción de carbohidratos en el intestino,²⁵ y también previenen el desarrollo de resistencia a la insulina y normalizan los niveles de glucosa e insulina en plasma.

2.2 Lupeol (10)

El lupeol (**10**, Figura 6) es un triterpeno pentacíclico presente en diversas especies del reino vegetal,²⁶ incluida una amplia variedad de frutas.²⁷

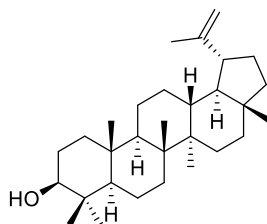


Figura 6. Estructura del lupeol (**10**).

Este triterpeno ha sido ampliamente estudiado, y exhibe una gran variedad de actividades farmacológicas relacionadas con algunos padecimientos importantes como la diabetes, la artritis, enfermedades cardiovasculares, trastornos renales, inflamación y cáncer.²⁷

El lupeol (**10**), participa en diferentes vías moleculares clave, involucradas en la proliferación y supervivencia de tumores. Es conocido que el lupeol induce la apoptosis en células de cáncer pancreático humano altamente metastásicas,²⁸ interfiere en la diferenciación de las células de melanoma de ratón,²⁹ es un potente inhibidor de proteínas quinasas y serina proteasas e inhibe la actividad de la ADN topoisomerasa II.³⁰

Por otra parte, también se ha demostrado que el lupeol (**10**) reduce la respuesta inflamatoria de la artritis en ratas.³¹ En otro estudio, la aplicación tópica de lupeol (0.5 y 1 mg / oreja) redujo la inflamación en un modelo de oreja de ratón inducida por ATF (acetato de *O*-tetradecanoilforbol), disminuyó los niveles de mieloperoxidasa y causa una reducción en la infiltración de células en los tejidos inflamados.³² Se ha establecido que la actividad antiinflamatoria del lupeol está relacionada con el factor nuclear (NF)- κ B, la caspasa-8 como proteína inhibidora y la fosfatidilinositol-3-cinasa/Akt.³³ También se ha informado que modula la expresión de la 15-lipooxigenasa, Interleucina β , citocinas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, IFN- γ -Th1), mieloperoxidasa, macrófagos y linfocitos.³⁴ Finalmente algunos estudios ha demostrado que no es tóxico para los tejidos y células normales en dosis terapéuticas efectivas.^{35,36} El lupeol (**10**) también exhibe actividad antidiabética en modelos *in vitro* e *in vivo* mediante la inhibición no competitiva de la PTP1B (proteína tirosina fosfatasa).³⁷

2.3 Familia Euphorbiaceae

2.3.1 Generalidades

La familia Euphorbiaceae es una de las más grandes del reino vegetal y sus especies se encuentran distribuidas en todo el mundo. Incluye aproximadamente 8,700 especies agrupadas en 320 géneros.³⁸

2.3.2 Género *Cnidoscolus*

El género *Cnidoscolus* Pohl pertenece a la familia Euphorbiaceae y es endémico del continente americano. Las plantas de este género son hierbas, arbustos o pequeños árboles caracterizados por la presencia de tricomas urticantes en toda la planta.³⁹ La base de datos *The plant list* incluye alrededor de 90 especies aceptadas del género *Cnidoscolus*,³⁸ y un número significativo de éstas son endémicas de México, distribuidas en regiones tropicales y subtropicales, principalmente en bosques caducifolios bajos y matorrales xerófilos.^{40,41} Algunas especies como *C. aconitifolius*,^{42,43} *C. chayamansa*,⁴⁴⁻⁴⁶ *C. quercifolius*⁴⁷ y *C. multilobus*⁴⁸ se utilizan en la Medicina Tradicional para el tratamiento de la diabetes, la gripe, las enfermedades relacionadas con procesos inflamatorios, las infecciones estomacales y el reumatismo.⁴⁹ Investigaciones químicas previas establecieron la presencia de flavonoides,⁵⁰

diterpenos,⁵¹ cumarinas⁵² y esteroides.⁴² Respecto a los triterpenos pentacíclicos presentes en el género (Figura 7) éstos son principalmente del tipo lupano (*C. vitifolius*⁵³ y *C. multilobus*⁴⁸), oleanano (*C. texanus*⁵²) y moretano (*C. chayamansa*⁴⁵ y *C. multilobus*⁴⁸).

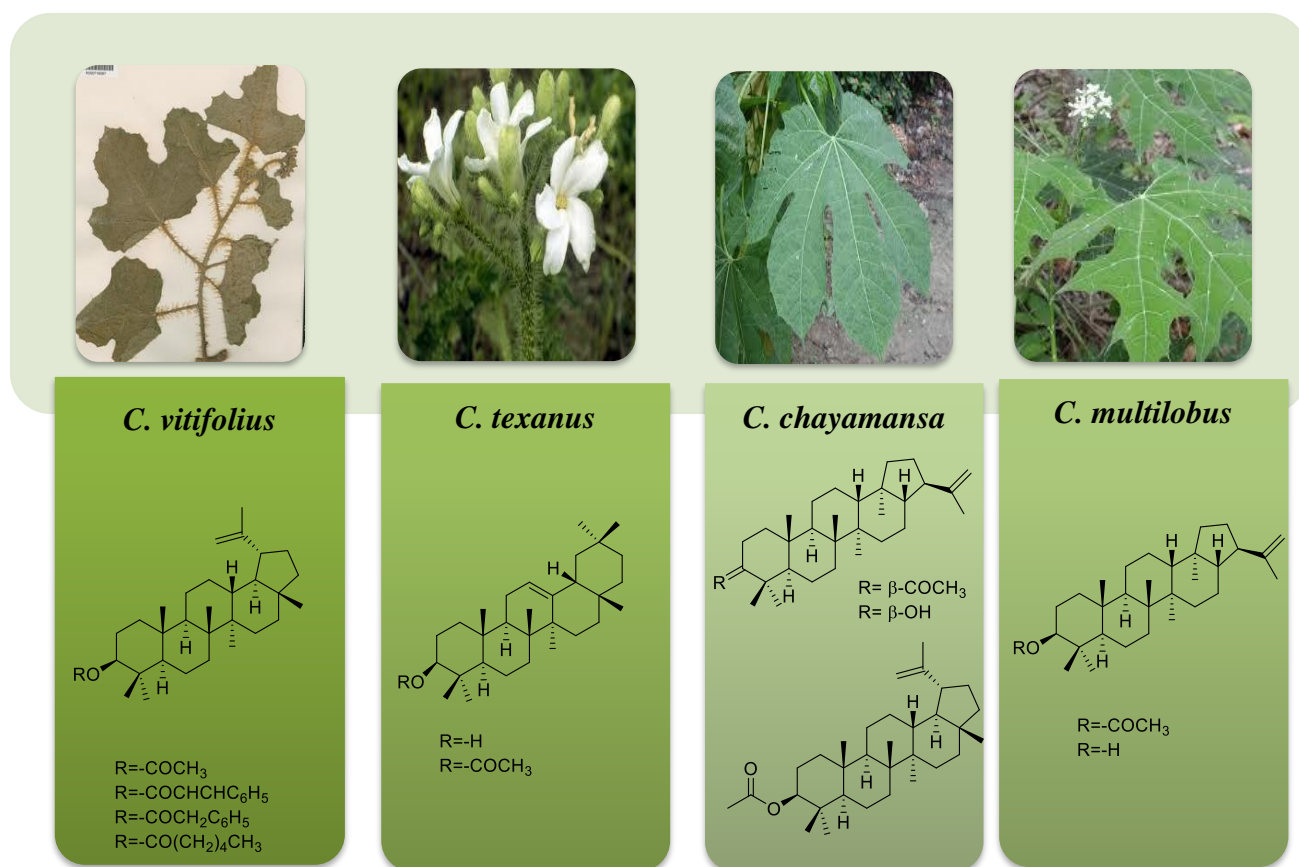


Figura 7. Algunos ejemplos de triterpenos pentacíclicos aislados del género *Cnidoscolus*.

2.3.2.1 *Cnidoscolus spinosus*.



*C. spinosus*⁵⁴ es una especie endémica de México y se encuentra principalmente en la costa del Pacífico en los estados de Nayarit, Jalisco, Colima y Guerrero.^{55,56} Esta planta es abundante en laderas o en terreno plano, principalmente en lugares con fuertes perturbaciones ambientales.⁵⁷ Hasta la fecha, no existe un registro de su uso en la Medicina Tradicional y respecto al contenido metabólico, de la misma se ha informado de la presencia de flavonoides.⁵⁵

2.3.3 Género *Sapium*

Sapium es un género cosmopolita de la familia Euphorbiaceae que incluye, de acuerdo a la base de datos *The plant List*, 196 especies, pero solo 23 de ellas están aceptadas.³⁸ Las especies del género son árboles o arbustos que presentan un exudado lechoso, con glándulas y flores características.⁴¹ Algunas especies de este género han sido empleadas en la medicina tradicional en varias partes del mundo para el tratamiento de heridas, picaduras de culebras, enfermedades dérmicas, entre otras.⁵⁸ Respecto a estas plantas existe relativamente poca información referente a su perfil químico; de algunas especies se han aislado ésteres de forbol,⁵⁹ flavonoides,⁶⁰ diterpenos⁶¹ y triterpenos.⁶²

2.3.3.1 *Sapium lateriflorum*



Sapium lateriflorum (Monach) Lundell es un árbol que alcanza aproximadamente 15 m de altura, de corteza lisa, café y exudado blanco. En México se encuentra distribuido en los estados de Chiapas, Oaxaca, Puebla y Veracruz principalmente. Un estudio químico del extracto CH₂Cl₂-MeOH (1:1) de las hojas de *S. lateriflorum*⁶³ permitió y la caracterización de 6'-palmitoil-3-O-β-D-glucopiranosido de β-sitosterilo (**11**), 3-O-β-D-glucopiranosido de β-sitosterilo (**12**), β-sitosterol (**13**), estigmasterol (**14**) y los siguientes triterpenos pentacíclicos; palmitato de lupeól (15), acetato de lupeól (16), palmitato de β-

amirilo (**17**), palmitato de 11-oxo- β -amirilo (**18**) y palmitato de 1 β ,11 α -dihidroxi- β -amirilo (**19**). (Figura 8)

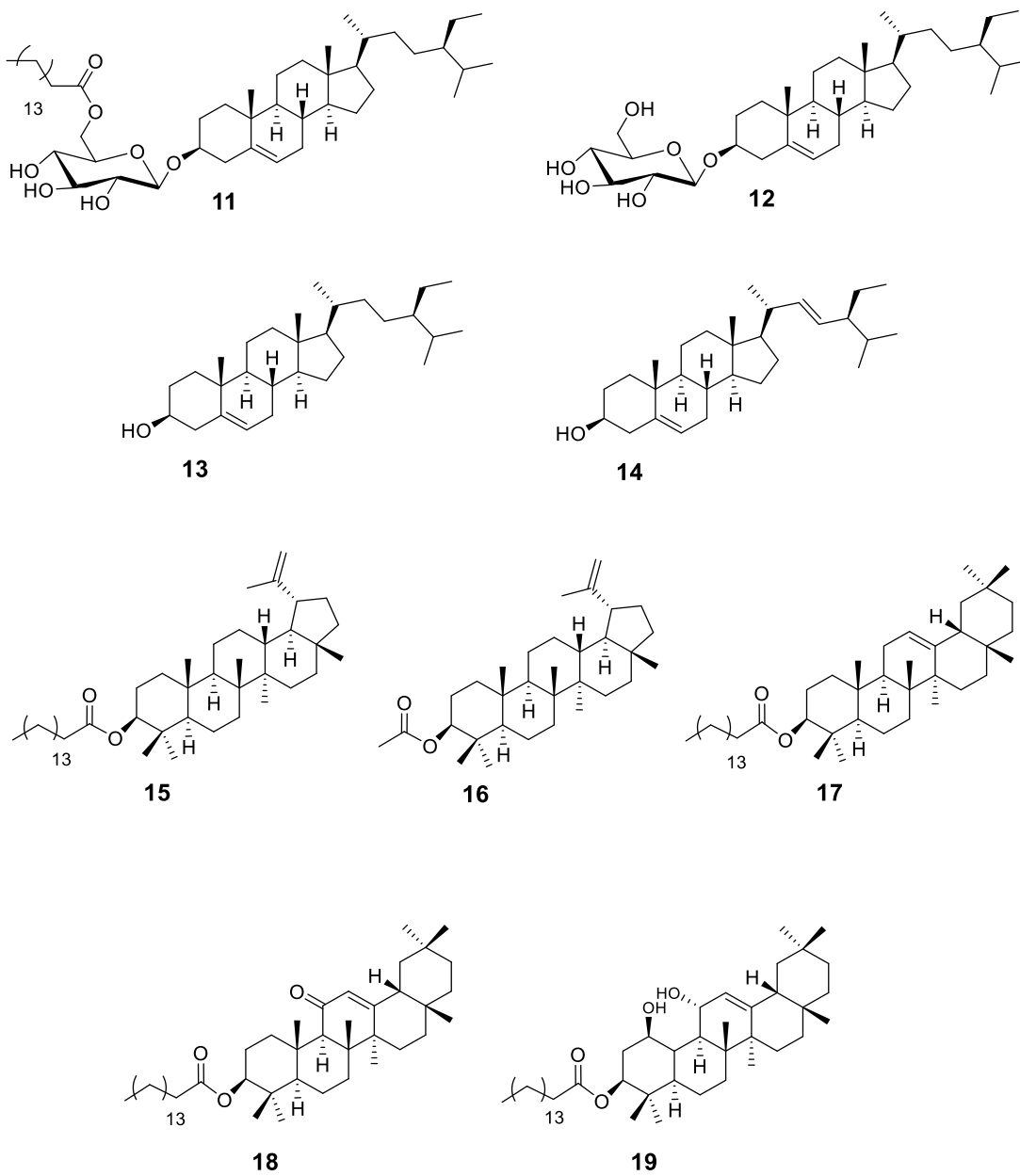


Figura 8. Metabolitos secundarios aislados de *Sapium lateriflorum*.

2.4 Derivados semisintéticos

El esqueleto de los triterpenos pentacíclicos destaca por su rigidez estructural y lipofilia al ser un sistema alifático que posee un elevado número de centros estereogénicos, susceptible a ser funcionalizado,⁶⁴ por lo que representa una fuente importante de compuestos para la exploración química y biológica.

Varios sistemas heterocíclicos como pirazoles, pirazolinas, isoxazoles, isoxazolinas, tiazoles, piridinas, pirimidinas o imidazoles⁶⁵ se han incorporado en la estructura de los triterpenos, ya que se consideran elementos farmacofóricos apropiados para el desarrollo de entidades de interés terapéutico.

2.4.1 Pirazolinas

Las pirazolinas son anillos pentacíclicos que contienen dos átomos de nitrógeno en posición adyacente y un doble enlace endocíclico. Los tautómeros de las pirazolinas son: la 1-pirazolina (a), la 2-pirazolina (b) y la 3-pirazolina (c), (Figura 9), siendo la 2-pirazolina (b) la más estable.

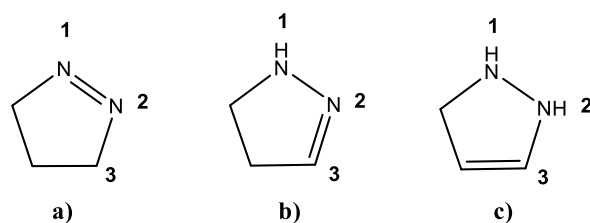


Figura 9. Tautómeros de pirazolina.

Las 2-pirazolinas (4,5-dihidro-1*H*-pirazoles), en comparación con los pirazoles, son bases más fuertes, menos estables y se comportan más como compuestos insaturados.⁶⁶ La investigación ha llevado al desarrollo de varias rutas sintéticas para la síntesis eficiente de pirazolinas, el método más común es la reacción de hidrazinas con compuestos α,β -insaturados. También se han informado otros métodos como la reacción de ésteres de ácidos carboxílicos α,β -insaturados con diazoalcanos, la cicloadición 1,3-dipolar de α,β -enonas y

diazoalcanos, la cicloadición de nitrilo iminas con α,β -enonas y la reacción de α,β -epoxicetonas con hidrazinas.⁶⁷

Los compuestos bioactivos que contienen el núcleo de pirazolina han sido de interés debido a que presentan una diversa gama de propiedades biológicas como la actividad antiparasitaria, antitumoral, antiinflamatoria, antidepresiva, analgésica, antibacteriana, antioxidante entre otras.^{68,69,70} Respecto a la actividad antitumoral algunos blancos moleculares de las pirazolininas son la quinasa dependiente de ciclina, factores de crecimiento del endotelio vascular y la glicoproteína P.⁷¹ Respecto a la actividad antiinflamatoria, varios derivados de pirazolina son inhibidores de las enzimas COX-1 y COX-2.^{72,73}

2.4.2 Isoxazolininas

Las isoxazolininas (Figura 10) son heterociclos de cinco miembros parcialmente hidrogenados que contienen átomos de oxígeno y nitrógeno adyacentes. Los derivados de isoxazolina han jugado un papel vital en el desarrollo de la Química Heterocíclica⁶⁹ debido a que son intermediarios importantes que pueden ser convertidos en 1,3-dioles, β -amino alcoholes, β -hidroxi cetonas, β -hidroxi oximas, β -hidroxi nitrilos o isoxazoles.⁷⁴

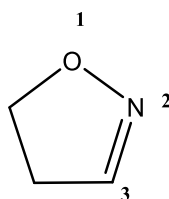


Figura 10. Estructura de las 2-isoxazolininas.

El método más común para síntesis de 2-isoxazolininas es la cicloadición [3+2] de óxidos de nitrilo y alquenos. Los derivados de isoxazolininas son grupos estructurales empleados como andamios (*scaffolds*) de numerosos compuestos biológicamente activos naturales y sintéticos, ya que poseen numerosas actividades biológicas tales como antibacteriana, antifúngica, antiviral y antidepresiva.^{75,76}

2.4.3 Pirazinas

Las pirazinas (Figura 11) son compuestos aromáticos heterocíclicos con dos átomos de nitrógeno simétricos en las posiciones 1 y 4.⁷⁷ Las metodologías más frecuentes para la síntesis de pirazinas son mediante la autocondensación de 2-aminocetonas y a partir de compuestos 1,2 dicarbonílicos y 1,2 diaminas.⁷⁸

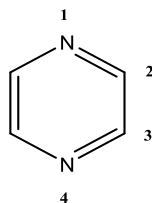


Figura 11. Estructura de las pirazinas.

Las pirazinas se consideran compuestos versátiles con aplicaciones en la adsorción de gas y la fotoluminiscencia. Se han informado como agentes antibacterianos, antifúngicos, antiinflamatorios, anticancerígenos, antidiabéticos o antivirales, entre otros. Los mecanismos de la actividad citotóxica de los derivados de pirazina incluyen diversos blancos enzimáticos.⁷⁹ Son inhibidores: de la quinasa aurora A, que es una enzima mitótica activa durante la maduración del centrosoma, y la formación del polo y del huso mitótico celular;⁸⁰ del oncogén BRAF, que participa en las vías de señalización que regulan la proliferación, diferenciación y la apoptosis;⁸¹ de la diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR) que participa en la regulación del inicio de la transcripción del ARNm⁸² y también son inhibidores de caspasa-3, enzima responsable de los cambios morfológico y bioquímicos que ocurren en las células apoptóticas.⁸³

Las pirazinas son fragmentos estructurales importantes en diversos productos naturales, por ejemplo; las cefalostatinas, familia de 20 compuestos aisladas del gusano marino *Cephalodiscus gilchristi*, las cuales poseen este heterociclo que une a dos unidades esteroideas altamente oxigenadas.^{84,85} Estas sustancias fueron aisladas por Pettit y colaboradores,⁸⁴ y este grupo designó a las dos unidades esteroideas de las cefalostatinas como “cara derecha” y “cara izquierda”.⁸⁶ Por su parte, el grupo de Fuchs adoptó la terminología “zona norte” y “zona sur”.⁸⁷

La cefalostatina 1 (**20**) (Figura 12) es el miembro más activo de esta familia, exhibe una actividad antiproliferativa en un intervalo de concentraciones sub-nanomolares a picomolares en un panel de líneas celulares tumorales.⁸⁸ La cefalostatina 1 (**20**) induce la apoptosis por medio de un mecanismo único a través de la vía mediada por el retículo endoplásmico independiente de la liberación de citocromo C y la activación de la caspasa 8, y utiliza selectivamente la proteína Smac / DIABLO como molécula de señalización mitocondrial,⁸⁹ esto contrasta con el mecanismo de la mayoría de los fármacos antineoplásicos conocidos que actúan en una ruta dependiente del citocromo C.⁹⁰

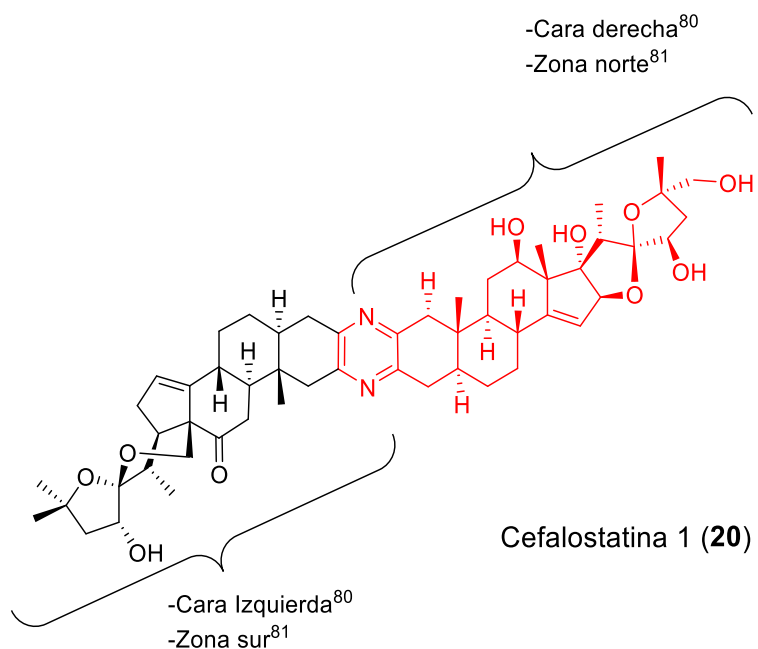


Figura 12. Estructura de la cefalostatina 1 (**20**)

Sin embargo, la disponibilidad de cefalostatina 1 (**20**) a partir de su fuente natural es extremadamente baja (138.38 mg a partir de 166 kg de gusano marino, rendimiento de 8.4×10^{-4} % en peso),⁹¹ y las síntesis totales realizadas de la misma han implicado varios pasos de reacción y resultan en un bajo rendimiento.^{92,93} Los estudios de estructura-actividad en diferentes cefalostatinas han revelado que el sistema 1,6-dioxaespiro-[4,4]-nonano presente la zona "norte" de estas moléculas, está asociado con su actividad antitumoral. En

combinación, su falta de disponibilidad junto con su excepcional actividad antiproliferativa han generado gran interés en la síntesis de análogos de cefalostatina 1 (**20**).

Considerando la naturaleza esteroidea de los monómeros que constituyen a la cefalostatina 1 (**20**), ciertos esteroides y triterpenos han sido utilizados como materia prima para obtención de análogos de estos productos naturales.^{90,94-96}

A la fecha, se han preparado algunos derivados de pirazina, principalmente a partir de triterpenos tipo lupano, oleanano y ursano.⁹⁷ Algunos de estos derivados (Figura 13) han mostrado actividad citotóxica relevante. Por ejemplo, la pirazina **21** fue el compuesto más activo de una serie de pirazinas y benzopirazinas derivadas del ácido betulínico y la betulina⁹⁸ con valores de CI_{50} por debajo de $10 \mu M$ en la mayoría de las líneas tumorales evaluadas. El derivado **22** también ha exhibido actividad citotóxica en las líneas SF-763, B16 y Hela con valores de CI_{50} de $3.53 \mu M$, $4.42 \mu M$ y $5.13 \mu M$, respectivamente.⁹⁹ Por su parte, la pirazina derivada de la hederagenina (**23**) potenció la actividad anticancerígena del paclitaxel (**1**), ya que combinada con éste tuvo un valor de CI_{50} de $2.4 nM$ contra células KBV resistentes a los fármacos.¹⁰⁰

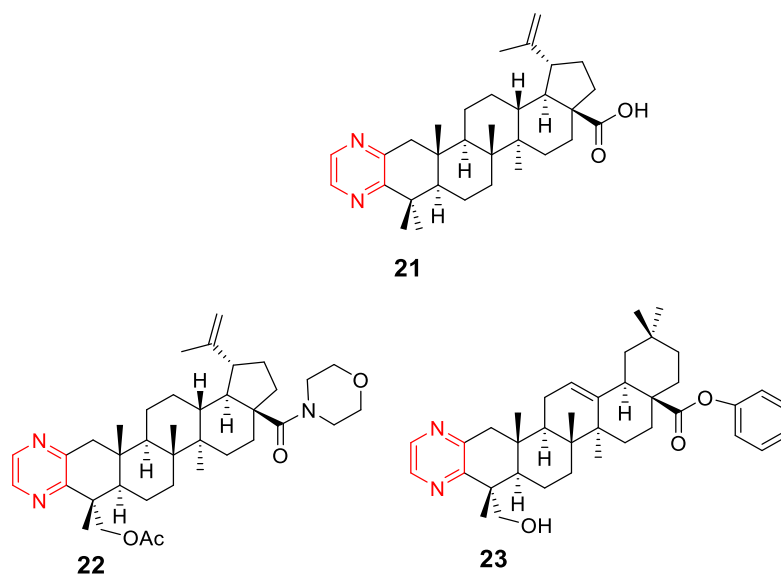


Figura 13. Ejemplos de pirazinas derivadas de triterpenos pentacíclicos con actividad citotóxica.

Previamente, en el grupo de investigación del Dr. Delgado, se llevó a cabo la exploración de la reactividad química (Figura 14), la evaluación de la actividad citotóxica (Tabla 1) y antiinflamatoria de derivados de palmitato de lupeólo (**15**) y palmitato de β -amirilo (**17**), principalmente fusionados con pirazinas.¹⁰¹ Es de particular importancia que, respecto a la actividad biológica de los derivados, destaca la oxima **25** y las pirazinas **31** y **32** que exhibieron una alta citotoxicidad en las líneas celulares evaluadas. Los compuestos **31** y **32** son más citotóxicos que el etopósido (empleado como control positivo) para la línea tumoral de próstata. (Ver Tabla 1)

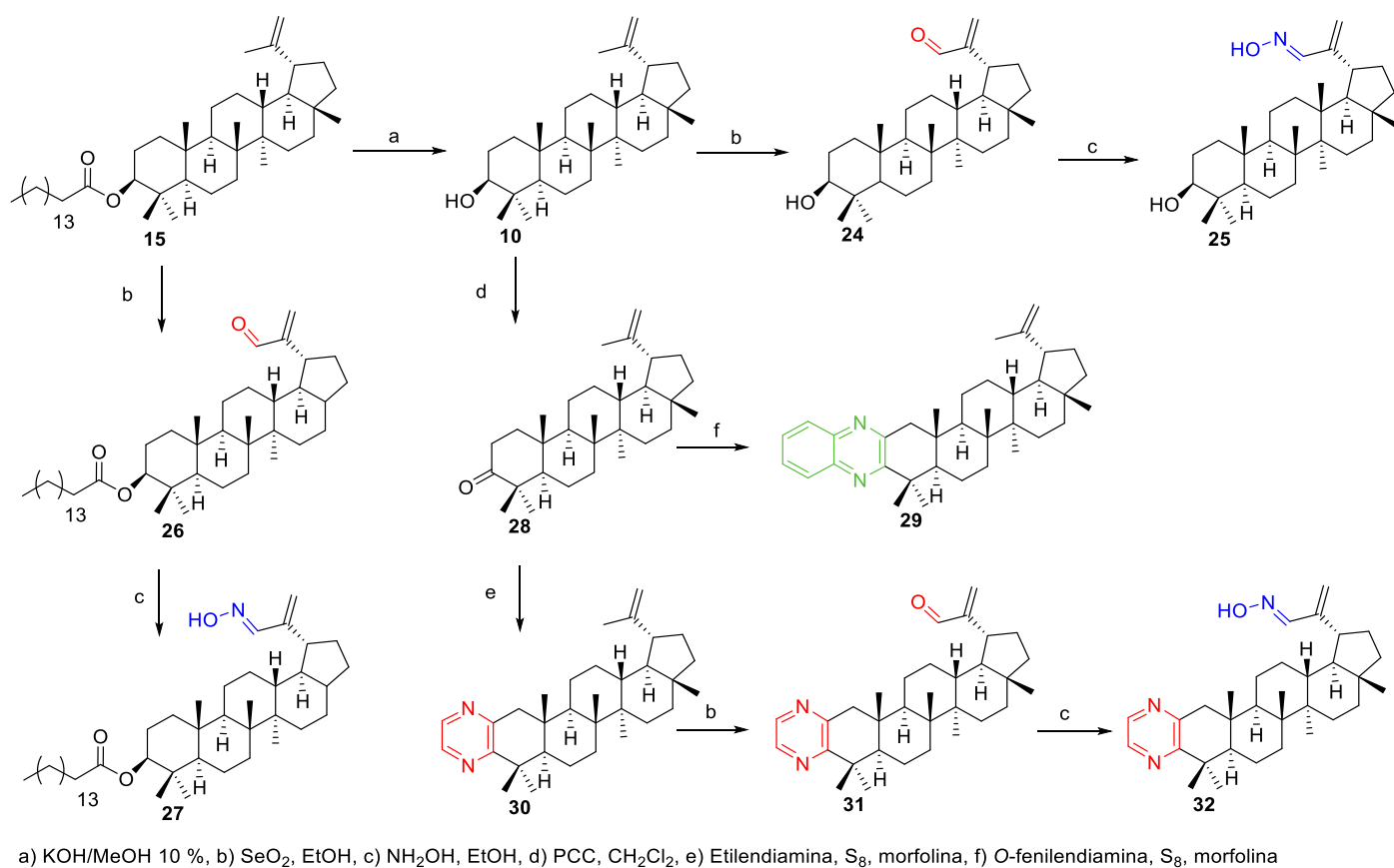


Figura 14. Derivados de palmitato de lupeólo (**15**).¹⁰¹

Tabla 1. CI₅₀ de los compuestos **25**, **31** y **32**.

CI ₅₀ (μM)						
Compuesto	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1
25	41.68±3.7	25.37±2.0	34.27±6.0	38.38±3.8	34.09±1.3	28.77±2.4
31	30.9±3.5	61.74±2.0	18.98±2.3	36.96±1.8	46.92±5.1	20.48±2.8
32	8.79±0.55	7.05±0.44	8.89±0.13	11.82±0.83	10.89±0.47	8.02±0.57
Etopósido	2.38±0.24	31.47±2.2	2.21±0.7	4.75±0.5	4.93±0.04	2.60±0.25

Vehículo: DMSO. U251: glía de sistema nervioso central, PC-3: próstata, K562: leucemia, HCT 15: colon, MCF-7: mama, SKLU: pulmón.

3. HIPÓTESIS

Considerando que muchos fármacos que incluyen heterocíclicos en su estructura presentan una amplia variedad de actividades biológicas de interés terapéutico, ciertos derivados de triterpenos pentacíclicos que incorporen heterociclos análogos pueden mostrar actividad citotóxica y/o antiinflamatoria.

4. OBJETIVOS

4.1 General

Realizar la semisíntesis de derivados heterocíclicos a partir de algunos aciltriterpenos pentacíclicos disponibles, aislados de especies vegetales de la familia Euphorbiaceae, para la evaluación de su actividad citotóxica y antiinflamatoria.

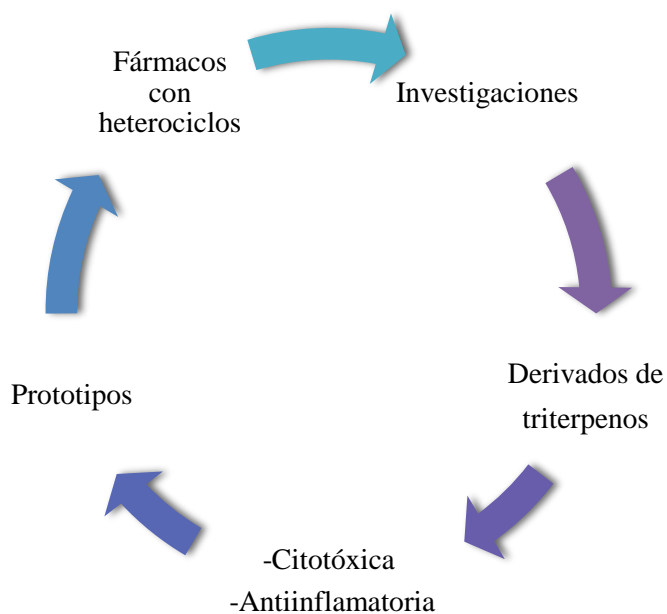
4.2 Particulares

- Obtención de materia prima a partir de especies de la familia Euphorbiaceae (*Cnidocolus spinosus* y *Sapium lateriflorum*).
- Llevar a cabo la evaluación de algunas propiedades biológicas de los hopanos aislados de *Cnidocolus spinosus*.
- Llevar a cabo la semisíntesis de pirazinas a partir de palmitato de lupeól (15) y acetato de hopenilo (33).
- Llevar a cabo la semisíntesis de isoxazolininas y pirazolininas a partir de palmitato de lupeól (15).
- Evaluar la actividad antiinflamatoria y citotóxica (en ciertas líneas celulares) de los derivados obtenidos.
- Establecer posibles relaciones entre la estructura molecular y la bioactividad entre los derivados obtenidos.

5. JUSTIFICACIÓN

Los triterpenos han sido de particular interés por exhibir una amplia gama de actividades biológicas, por lo que representan estructuras prometedoras para ser funcionalizadas con heterociclos, como fue el caso descrito¹⁰¹ en donde se obtuvieron dos pirazinas derivadas de triterpenos con una clara actividad citotóxica.

Considerando la importancia del cáncer y los padecimientos inflamatorios como una problemática de salud pública, es relevante realizar investigaciones concernientes al descubrimiento de nuevas estructuras heterocíclicas derivadas de triterpenos que pudieran considerarse como prototipos para el desarrollo de nuevos fármacos seguros y eficaces, con capacidad para inhibir la proliferación celular en líneas tumorales y/o con actividad antiinflamatoria. Es importante señalar que la investigación que se desarrolla constituye una búsqueda continua de entidades de interés terapéutico, y, simultáneamente, se enriquece el espacio químico y biológico de los productos naturales y derivados semisintéticos. (Esquema 1)



Esquema 1. Secuencia de búsqueda de entidades químicas que puedan desarrollarse como prototipos de interés farmacológico a partir de triterpenos pentacíclicos.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sapium lateriflorum



Cnidoscolus spinosus

Como fuente de materia prima (triterpenos pentacíclicos) se seleccionaron dos especies vegetales de la familia Euphorbiaceae; *Sapium lateriflorum* y *Cnidoscolus spinosus*, con base en su disponibilidad y antecedentes quimiotaxonómicos.

Sobre *Cnidoscolus spinosus*



6.1 *Cnidoscolus spinosus*

En esta parte se presentan y discuten los resultados sobre el estudio químico y evaluaciones citotóxica, antiinflamatoria, inhibidora de α -glucosidasa (levadura y ratón) y antiprotozoaria, de los triterpenos tipo hopano **33-35** aislados de *Cnidoscolus spinosus*.

6.1.1 Estudio químico del extracto CH₂Cl₂: MeOH

El extracto de CH₂Cl₂: MeOH de *C. spinosus* se sometió a cromatografía en columna abierta de gel de sílice y condujo al aislamiento de los triterpenos tipo hopano: acetato de hopenilo (**33**), hopenona B (**34**) y hopenol B (**35**); también se identificaron los siguientes metabolitos: palmitato de β -amirina (**17**)¹⁰², 3-O- β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo (**12**),¹⁰³ β -sitosterol (**13**),¹⁰⁴ estigmasterol (**14**)¹⁰⁵ (Figura 15), comparando sus datos espectroscópicos con los reportados en la literatura y/o por comparación directa con muestras auténticas disponibles en el laboratorio. Estos últimos compuestos ya han sido aislados de otras especies de *Cnidoscolus* como *C. urens*,¹⁰⁶ *C. quercifolius*.¹⁰⁷ Todos los compuestos fueron aislados e informados por primera vez de *C. spinosus*.

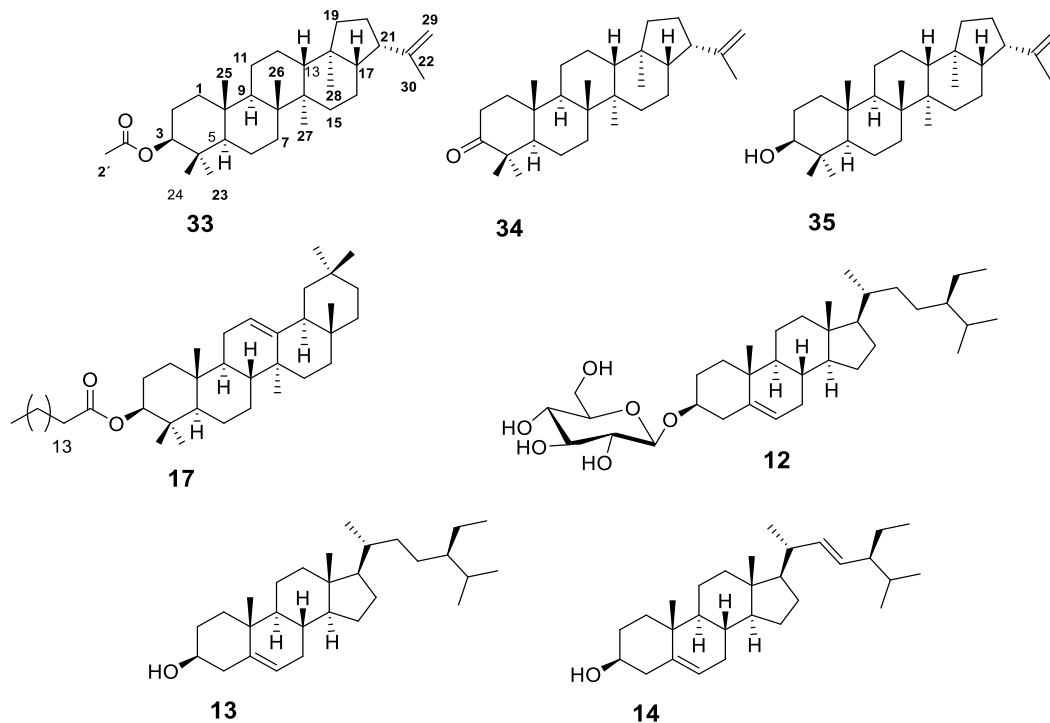


Figura 15. Metabolitos secundarios de *C. spinosus*.¹⁰⁸

6.1.1.1 Acetato de hopenilo (33)

El compuesto **33** se obtuvo como un sólido blanco, p.f 208-210 °C, para el cual se estableció una fórmula molecular $C_{32}H_{52}O_2$ con base en su espectro de masas de alta resolución y su espectro de IR mostró la presencia de un grupo carbonilo (ν_{max} 1720 cm^{-1}). El espectro de RMN ^{13}C (Espectro 2) de este compuesto (Tabla 2) mostró 32 señales, que fueron clasificadas mediante experimentos DEPT (90 y 135) en ocho metilos, once metilenos (diez sp^3 y uno olefínico), seis metinos sp^3 (incluyendo un oximetino) y siete carbonos cuaternarios (incluyendo un grupo olefínico y uno carbonílico). Estos datos indicaron la presencia de un triterpeno pentacíclico con un éster y una olefina *gem*-disustituída, de acuerdo con los siete grados de insaturación. La secuencia de los anillos se determinó mediante las correlaciones 2D COSY de RMN (Figura 16) que mostraron correlaciones relevantes de H-1 a H-3, de H-5 a H-7, de H-9 a H-11, H -12, H-13, de H-15 a H-17 y de H-19 a H-21. Los datos de RMN 1H y de ^{13}C (Tabla 2) son similares a los de los compuestos 3-oxo-hop-22(29)-ano (**34**, hopenona B)¹⁰⁹ y 3 β -hidroxi-hop-22(29)-ano (**35**, llamado hopenol B)¹¹⁰, también aislados en el presente trabajo, lo que sugiere la presencia de un esqueleto tipo hopano. Las posiciones del grupo acetoxi en C-3 y el isopropenilo en C-20 se determinaron mediante las correlaciones HMBC (asignaciones con base a los experimentos HSQC) (Figura 16) entre HC-3 y C-1' / C-4 / C-23 / C-24 / C-2, y entre HC-21 y C-16 / C-17 / C-20 / C-22. La orientación del grupo acetoxi se determinó por las constantes de acoplamiento de H-3 observadas (Tabla 2). Anteriormente, nuestro grupo de investigación aisló los epímeros C-21 de los hopanos (moretanos) de *C. multilobus*⁴⁸ y la Tabla 2 incluye los datos de RMN de nuestra muestra auténtica de la moretenona (**36**), epímero de **34**. El NOE observado entre HC-17 y HC-21, y entre H₃-C-28 y H₃-C-30 para el hopano **33**, está en claro contraste con el NOE entre HC-17 y H₃-C-30 y entre HC-21 y H₃-C-28 de la moretenona. El desplazamiento a menor frecuencia en RMN 1H y ^{13}C de H₃-C-30 y HC-17 de moretanos podría asignarse a un efecto γ -gauche (Figura 17).¹¹¹ Por lo tanto, el compuesto aislado de *C. spinosus* es 3 β -acetoxi-hop-22 (29) -ano. La configuración absoluta de **33** se determinó mediante el análisis de difracción de cristal de rayos X [parámetro de Flack: 0.0 (2)] (Figura 18). Esta es la primera vez que se informa la existencia del compuesto **33** como producto natural.

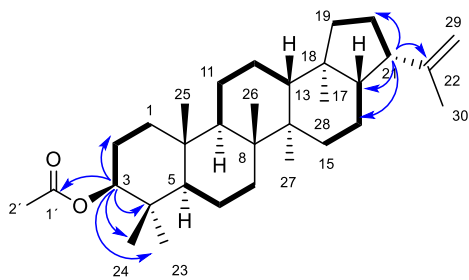


Figura 16. Correlaciones selectas COSY y HMBC de **33**.

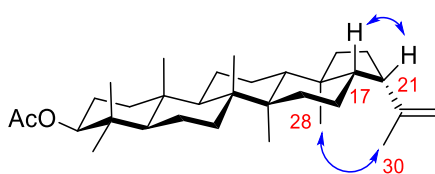


Figura 17. Correlaciones selectas NOESY del hopano **33**.

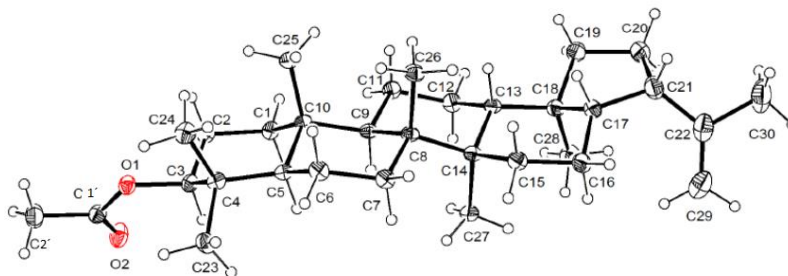


Figura 18. Estereovista ORTEP de **33**.

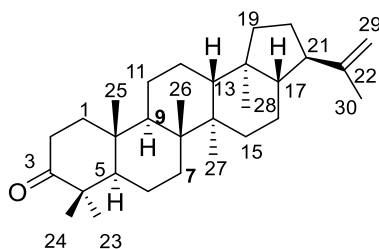


Figura 19. Estructura molecular de moretenona (**36**).

Tabla 2. Datos de RMN de ^1H y ^{13}C de **33** y **36**.

Acetato de hopenilo (33) ^a			Moretenona (36) ^b	
C/H	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)
1a1b	38.5, CH ₂	1.69, m 1.03, m	39.7, CH ₂	1.93, m 1.42, m
2a, b	23.9, CH ₂	1.62, m	34.3, CH ₂	2.40, ddd (15.5, 7.5, 4.0)
3	81.1, CH	4.47, dd (10.5, 6.0)	218.3, CH	
4	37.9, C		47.5, C	
5	55.3, CH	0.79, ddd (12.0,12.0,2.0)	55.0, CH	1.31, m
6a	18.4, CH ₂	1.52, m	19.9, CH ₂	1.50, m
6b		1.40, m		1.46, m
7a	33.4, CH ₂	1.47, m,	32.7, CH ₂	1.51, m
7b		1.23, m		1.30, m
8	41.9, C		41.8, C	
9	50.2, CH	1.24, m	49.9 CH	1.34, m
10	37.2, C		37.0, C	
11a	21.2, CH ₂	1.50, m	21.8, CH ₂	1.53, m
11b		1.32, m		1.39, m
12a	24.0, CH ₂	1.48, m,	24.1, CH ₂	1.51, m
12b		1.42, m		1.44, m
13	49.6, CH	1.37, m	49.0, CH	1.45, m
14	42.1, C		42.5, C	
15a	33.8, CH ₂	1.40, m,	32.8, CH ₂	1.41, m
15b		1.23, m		1.22, m
16a	21.8, CH ₂	1.65, m,	21.0, CH ₂	1.42, m
16b		1.41, m		1.19, m
17	55.0, CH	1.38, m	54.0, CH	1.01, m
18	44.9, C		44.4, C	
19a	41.9, CH ₂	1.60, m	40.4, CH ₂	1.51, m
19b		1.02, m		1.05, m
20a	27.5, CH ₂	1.84, m	27.5, CH ₂	1.85, m
20b		1.80, m		1.43, m
21	46.6, CH	2.68, ddd (9.5, 9.5, 7.0)	48.0, CH	2.25, ddd (12.5, 11.0,7.0)
22	148.8, C		148.3, C	
23	28.1, CH ₃	0.85 s	26.7, CH ₃	1.08, s
24	16.7, CH ₃	0.83s	21.3, CH ₃	1.03 s
25	16.2, CH ₃	0.84s	15.9, CH ₃	0.93 s
26	16.83, CH ₃	0.96 s	16.6, CH ₃	1.02 s
27	16.80, CH ₃	0.93 s	16.7, CH ₃	0.95 s
28	16.1, CH ₃	0.72 s	15.3, CH ₃	0.69
29a	110.3, CH ₂	4.78 brs	109.7, CH ₂	4.67
29b				
30	25.1, CH ₃	1.75 s	19.8, CH ₃	1.68, s
C1'	171.0, C			
C2'	21.5, CH ₃	2.04 s		

^a Obtenidos en 400 MHz (^1H) y 100 MHz (^{13}C). ^b Obtenidos en 700 MHz (^1H) y 175 MHz (^{13}C).

6.1.1.2 Hopenona B¹⁰⁹ (34)

En el espectro en el IR se observa la banda de estiramiento en 1697 cm⁻¹ asignada al carbonilo de posición C-3. En el espectro de RMN ¹³C (Espectro 4) se observan 30 señales, las cuales mediante el experimento DEPT se identificaron como 7 metilos, 11 metilenos, 5 metinos y 7 carbonos sin hidrógenos. En el espectro de RMN ¹H (Espectro 3) se observa una señal simple en δ_H 4.78, cuyo desplazamiento químico, es característico de hidrógenos vinílicos (H-29b y H-29a) esta señal correlaciona con el carbono en δ_C 110.30 en el experimento HSQC. Los protones del metilo C-30 se observan como una señal simple en δ_H 1.75. Finalmente, la configuración absoluta del triterpeno fue determinada mediante el análisis por difracción de rayos X de un cristal de esta muestra (Figura 20).

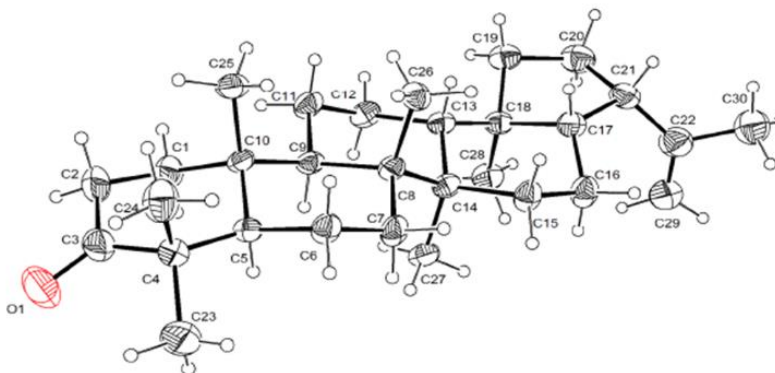


Figura 20. Estereovista ORTEP del compuesto 34.

6.1.1.3 Hopenol B¹¹⁰(35)

En el espectro en el IR se observa la banda de estiramiento del hidroxilo en 3611 cm⁻¹. En el espectro de RMN ¹³C (Espectro 6) se observan 30 señales las cuales mediante el experimento DEPT se identificaron como 7 metilos, 11 metilenos, 6 metinos y 6 carbonos sin hidrógenos, perfil típico de un triterpeno pentacíclico. En el espectro de RMN ¹H (Espectro 5) se observa una señal simple en δ_H 4.78 cuyo desplazamiento químico, es característico de hidrógenos vinílicos (H-29b y H-29a) que correlacionan con el carbono en δ_C 110.27 en el experimento HSQC. Consistente con el esqueleto base con el -OH en la posición C-3 (δ_C 79.16); en δ_H 3.19 se observa un doble de dobles ($J = 11.3, 5.0$ Hz) que integra para el hidrógeno correspondiente a este carbono.

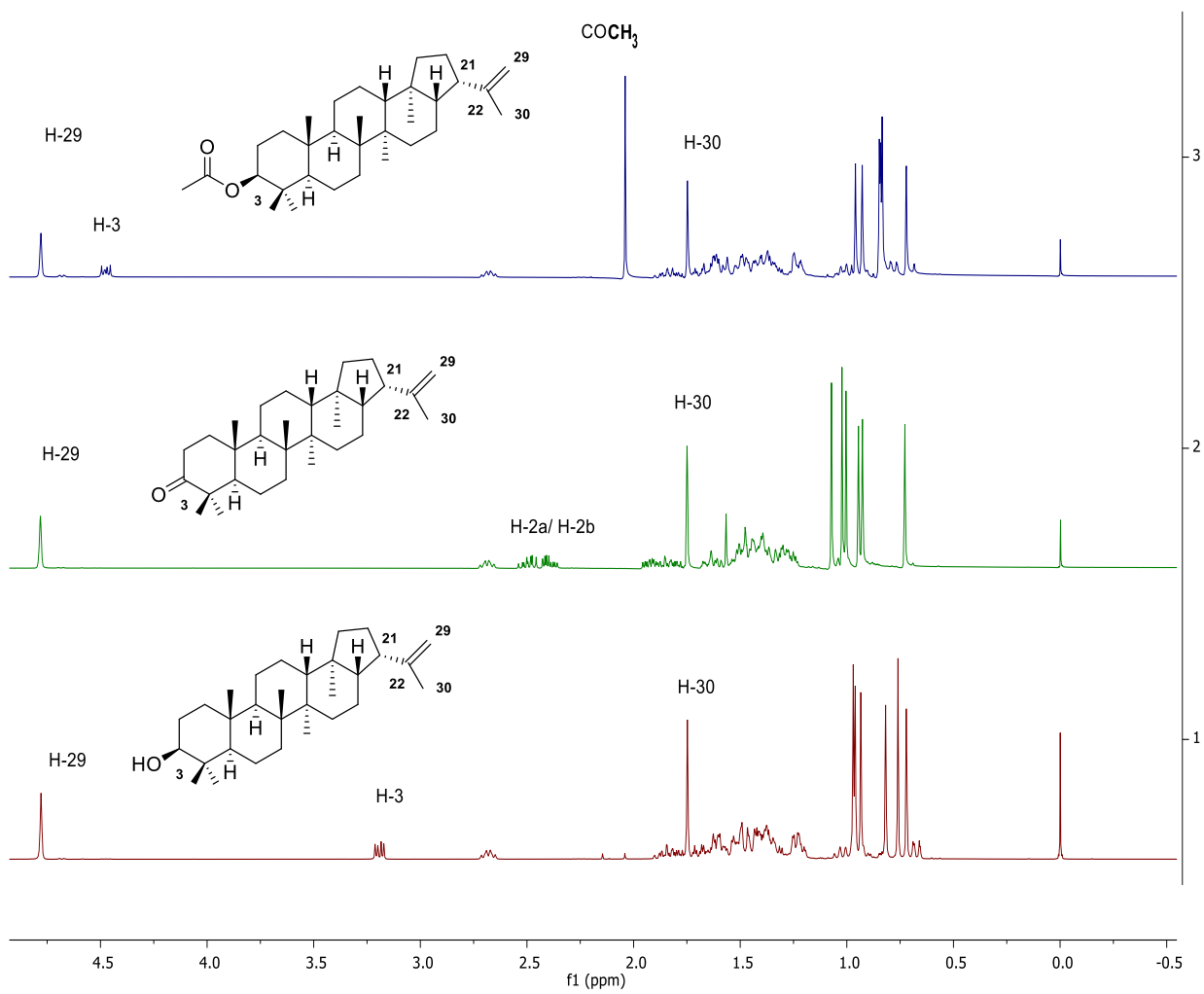


Figura 21. Espectros de RMN ^1H de los hopanos de *C. spinosus* (**33**, azul), (**34**, verde) y (**35**, rojo).

6.1.2 Evaluación de la actividad antiproliferativa celular de líneas tumorales

Los compuestos **33-35** se evaluaron *in vitro* como agentes antiproliferativos en seis líneas celulares tumorales humanas: HCT-15 (colon), K562 (leucemia mielógena), U251 (glioblastoma), MCF-7 (mama), PC-3 (próstata) y SKLU-1 (pulmón) y en la línea de células sanas FGH (fibroblastos gingivales humanos). Como se observa en la Tabla 3, ninguno de los triterpenos mostró toxicidad contra las líneas celulares analizadas. Estos resultados fueron consistentes con los de un estudio previo en el que el hopenol B (**35**) no fue tóxico para algunas líneas celulares tumorales.¹¹²

Tabla 3. Evaluación de actividad inhibitoria de la proliferación celular de los compuestos **33-35** (25 μ M).

Compuesto	% de inhibición de la proliferación celular en líneas cancerosas humanas						
	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1	FGH
33	6.9	24.8	11.9	NC	NC	2.5	11.6
34	8.5	22.1	13.5	3	NC	NC	26
35	7.4	NC	13.5	NC	NC	NC	18.6
Doxorrubicina 0.5 μ M	96	85.2	67.3	86.9	99.6	90.9	53.5

Vehículo: DMSO **Control:** Doxorrubicina. U251: glía de sistema nervioso central, PC-3: próstata, K562: leucemia, HCT-1: colon, MCF-7: mama, SKLU: pulmón, FGH: cultivo Primario de Fibroblastos Gingivales Humanos sanos NC: no citotóxico

6.1.3 Evaluación de la actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido de acetato de tetradecanoilforbol (ATF).

Se evaluó la actividad antiinflamatoria de los compuestos **33-35** (0.31 μ mol / oreja) en el modelo de edema de oreja de ratón inducido por acetato de 12-*O*-tetradecanoilforbol (ATF) (Tabla 4). El compuesto **33** disminuyó en un 57.27 % la inflamación siendo el más activo de los tres hopanos evaluados, mostrando una actividad dosis-dependiente con un valor DI_{50} 0.36 μ mol / oreja mientras que la del compuesto de referencia, indometacina, fue de 0.24 μ mol / oreja.

En el mismo modelo de inflamación, a una concentración doce veces menor, el compuesto **33** exhibió casi el mismo efecto antiinflamatorio que su epímero, acetato de moretenilo (**37**),⁴⁵ Figura 21. Esta observación sugiere que la orientación espacial del grupo isopropenilo en C-21 es una característica importante para la actividad antiinflamatoria.

Tabla 4. Efecto antiinflamatorio de los compuestos **33-35** sobre edema murino inducido por ATF.

Compuesto	Dosis ($\mu\text{mol}/\text{oreja}$)	Inhibición (%)
Control (CHCl_3)	-	-
33	0.31	57.27 \pm 16.99*
34	0.31	17.50 \pm 4.11
35	0.31	27.05 \pm 7.38
Indometacina	0.31	61.90 \pm 7.38**

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

Tabla 5. Curva dosis-respuesta de **33** sobre el edema inducido por ATF.

Compuesto	Dosis ($\mu\text{mol}/\text{oreja}$)	Inhibición (%)	DI ₅₀ ($\mu\text{mol}/\text{oreja}$)
Control (CHCl_3)	-	15.15 \pm 0.59	-
33	0.18	21.34 \pm 1.03*	0.36
	0.32	48.18 \pm 4.41	($r^2 = 0.98$)
	0.56	69.09 \pm 8.22	
	1	84.27 \pm 5.63	

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

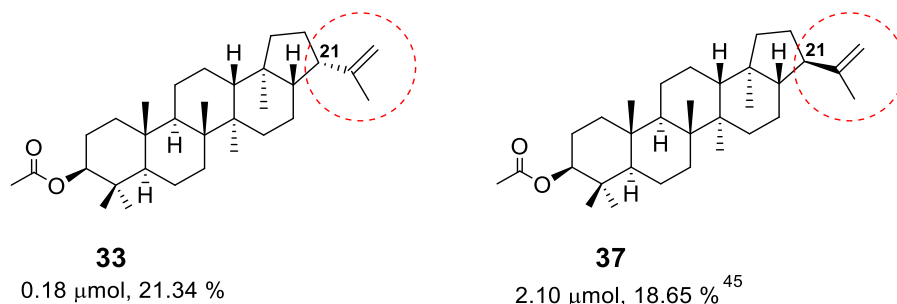


Figura 22. Comparación de los porcentajes de inhibición de inflamación (a diferentes concentraciones) de los epímeros C-21.

La Figura 23 muestra el análisis microscópico de secciones de orejas de ratón teñidas con hematoxilina-eosina. La sección A muestra el estado basal de la epidermis; se observa una línea celular única en el estrato germinativo, con el tejido conectivo de la dermis compacto y con pocos neutrófilos. La sección B muestra el edema (después de la administración de ATF), el aumento del grosor de la oreja y la infiltración celular; el estrato germinativo ya no es una monocapa de células, la estructura de la dermis se aprecia con espacios llenos de líquido tisular y se puede observar una abundante cantidad de neutrófilos infiltrados. La sección C muestra la oreja después del tratamiento con el hopano **33**, reduciendo los efectos de ATF: se restauró el estrato germinativo, con la estructura de una monocapa normal, la cantidad de neutrófilos es significativamente menor y la dermis ha recuperado casi por completo su histología normal

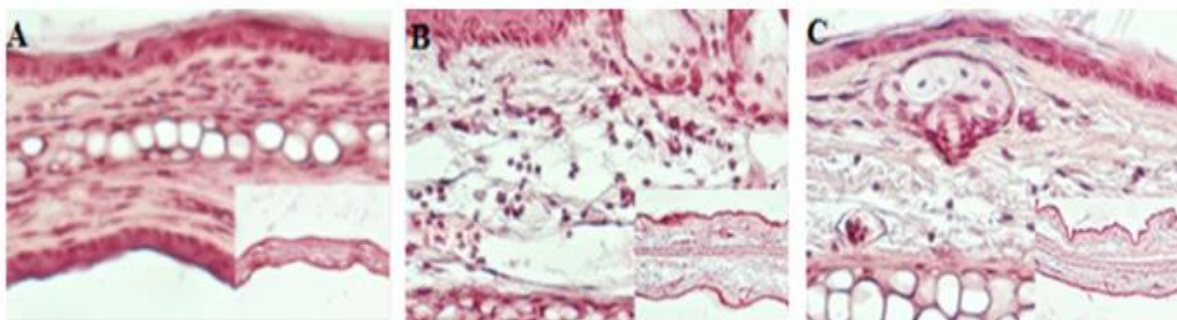


Figura 23. Análisis de secciones histológicas de orejas de ratones teñidas con hematoxilina-eosina (400x e insertos a aumentos de 100x), después de la aplicación de ATF y el compuesto **33** a una dosis de $0.31 \mu\text{mol} / \text{oreja}$. (A) Basal, (B) ATF, (C) ATF más tratamiento con **33**.

Un evento celular clave durante la inflamación es la acumulación de células polimorfonucleares, las cuales involucran principalmente a los neutrófilos.¹¹³ La estimulación de los neutrófilos da lugar a la liberación de la enzima mieloperoxidasa (MPO) y otras enzimas lisosomales por lo que la actividad de la MPO y sus productos oxidantes han sido implicados en el inicio y progresión de eventos inflamatorios^{114,115}

Debido a que el compuesto **33** redujo la infiltración celular (Figura 23 C), se determinó la actividad enzimática de MPO que es un marcador específico para la migración y la infiltración celular,¹¹⁶ para determinar si afecta el reclutamiento de neutrófilos en la oreja de ratón después del tratamiento con ATF. Se observó que la actividad de MPO fue disminuida por el triterpeno **33**, de una manera dependiente de la dosis, con una DI_{50} de $0.23 \mu\text{mol} /$

oreja¹¹⁷ lo que puede tener relación con la reducción de la migración de los neutrófilos y con la disminución del edema observada, que es un mecanismo de algunos fármacos antiinflamatorios como la indometacina (DI₅₀ 0.04 μmol/oreja).

Tabla 6. Actividad de la enzima mieloperoxidasa del compuesto **33**.

Compuesto	Dosis (μmol/oreja)	MPO (D.O 450 nm)	Inhibición (%)	DI ₅₀ (μmol/oreja)
Basal		0.149±0.023		
ATF		1.169±0.228		
33	0.18	0.719±0.133*	38.49 ± 11.40*	0.23
	0.32	0.409±0.063**	65.07 ± 5.35**	
	0.56	0.246±0.055**	78.97 ± 4.68**	
	1	0.237±0.060**	79.76 ± 5.15**	

Los datos representan el promedio de seis experimentos ± el error estándar de la media. Los resultados se analizaron mediante una prueba de *Dunnett*, los valores de $p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.01$ (**) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control ATF.

6.1.4 Evaluación de la actividad inhibitoria de los hopanos en α-glucosidasa

Se ha informado que ciertos triterpenos pentacíclicos exhiben actividad antidiabética,¹¹⁸ sin embargo, pocos estudios han demostrado el mecanismo de acción de estos compuestos en blancos específicos involucrados en la homeostasis de la glucosa. En un trabajo anterior, se investigaron los efectos del hopenol B (**35**) sobre la insulina y el péptido 1 similar al glucagón (GLP-1) administrados por vía oral para el tratamiento agudo; el triterpeno disminuyó la glucemia, estimuló la secreción de GLP-1, potenció la secreción de insulina, aumentó el contenido de glucógeno hepático y el calcio intracelular modulado en los islotes pancreáticos.¹¹⁹

La inhibición de la enzima α-glucosidasa es otro blanco molecular establecido para la evaluación de compuestos con potencial tratamiento de la diabetes,¹²⁰ ya que esta enzima juega un papel crucial en la hidrólisis de los carbohidratos ingeridos en la dieta. La α-glucosidasa es un miembro de una familia de 13 enzimas glucósido hidrolasas presentes en diversas especies, incluidos animales, plantas, bacterias y hongos.¹²¹ En este trabajo se evaluaron dos enzimas α-glucosidasa; de levadura (tipo 1, de *Saccharomyces cerevisiae*) y de mamífero (tipo 2), para determinar la actividad inhibitoria de los hopanos, lo anterior con base en que especificidad para un determinado sustrato es diferente para cada tipo de

enzima.¹²² Los triterpenos **33-35** se evaluaron a las concentraciones 1, 10, 100 μM y el compuesto **33** a 10 y 100 μM inhibió un 83.5 y 98.79 % respectivamente, la actividad enzimática (Tabla 7).

Tabla 7. Actividad inhibitoria de **33-35** en α -glucosidasa de levadura.

Compuesto	Concentración (μM)	Inhibición (%)
Control (CHCl₃)		
33	1	11.49
	10	83.5
	100	98.79
34	1	0
	10	1.51
	100	7.39
35	1	3.75
	10	4.41
	100	23.47

El triterpeno **33** mostró una alta actividad inhibitoria con CI_{50} de $5.74 \pm 0.49 \mu\text{M}$ en comparación con el control positivo acarbosa ($7.26 \pm 0.34 \text{ mM}$), como se puede observar en la Tabla 8. Sin embargo, la actividad de los compuestos aislados en este estudio fue significativamente menor en la evaluación la enzima α -glucosidasa de mamífero, lo que indica que los sustratos tienen una mayor interacción con las enzimas tipo 1

Tabla 8. Actividad inhibitoria de **33** en α -glucosidasa de levadura.

Compuesto	Concentración (μM)	Inhibición (%)	CI_{50} (μM)
Control (CHCl₃)			
33	0	0	
	1	4.86 \pm 1.79*	
	1.78	9.19 \pm 4.93	5.74 \pm 0.49
	3.16	22.08 \pm 7.11	
	5.62	50.64 \pm 7.23	
	10	81.16 \pm 6.1	
	17.78	95.31 \pm .23	
	31.62	97.73 \pm 3.24	

Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes \pm el error estándar de la media. Los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza ANOVA seguido de una prueba *Dunnnett* de los grupos aislados con diferencias significativa. Los valores de $p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.01$ (**) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control (DMSO 5 %).

Para explorar y correlacionar el modo de unión de los compuestos aislados (**33-35**) con los resultados experimentales, se realizó un estudio de acoplamiento molecular con la enzima α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* (PDB 4J5T), utilizando el programa AutoDock 4.2. Se observó que todos los compuestos se unen cerca de los aminoácidos que están en el sitio catalítico (Glu-771 y Asp-568); sin embargo, mostraron diferentes modos de unión. En el caso del compuesto **33**, observamos la formación de puentes de hidrógeno entre el grupo acetilo y el amino terminal de grupo guanidinio del residuo Arg-428, ubicado en otra cavidad cercana al sitio activo (Figura 24), lo que permite que el resto del compuesto **33** ocupe esta cavidad lo que inhibe su actividad. El compuesto **34** adoptó una conformación similar a la de **33** (Figura 25), sin embargo, a pesar de tener mayor energía de enlace, el compuesto **34** no formó enlaces de hidrógeno con algún aminoácido por lo que las interacciones de Van der Waals presentes, pueden no ser suficientes para que éste permanezca fijo en la cavidad del sitio activo; entonces, podría ser expulsado más fácilmente que el compuesto **33**. El compuesto **35** también ocupó la cavidad del sitio catalítico, sin embargo, este compuesto formó un puente de hidrógeno entre el grupo hidroxilo y el residuo Glu-707, que se encuentra alejado del sitio activo principal y del sitio B como se observa en la Figura 26.

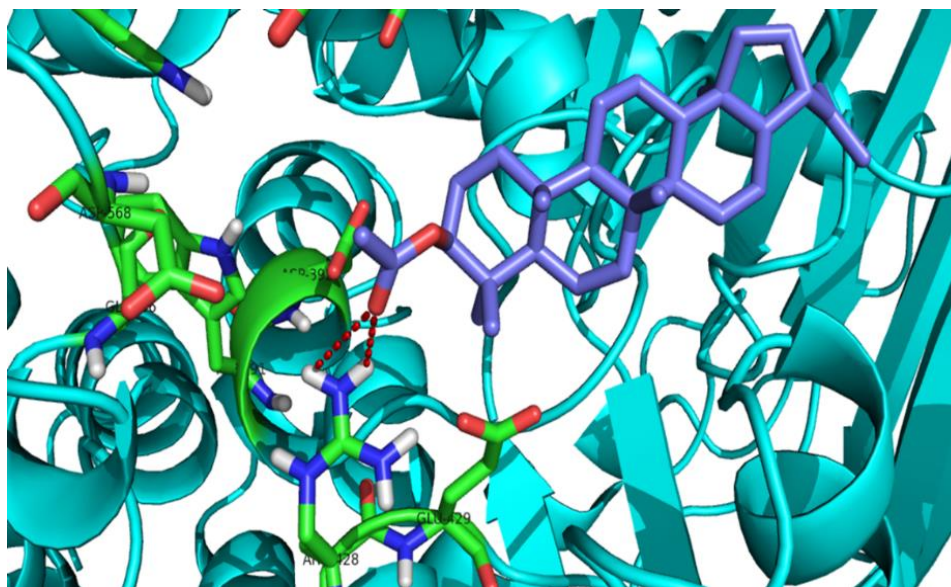


Figura 24. Interacciones del compuesto **33** con α -glucosidasa.

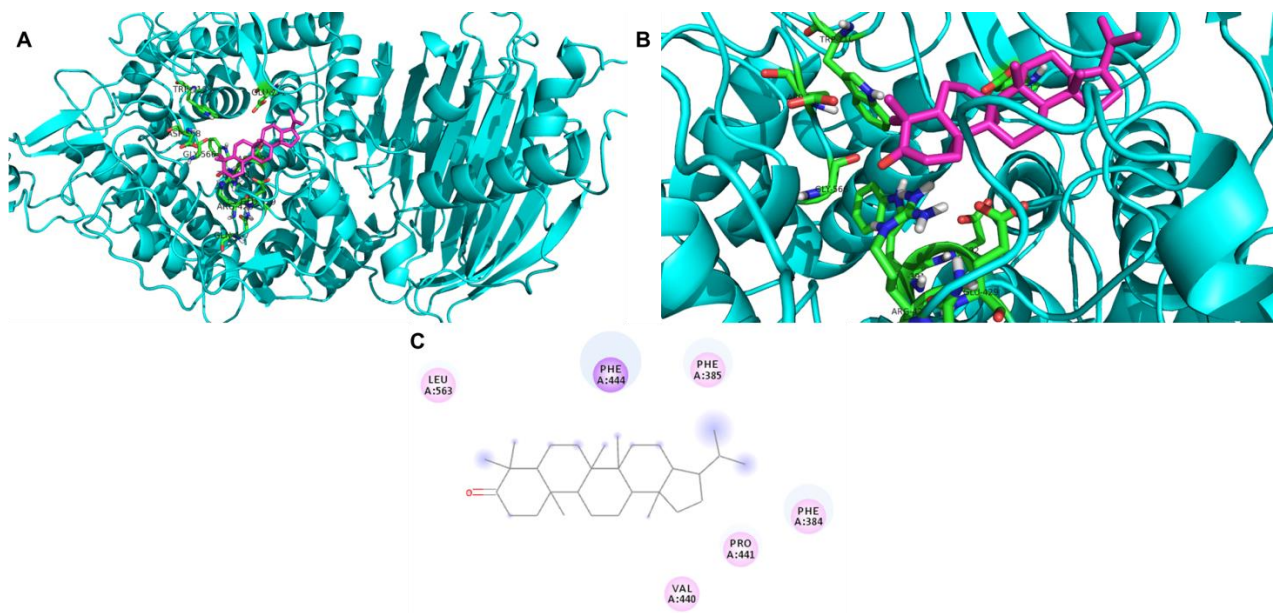


Figura 25. Interacciones del compuesto **34** con α -glucosidasa.

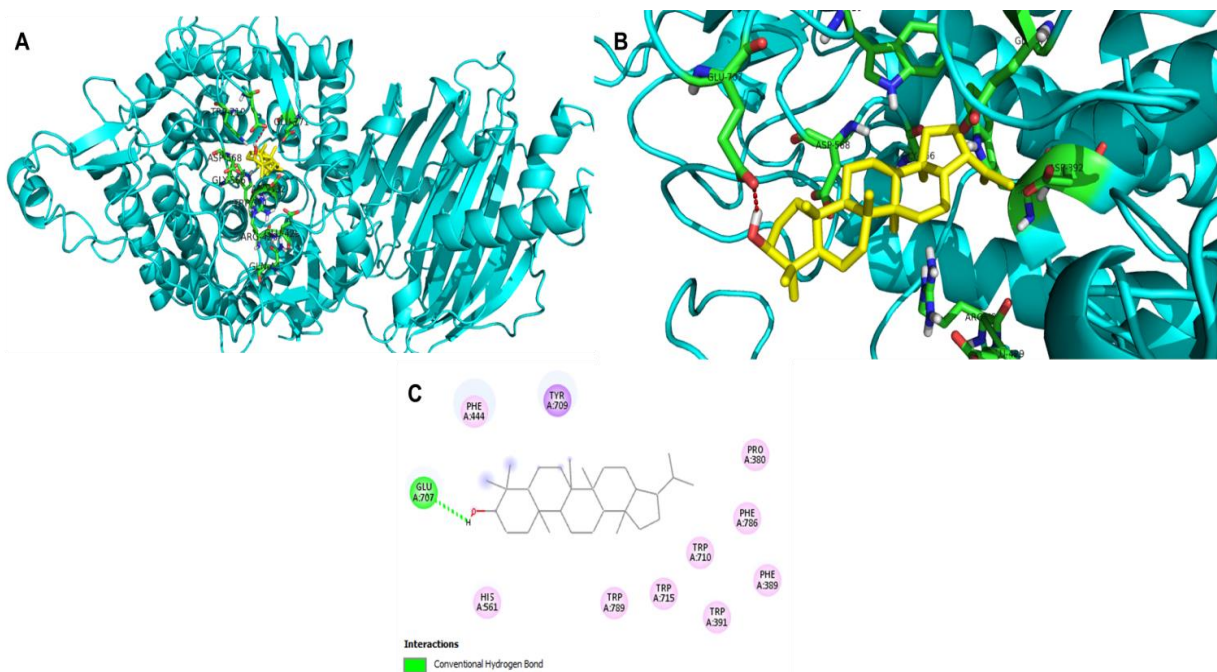


Figura 26. A y B. Interacción del compuesto **35** con α -glucosidasa. Se observa un puente de hidrógeno con Glu-707. C. Diagrama 2D de la interacción ligando-proteína, interacciones de tipo Van der Waals son observadas.

Los resultados obtenidos sugieren que una sustancia que inhibe la actividad de la α -glucosidasa de levadura no inhibirá necesariamente la α -glucosidasa de mamífero¹²³ y a pesar de esta última es biológicamente más relevante que la α -glucosidasa de levadura esta se ha utilizado ampliamente como modelo en investigaciones nutraceuticas y medicinales.¹²⁴

Los resultados de actividad inhibitoria *in vitro* e *in silico* donde **33** mostró una alta actividad inhibitoria con un valor de CI_{50} de $5.74 \pm 0.49 \mu M$ en la enzima α -glucosidasa de levadura en comparación con el control positivo acarbosa ($7.26 \pm 0.34 mM$), pueden proporcionar una base sólida para un mayor desarrollo de inhibidores de α -glucosidasa dado que la acarbosa es un fármaco ya utilizado en el tratamiento de la diabetes tipo II, con el inconveniente de los efectos secundarios que presenta como flatulencia, dolor de estómago, diarrea, etc.¹²⁵

6.1.5 Evaluación de la actividad antiparasitaria

Las infecciones parasitarias se encuentran entre los principales problemas de salud pública mundial con cargas económicas y de mortalidad muy elevadas. Entre los obstáculos en el control de las enfermedades parasitarias están la resistencia a los medicamentos, la toxicidad de estos y la poca asequibilidad a los mismos, por lo cual es pertinente la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para su tratamiento.

La tripanosomiasis y la leishmaniasis son ejemplos de enfermedades parasitarias causadas por protozoos de la familia Trypanosomatidae.¹²⁶ En la literatura se ha informado que algunos triterpenos pentacíclicos han mostrado una alta actividad antiparasitaria contra diversas especies principalmente pertenecientes a los géneros *Leishmania* y *Trypanosoma*.^{127–129}

La enfermedad de Chagas, también llamada tripanosomiasis americana, es una enfermedad desatendida potencialmente mortal causada por el parásito protozoo *Trypanosoma cruzi*.¹³⁰ En México en el periodo que comprende entre el año 2000 y 2017 se registraron 9981 casos de personas con enfermedad de Chagas (agudos y crónicos).¹³¹ La principal forma de transmisión de *T. cruzi* al humano es la vectorial, mediante especies de

triatominos pertenecientes a los géneros *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus* cuyo ciclo de vida se ilustra en la Figura 27.¹³²

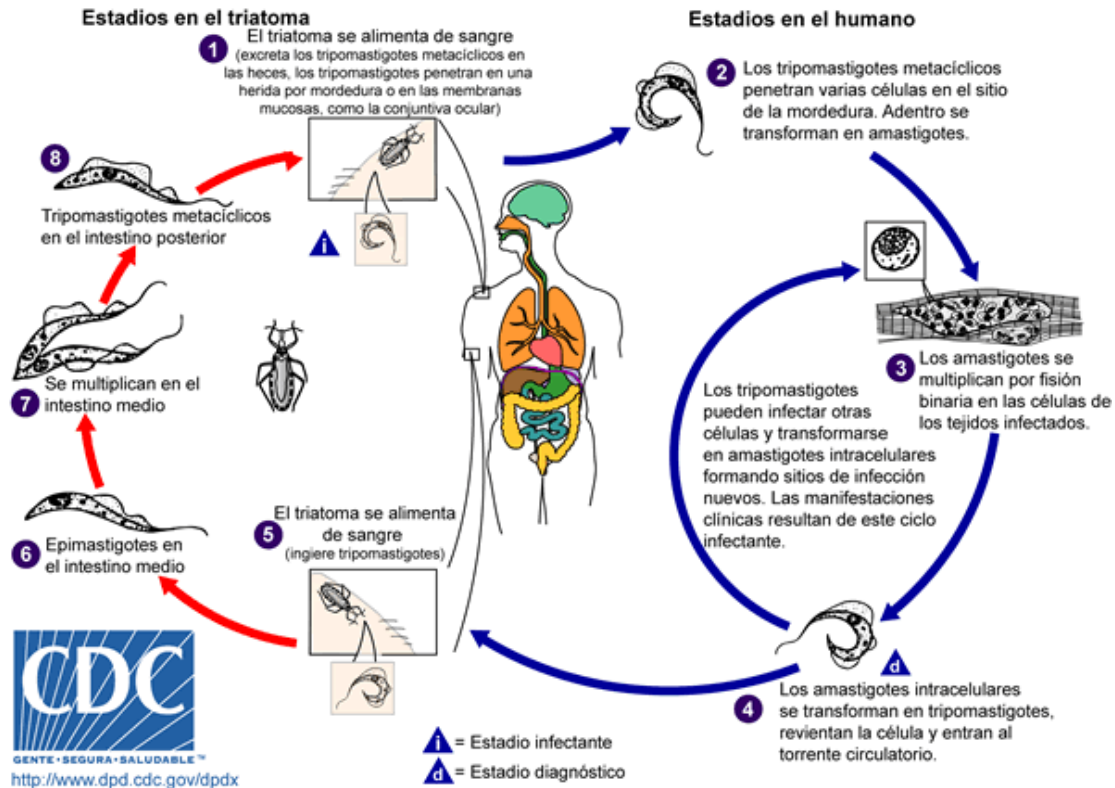


Figura 27. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.

La enfermedad de Chagas puede manifestarse en el sitio de inoculación como una lesión local (chagoma, edema palpebral). La fase aguda de la enfermedad es usualmente asintomática, pero puede presentarse fiebre, anorexia, linfadenopatía, hepatoesplenomegalia leve y miocarditis. El estado crónico sintomático se puede presentar después de años e inclusive después de décadas de la infección inicial. Las manifestaciones incluyen cardiomiopatía (la manifestación más severa); las patologías del tracto digestivo son el megaesófago o el megacolon; y la pérdida de peso.¹³² Actualmente el tratamiento para la enfermedad de Chagas con benznidazol y nifurtimox es limitado, con eficacia variable y alta toxicidad.¹³³

Otro parásito infeccioso importante es *T. rangeli* que a diferencia de *Trypanosoma cruzi* no es patógeno para el humano, pero sí para las especies del género *Rhodnius*, las cuales son los vectores comprobados de este parásito. *T. rangeli* se ha considerado como un modelo para los estudios biológicos y moleculares relacionados con las interacciones parásito-hospedero-vector, pues su conocimiento ayudará a entender la dinámica de la transmisión vectorial de *T. cruzi* y de *T. rangeli*, las bases químicas y moleculares de la patogénesis de *T. cruzi* y la ausencia de patogenia de *T. rangeli* para el vertebrado, lo cual podría conducir a la identificación de blancos terapéuticos y al desarrollo de fármacos o de vacunas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.¹³⁴

La leishmaniasis es causada por los parásitos pertenecientes al género *Leishmania* spp. que se transmiten mediante un vector (cuyo ciclo de vida se ilustra en la Figura 28) que afecta a más de 150 millones de personas en el mundo, especialmente en las regiones subtropicales. En México la enfermedad no es de notificación obligatoria, por lo que hay un subregistro nacional,¹³⁵ la mayor parte de los casos de leishmaniasis se presentan en los estados de Chiapas, Campeche, Tabasco y Quintana Roo.¹³⁶ La leishmaniasis humana presenta tres formas principales de la enfermedad: la cutánea, la visceral (kala azar) y la mucocutánea. La leishmaniasis cutánea se caracteriza por presentar una o más úlceras en la piel. Las personas con leishmaniasis visceral usualmente presentan fiebre, pérdida de peso, bazo e hígado agrandados. La leishmaniasis mucocutánea se caracteriza por lesiones iniciales de piel que, aunque lleguen a cicatrizar, producen metástasis que varios años después destruyen mucosas y cartílagos, particularmente en la nariz y en faringe con efectos invalidantes.¹³⁷ Entre los medicamentos principales para tratar la leishmaniasis se encuentran la anfotericina B, los antimoniales pentavalentes, la pentamidina, la paromomicina, la miltefosina y lasitamaquina. Sin embargo presentan algunos inconvenientes como alta toxicidad, efectos secundarios, poca efectividad y alto costo.¹³⁸

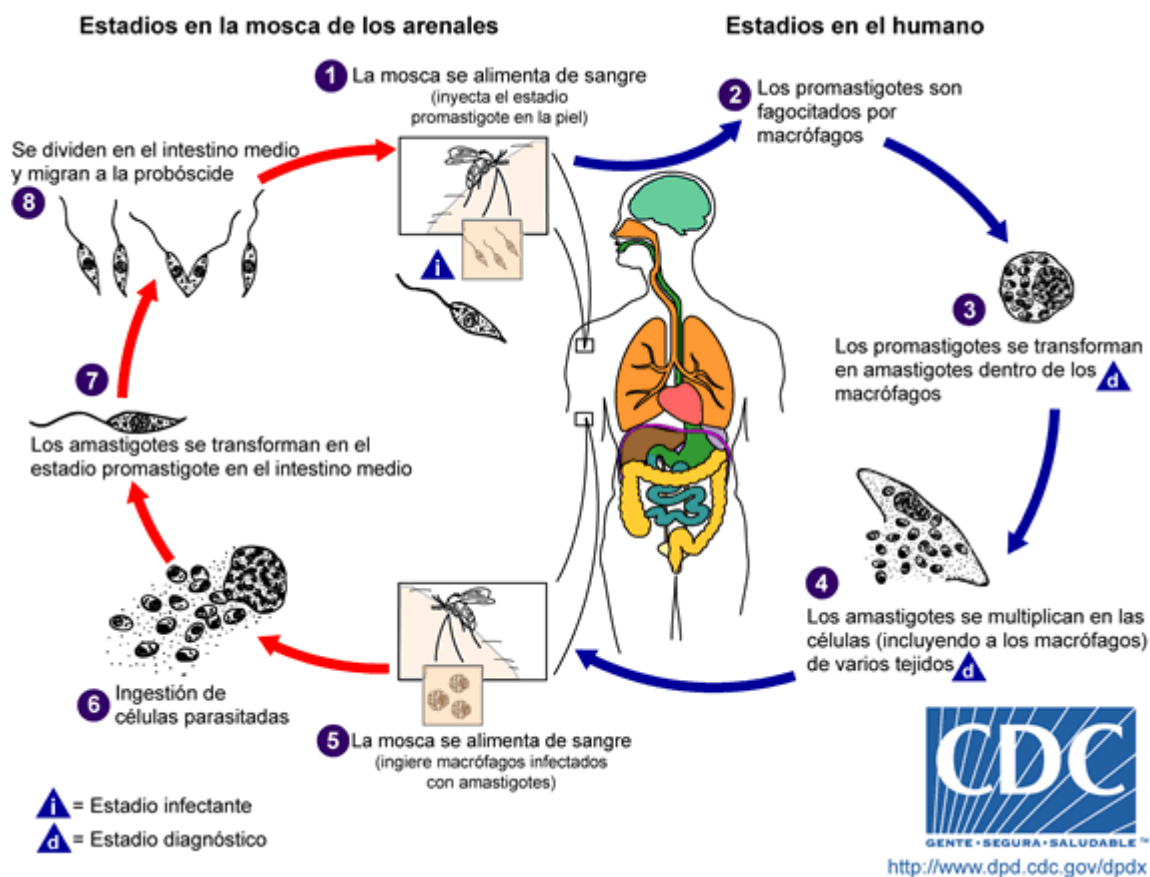


Figura 28. Ciclo de vida de *Leishmania* spp.

Con base en lo anterior se llevó a cabo la evaluación de la actividad antiparasitaria de los hopanos **33**, **34** y **35**. Los compuestos indicados se evaluaron a una concentración de 50 μM contra la cepa de *T. cruzi* cepa Querétaro y contra las células Vero a las 24 h. El compuesto **33** no redujo la viabilidad del parásito o de las células Vero, por lo que no se consideró para una evaluación adicional. Los compuestos **34** y **35** redujeron la viabilidad de *T. cruzi* en más del 20 % a una concentración de 50 μM sin afectar la viabilidad de las células Vero, por lo que, se probaron a diferentes concentraciones a las 24 y 48 h.

A las 24 h, Figura 29, el compuesto **34** redujo la viabilidad de la cepa Querétaro de *T. cruzi* en más del 20 % en todas las concentraciones probadas y tuvo un efecto moderado sobre *T. rangeli* y *Leishmania mexicana* (*L. mexicana*). Ninguna de las concentraciones tuvo efecto sobre las cepas de Cl-Brener y Silvio. Sin embargo, **34** no mostró actividad contra las células Vero, incluso a las concentraciones más altas. El compuesto **35** sólo se pudo evaluar

a una concentración de 50 μ M, debido a la precipitación en el medio de cultivo a concentraciones más altas, mostrando un efecto similar al del compuesto **33**.

A las 48 h, Figura 30, se observa que el compuesto **34** perdió el efecto tripanocida, siendo efectivo sólo en la concentración más alta, contra Cl-Brener y Silvio. El resto de las tripanosomátidas no se vieron afectadas. Desafortunadamente, a las 48 h el compuesto **34** fue tóxico para las células Vero. Por otro lado, el compuesto **35** no afectó a las células de mamíferos, pero tampoco afectó la viabilidad de *T. cruzi*. El efecto citostático y la toxicidad en células Vero hicieron a los compuestos **34** y **35** candidatos pocos prometedores para el tratamiento de estas parasitosis.

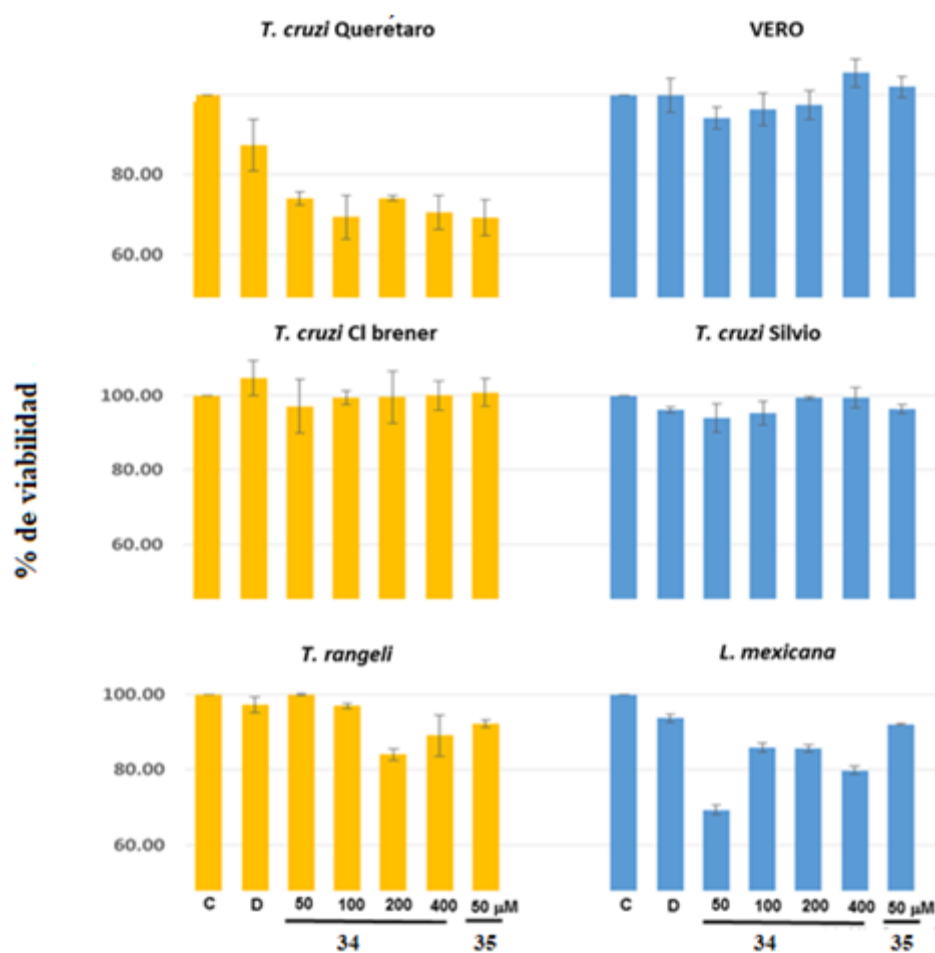


Figura 29. Gráficas del efecto antiparasitario sobre la viabilidad de *T. cruzi*, *T. rangeli*, *L. mexicana* y células Vero de los compuestos **34** y **35** a las 24 h. (El porcentaje de viabilidad se muestra como promedio más desviación estándar).

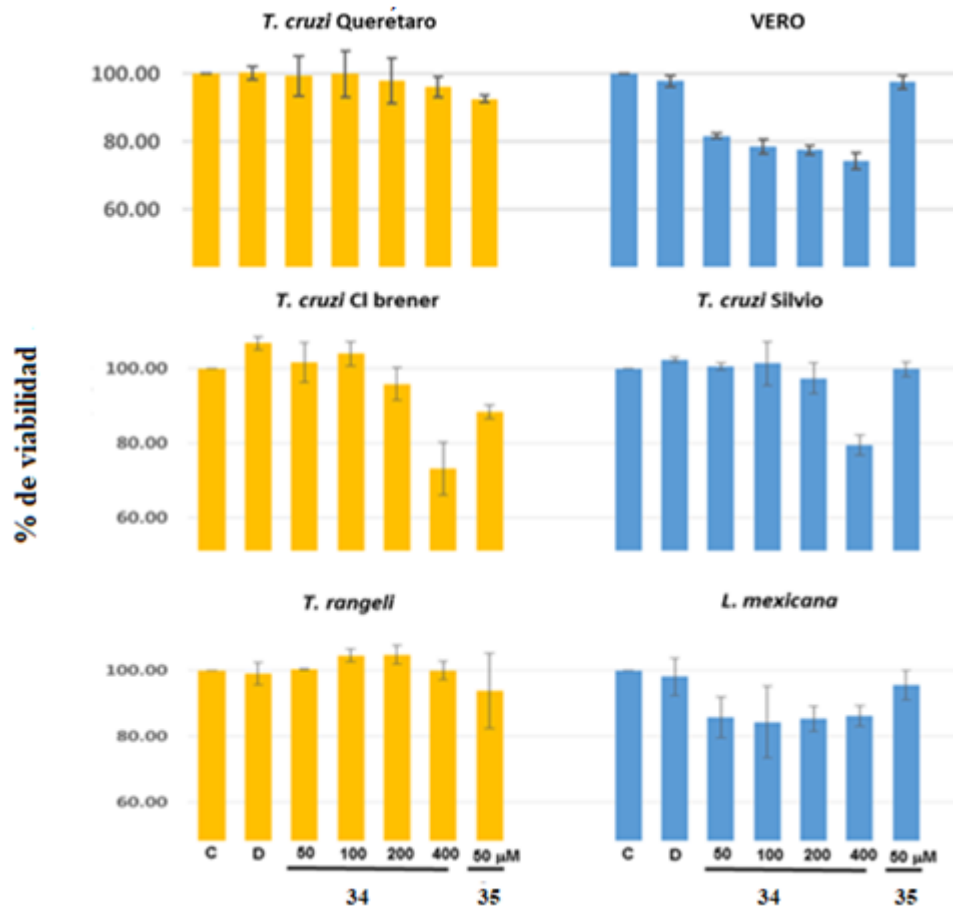


Figura 30. Efecto antiparasitario sobre la viabilidad de *T. cruzi*, *T. rangeli*, *L. mexicana* y células Vero de los compuestos **34** y **35** a las 48 h. (El porcentaje de viabilidad se muestra como promedio más desviación estándar).

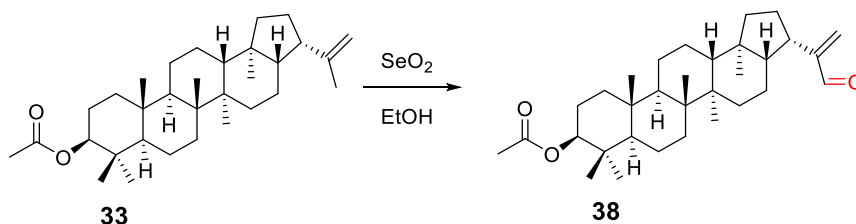
6.1.6 Derivados de hopano

Se llevó a cabo la exploración de la reactividad de las posiciones, C-2, C-3, C-29 y C-30, de los hopanos **33-35**, mediante reacciones de oxidación e incorporación de pirazinas.

6.1.6.1 Reacción del hopano **33** con SeO_2

El isopropenilo de los triterpenos del tipo hopano **33-35** puede funcionalizarse mediante una oxidación alílica con dióxido de selenio (SeO_2), para transformarlo a un aldehído α,β -insaturado, tal reacción es conocida como reacción de Riley.¹³⁹

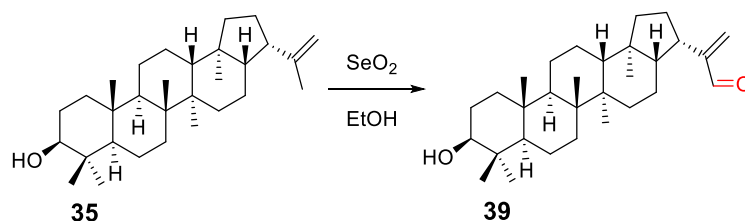
La oxidación alílica implica una cicloadición de tipo eno con el ataque preferencial del extremo más nucleofílico del doble enlace, que en este caso es la posición C-29, al selenio para obtener el ácido alilselenínico que sufre un reordenamiento sigmatrópico [2,3] que conduce el éster selenito (y al retorno del doble enlace a su posición original). En el último paso el éster se hidroliza para obtener el aldehído.



Esquema 2. Reacción de Riley del hopano **33**.

A partir del compuesto **33** se llevó a cabo la oxidación alílica para obtener el aldehído correspondiente en la posición C-30 (Esquema 2). El seguimiento de esta reacción por ccf, permitió observar que sólo se llevó a cabo la formación de un producto y quedó parte de materia prima sin reaccionar. En el espectro de RMN ^1H (Espectro 7) del producto (**38**) se observa una señal simple en δ_{H} 9.56 cuyo desplazamiento químico es característico de un hidrógeno de aldehído, también se observan dos señales simples en δ_{H} 6.24 y en δ_{H} 5.98, correspondientes a los hidrógenos vinílicos H-29b y H-29a, respectivamente, que se desplazan a mayor frecuencia, respecto a **33**, por la desprotección generada por el aldehído. Debido a que sólo se modificaron las posiciones C29- C30 de la materia prima, las señales del esqueleto base se mantuvieron prácticamente inalteradas.

6.1.6.2 Reacción del hopenol (35) con SeO₂



Esquema 3. Reacción de Riley del hopenol (35).

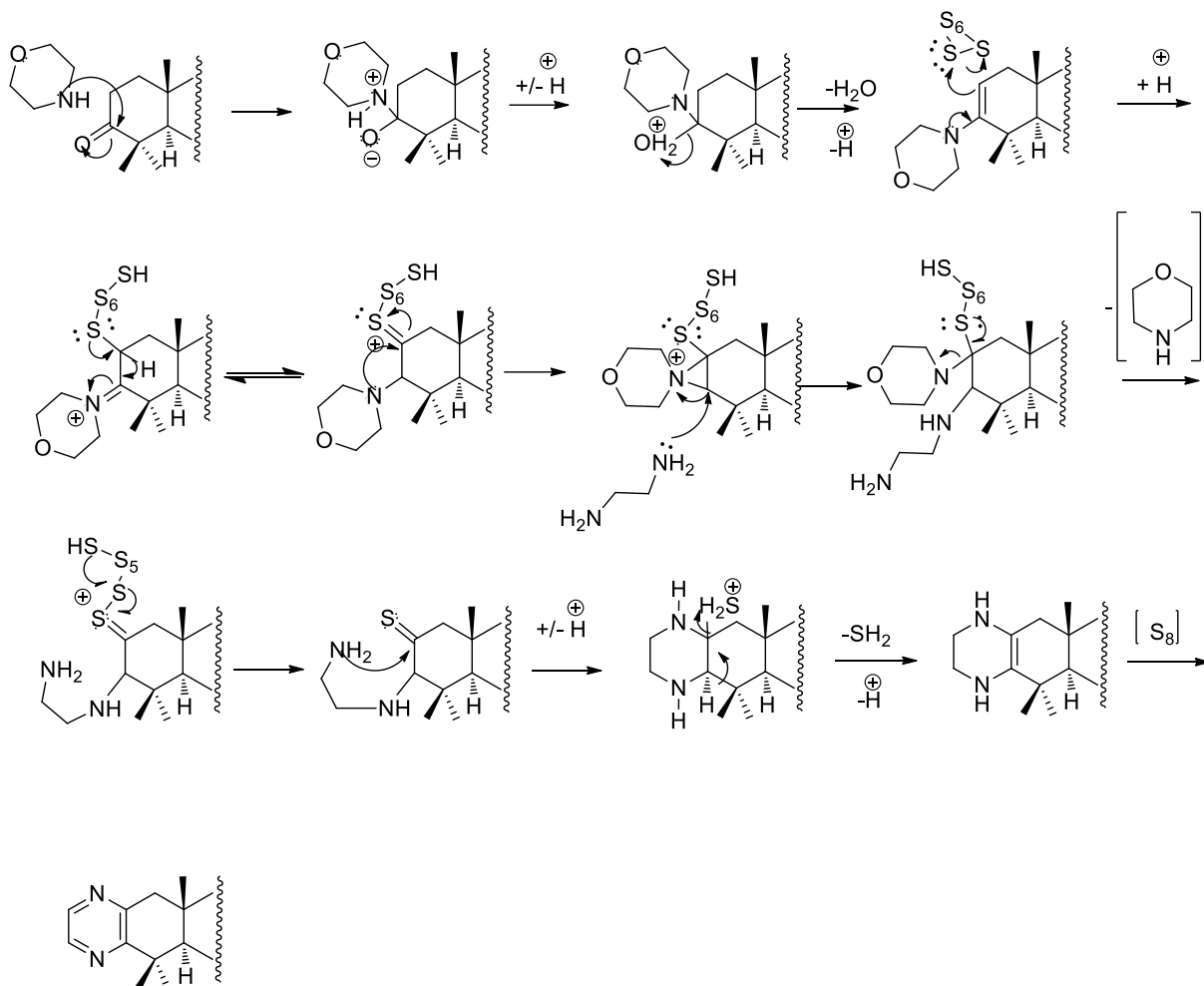
La oxidación alílica del hopenol (Esquema 3) permitió obtener el derivado aldehídico de hopenol (39) que presenta en el espectro de RMN ¹H (Espectro 8) una señal simple en δ_H 9.51, característica de un hidrógeno de aldehído, y se observan dos señales simples en δ_H 6.29 y en δ_H 5.91, correspondientes a los hidrógenos vinílicos H-29b y H-29a. Debido a que sólo se modificaron las posiciones C-29 y C-30 de la materia prima, las señales del esqueleto base se mantuvieron prácticamente constantes.

6.1.6.3 Pirazina derivada de 34

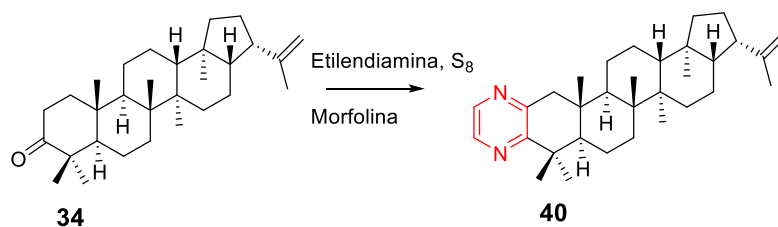
La reacción original de Willgerodt-Kindler para síntesis de tioamidas que se realiza en un solo procedimiento experimental (*one pot*) para la síntesis de tioamidas. Normalmente, se lleva a cabo utilizando una cetona o aldehído, azufre elemental y una amina (o amoníaco) a temperaturas elevadas.¹⁴⁰ Debido a la amplia gama de sustratos que reaccionan bajo condiciones estándar de la reacción Willgerodt – Kindler¹⁴¹ la postulación de una sola vía mecanística no ha sido directa, y se han propuesto varios mecanismos plausibles. Sejbal¹⁴² y colaboradores, en 1985, realizaron una modificación de la reacción de Willgerodt – Kindler para llevar cabo la preparación de pirazinas triterpénicas.

En el Esquema 4 se ilustra la propuesta mecanística para la formación de las pirazinas esteroidales. La morfolina es una base débil que reacciona como nucleófilo y se adiciona al carbonilo C-3 del triterpeno, seguido por eliminación de H₂O para formar una enamina; ésta reacciona con el azufre para producir un catión iminio, que formará un catión iminio – aziridinio en donde la etilendiamina lleva a cabo un ataque nucleofílico que permitirá la

eliminación de morfolina, y mediante una adición a la tiocetona seguida de la eliminación se forma el heterociclo, el cual se aromatiza (en presencia de azufre) para formar la pirazina.¹⁰¹



Esquema 4. Mecanismo propuesto para la formación de pirazinas.¹⁰¹



Esquema 5. Preparación de la pirazina **40**.

En el espectro de RMN ¹H (Espectro 9) del derivado **40** (Esquema 5) se observan dos señales de hidrógenos aromáticos en δ_H 8.40 y en δ_H 8.26, estos protones correlacionan en el experimento HSQC con los carbonos en δ_C 142.45 y en δ_C 141.60 que son señales típicas de las pirazinas 2,3 disustituídas. En el espectro de RMN ¹H se observan en δ_H 3.05 y en δ_H 2.48 dos señales dobles ($J = 16.5$ Hz), que integran cada una para un hidrógeno, que forman un sistema tipo AB, ambas señales presentaron correlación en el espectro de HSQC con la señal δ_C 48.74 por lo que fueron asignadas a los protones diasterotópicos del metileno C-1, que por la presencia del heterociclo se desplaza a mayor frecuencia respecto a la señal para el mismo carbono de la materia prima (**34**). En el espectro RMN ¹³C se observa una señal en δ_C 110.30 correspondiente al carbono C-29, la cual correlaciona en el espectro HSQC, con una señal simple en δ_H 4.79 que integra para dos hidrógenos vinílicos (H-29b y H-29a).

6.1.6.4 Evaluación de la actividad antiproliferación celular de líneas tumorales

La pirazina **40** se evaluó en seis líneas celulares tumorales humanas y en la línea de células sanas de fibroblastos gingivales humanos. como se observa en la Tabla 9, no fue tóxica contra las líneas celulares analizadas. Estos resultados fueron consistentes con la nula toxicidad de los hopanos **33-35**.

Tabla 9. Evaluación de actividad inhibitoria de la proliferación celular de **40** (25 μ M).

Compuesto	% de inhibición de la proliferación celular en líneas cancerosas humanas						
	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1	FGH
40	6.8	14	NC	5.3	NC	9	18.6
Doxorrubicina 0.5 μ M	96	85.2	67.3	86.9	99.6	90.9	53.5

Vehículo: DMSO **Control:** Doxorrubicina. U251: glía de sistema nervioso central, PC-3: próstata, K562: leucemia, HCT-1: colon, MCF-7: mama, SKLU: pulmón, FGH: cultivo Primario de Fibroblastos Gingivales Humanos sanos NC: no citotóxico

Sobre *Sapium lateriflorum*



6.2 *Sapium lateriflorum*

En esta parte se presentan y discuten los resultados de la reactividad del palmitato de lupeño (**15**) y de sus derivados, producto de las modificaciones realizadas en las posiciones C-2, C-3 y C-29 y C-30, y se dan a conocer los resultados de la actividad citotóxica (en las líneas celulares U251, PC-3, K562, HCT-15, MCF-7, SKLU-1 y COS7) y antiinflamatoria (modelo de edema inducido en oreja de ratón por ATF e inhibición de las enzimas COX-1 y COX-2) de los compuestos obtenidos en la presente investigación.

6.2.1 Separación de palmitato de lupeño (**15**) y palmitato de β -amirilo (**17**) por derivatización química

Se llevó a cabo la separación de la mezcla de triterpenos palmitato de lupeño (**15**) y palmitato de β -amirilo (**17**) presentes en una fracción del extracto CH₂Cl₂: Metanol (1:1) de las hojas de *Sapium lateriflorum* en una proporción de 1:3, caracterizada en un trabajo previo realizado en nuestro grupo de investigación.⁶³ Se consideró la derivatización química de los compuestos como estrategia de separación, dada la diferente reactividad de las olefinas (Figura 31).

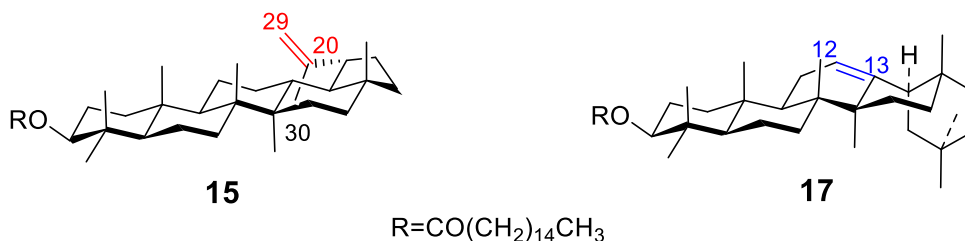
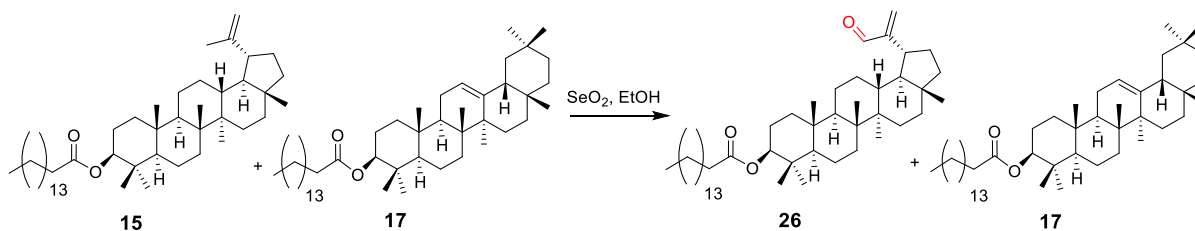


Figura 31. Proyecciones conformacionales del palmitato de lupeño (**15**) y palmitato de β -amirilo (**17**).

Mediante una oxidación alílica con dióxido de selenio (SeO₂, reacción de Riley)¹³⁹ el palmitato de lupeño (**15**) puede ser convertido a un aldehído α,β -insaturado. El palmitato de β -amirilo (**17**) presenta un congestionamiento estérico en C-11 (Figura 31), bien conocido en esteroides y triterpenos pentacíclicos, que disminuye significativamente su reactividad frente al SeO₂. La identidad del producto mayoritario de esta reacción (**26**, Esquema 6) fue establecida por comparación directa con una muestra auténtica disponible en el grupo de investigación.

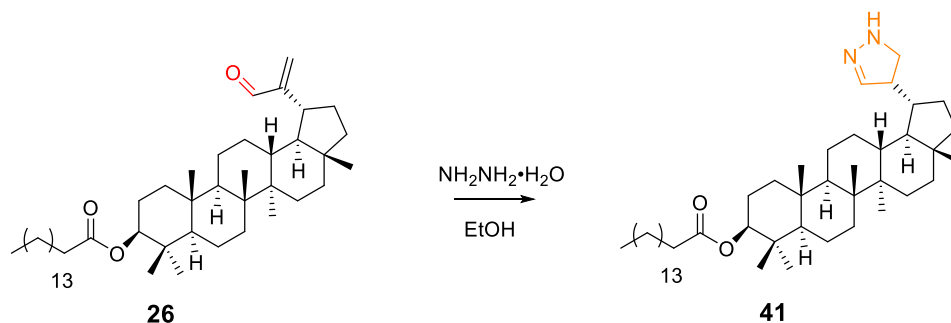


Esquema 6. Reacción de Riley realizada a la mezcla **15** + **17** para su separación.

6.2.2 Preparación de 30-azoderivados de palmitato de lupeño (**15**)

6.2.2.1 Reacción del aldehído **26** con NH_2NH_2

Entre los métodos más empleados en la síntesis de pirazolinas se encuentra la reacción de aldehídos o cetonas α,β -insaturados con reactivos de hidrazina,⁶⁷ (Esquema 7) y en algunas metodologías se emplea catálisis ácida¹⁴³ para promover un aumento de electrofilia del carbonilo del aldehído **26**. Con base en lo anterior y para explorar la reactividad del grupo isopropenilo, en la Tabla 10 se resumen algunas condiciones exploradas.^{144,145,67,146}



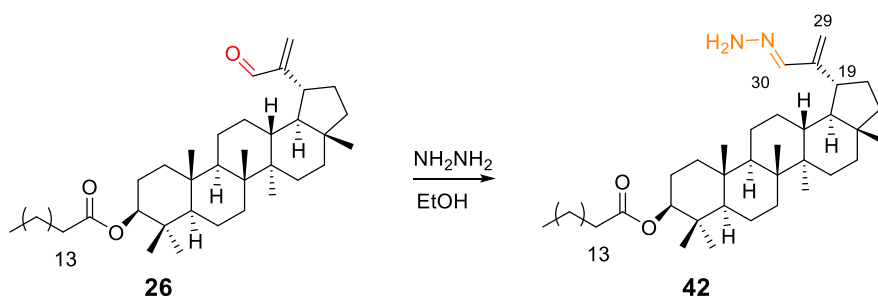
Esquema 7. Intento de preparación de la 2-pirazolina (**41**).

Tabla 10. Condiciones para la obtención de **41**

Calentamiento	Reactivos	Condiciones	Observación
1) Convencional	NH ₂ NH ₂ ·H ₂ O	Reflujo, 2 h	n.r.
2) Convencional	NH ₂ NH ₂ ·H ₂ O	Reflujo, 4 h	Mezcla compleja
3) M. O	NH ₂ NH ₂ ·H ₂ O	100 °C, 5 min	n.r.
4) M. O	NH ₂ NH ₂ ·H ₂ O	100 °C, 20 min	n.r.
5) M. O	NH ₂ NH ₂ ·H ₂ O + <i>p</i> -TsOH (1 eq)	100 °C, 20 min	42 , 50 %
6) Convencional	NH ₂ NH ₂ ·2HCl	Reflujo, 4 h	42 , 85%
7) Convencional	NH ₂ NH ₂ ·2HCl	25 °C, 2 h	42 , 85 %
8) M. O	NH ₂ NH ₂ ·2HCl	100 °C, 10 min	42 , 80 %

n.r.: no reaccionó. M.O: microondas

Bajo las condiciones anteriores sólo fue posible obtener la hidrazona **42**, como se muestra en la siguiente reacción (Esquema 8).

**Esquema 8.** Preparación de la hidrazona del 30-oxo-palmitato de lupeño (**42**)

El derivado **42** obtenido está constituido por 46 carbonos lo que es consistente con la fórmula molecular C₄₆H₈₀O₂ la cual se estableció con base en su espectro de masas de alta resolución. En el espectro RMN ¹H (Espectro 10) se observan una señal simple en δ_H 8.06, que integra para un hidrógeno, asignada al metino en C-30 y también se observan dos señales

simples en δ_H 5.62 y en δ_H 5.42, correspondientes a los hidrógenos vinílicos H-29b y H-29a desplazadas en menor frecuencia, respecto a **26**, por la protección generada por la hidrazona. Debido a que sólo se modificaron las posiciones C29- C30 de la materia prima, las señales del esqueleto base (**26**) se mantuvieron prácticamente constantes. Se infiere que la configuración de la hidrazona es *E*, con base a que en dicha disposición existe una menor compresión estérica, lo que explica la estabilidad de la hidrazona.

La comparación de los espectros de RMN 1H de la materia prima y la hidrazona se observa en la Figura 32:

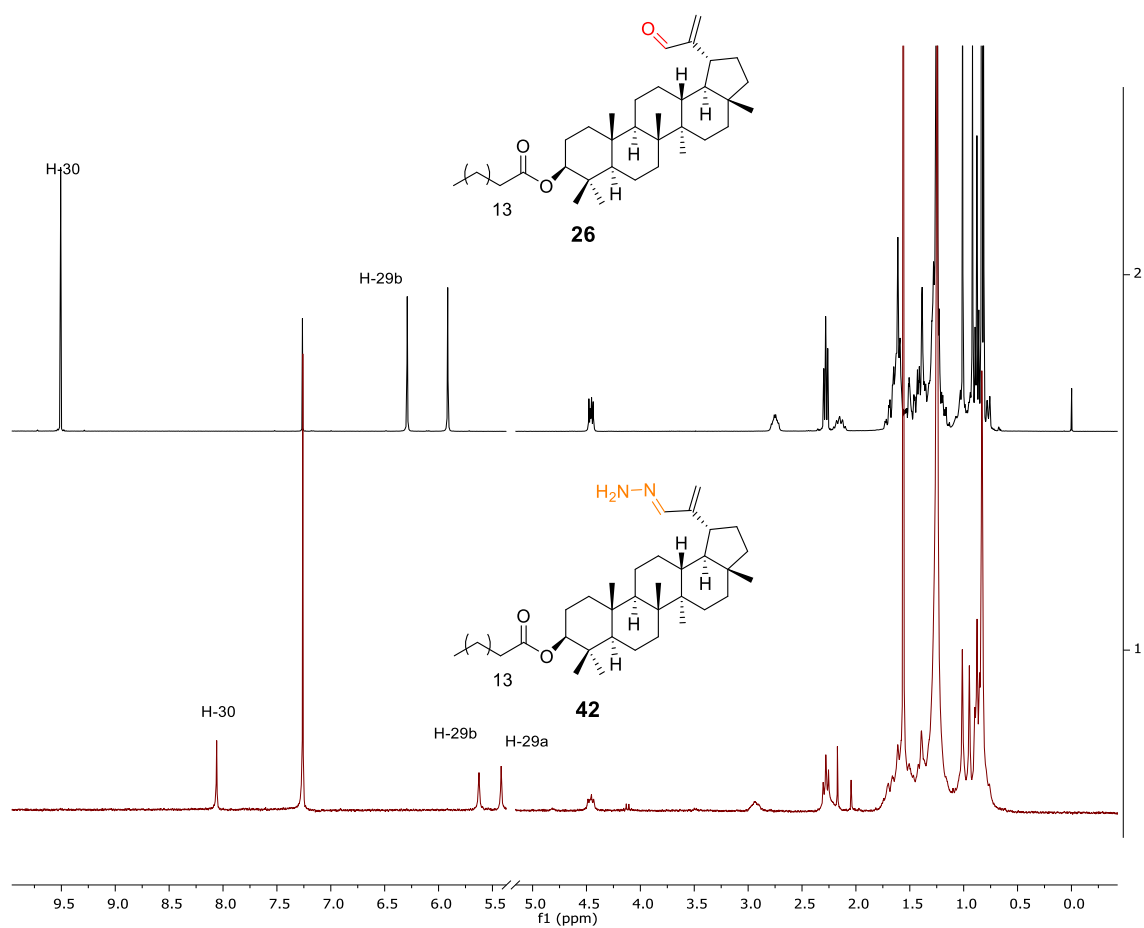
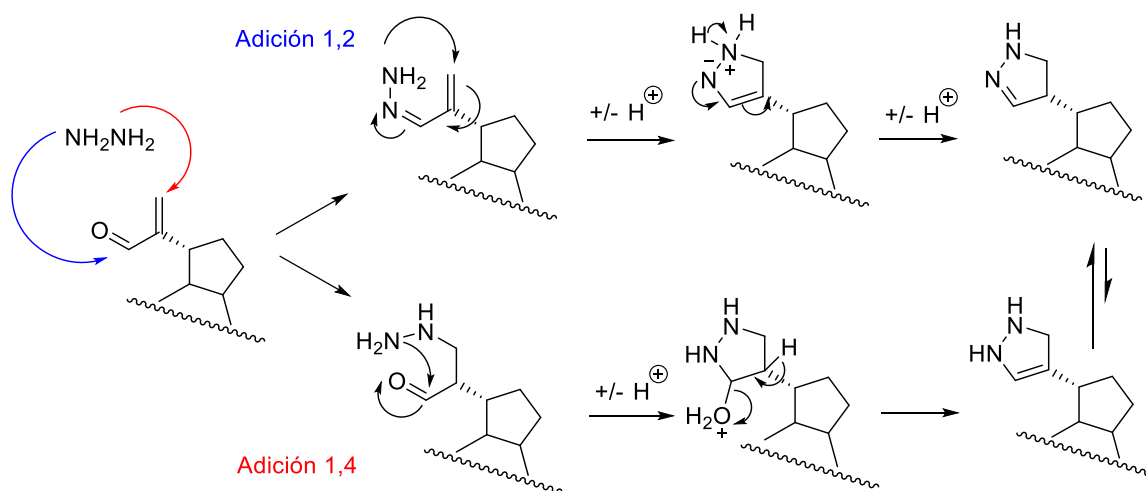


Figura 32. Espectros apilados de los compuestos **26** y **42** en donde se compara el desplazamiento de H-30.

Respecto al mecanismo de formación de pirazolinas, bajo las condiciones exploradas (Tabla 10), se ha aceptado que puede llevarse a cabo en dos pasos, a través de la formación de intermediarios producto de la adición 1,2 o 1,4 de la hidrazina al sistema α,β -insaturado como se muestra en el Esquema 9. Lo anterior dependerá de los sustituyentes del sistema α,β -insaturado y de las condiciones de reacción.

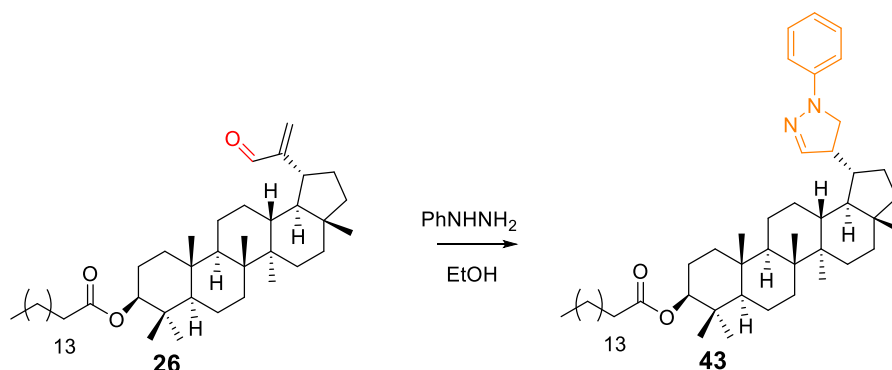


Esquema 9. Mecanismos propuestos para la síntesis de 2-pirazolinas.

En este caso, se esperaba que la reacción de síntesis de pirazolinas procediera mediante la adición nucleofílica de la hidrazina al carbonilo (adición 1,2) seguida de la eliminación de agua para obtener la hidrazona intermediaria que para formar un ciclo llevaría a cabo un ataque nucleófilo sobre el carbono C-29.¹¹⁶ Sin embargo la hidrazona **42** obtenida no se ciclizó. En la literatura se encuentra informado que algunas hidrazonas con la configuración *Z* dan origen a las pirazolinas, en contraste con sus análogas *E*, con las que en algunos casos la reacción no procede.¹⁴³ Otro factor importante es que generalmente se emplean sistemas α,β -insaturados más activados con arilmetilenos que confieren mayor estabilidad a las pirazolinas.¹⁴⁹

6.2.2.2 Reacción del aldehído 26 con PhNHNH₂

En este caso se exploró la reactividad del aldehído α, β -insaturado frente a fenilhidrazina en medio ácido para la síntesis de fenilpirazolininas (Esquema 10).



Esquema 10. Intento de preparación de la fenilpirazolina (**43**).

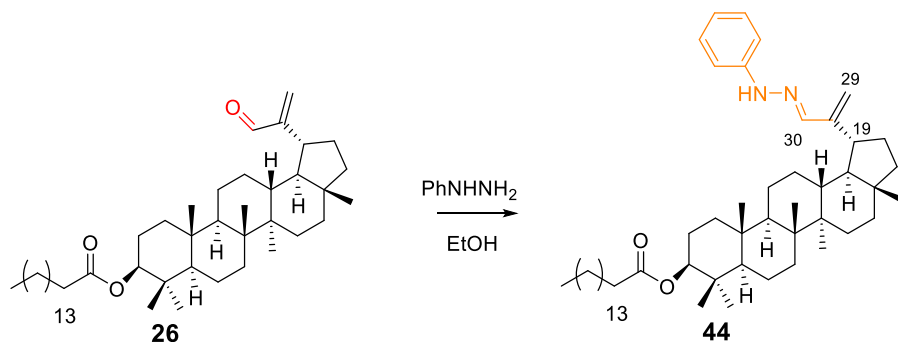
Tabla 11. Condiciones para la obtención de **43**.

Calentamiento	Reactivos	Condiciones	Observación
1) M. O	PhNHNH ₂ + <i>p</i> -TsOH	100 °C, 20 min	Mezcla compleja
2) Convencional	PhNHNH ₂ + <i>p</i> -TsOH	Reflujo, 4 h	Mezcla compleja
3)Convencional	PhNHNH ₂ + <i>p</i> -TsOH	25 °C, 2 h	n.r.
4) M. O	PhNHNH ₂ ·HCl	100 °C, 20 min	Mezcla compleja
5) M. O	PhNHNH ₂ ·HCl	80 °C, 10 min	44 , 67 %

n.r.: no reaccionó. M.O: microondas

Como se observa en la Tabla 11, sólo las condiciones del ensayo 5, que implican calentamiento a una menor temperatura y menor tiempo permitieron obtener la fenilhidrazona **44**. La mezcla compleja observada en otras condiciones responde, presumiblemente, a la inestabilidad de las pirazolininas a altas temperaturas y a la autooxidación de las pirazolininas a pirazoles.¹⁵⁰

La adición 1,2 de la fenilhidrazina al carbonilo α, β -insaturado de **26**, condujo a la hidrazona **44** como se observa en el Esquema 11:



Esquema 11. Preparación de la hidrazona del 30-oxo-palmitato de lupeólo (**44**).

El derivado **44** obtenido está constituido por 52 carbonos (Espectro 12) lo que es consistente con la fórmula molecular $C_{52}H_{84}N_2O_2$. En el espectro RMN 1H (Espectro 11) se observan las señales atribuidas al aldehído **44** con excepción de la señal simple en δ_H 7.36, que integra para un hidrógeno, asignada al metino en C-30 y también se observan dos señales simples en δ_H 5.27 (Hb) y 5.04 (Ha), correspondientes a los hidrógenos vinylicos en C-29. La comparación de los espectros de RMN 1H de la materia prima y la hidrazona se observa en la Figura 33:

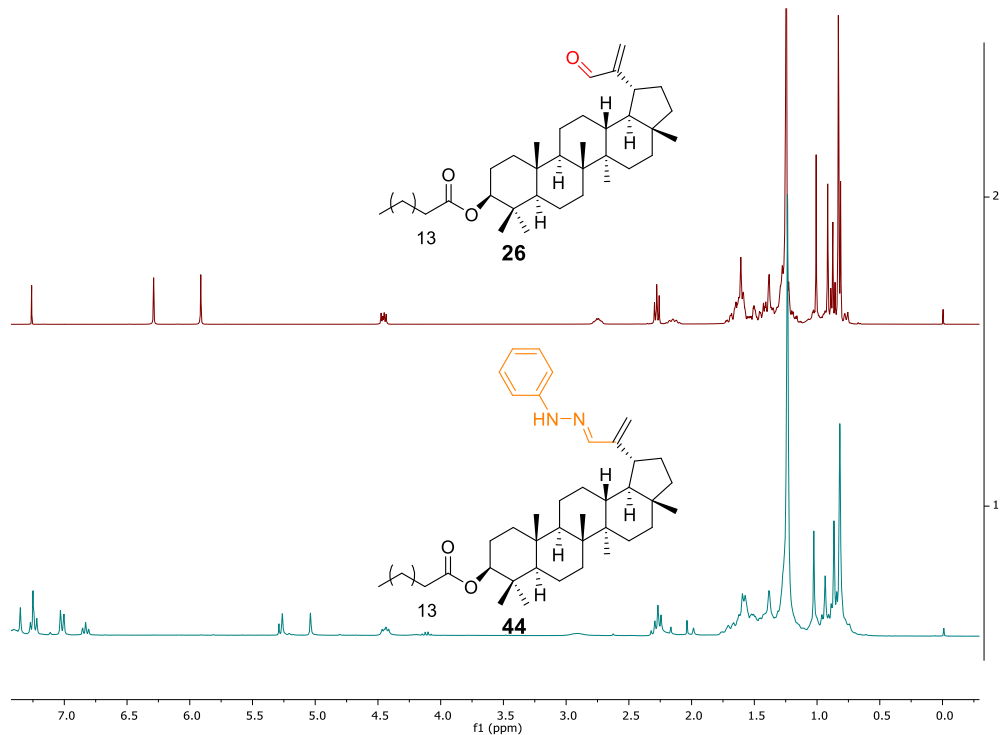
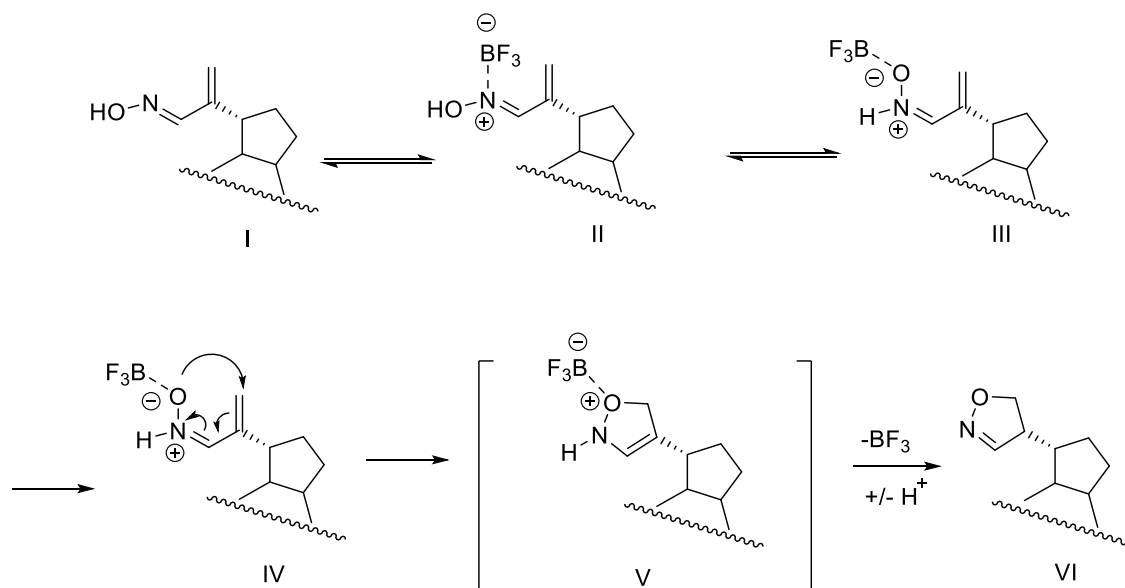


Figura 33. Espectros apilados de los compuestos **26** y **44**.

6.2.3 Reacción del aldehído 26 con NH_2OH

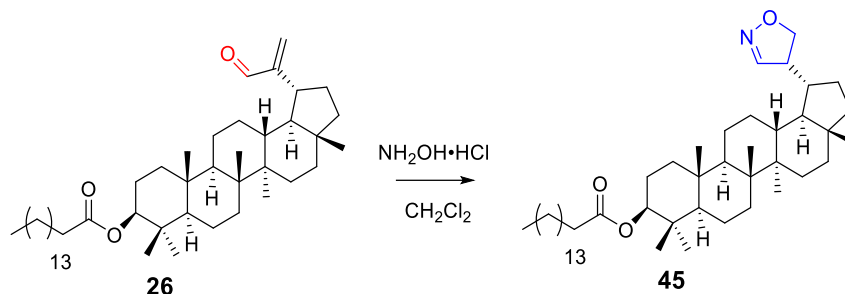
Una de las metodologías empleadas para la síntesis de isoxazolininas se basa en la reacción de hidroxilamina sobre carbonilos α,β -insaturados.¹⁵¹ En la literatura existen varios ejemplos en los cuales la reacción se lleva a cabo en condiciones de reflujo en etanol,¹⁵² estas condiciones ya habían sido exploradas en un trabajo previo y sólo condujeron a la obtención de las oximas correspondientes.¹⁰¹

El uso catalítico de un ácido de Lewis, en la síntesis de isoxazolininas, representa la aplicación de condiciones suaves de reacción, que generalmente favorecen la formación del anillo.¹⁵³ Como se observa en el Esquema 12, el ácido de Lewis, en este caso éterato de trifluoruro de boro (BF_3OEt_2) se compleja con el nitrógeno de la oxima (II) lo que genera la nitrona intermediaria que sufre una isomerización adicional, que implica un intercambio de protón y BF_3 entre los átomos de nitrógeno y oxígeno (III), en estos casos, el carácter asincrónico del proceso de adición entre la nitrona y el alqueno (IV) se ve mejorado debido al aumento del carácter nucleofílico del oxígeno, lo que permite la obtención la isoxazolinina (VI).¹⁵⁴



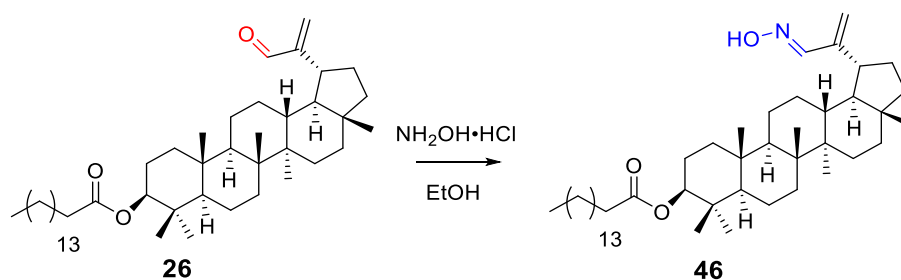
Esquema 12. Mecanismo propuesto para la formación de 2-isoxazolininas catalizada por un ácido de Lewis.

Dentro del marco de la exploración de la reactividad del sistema α,β -insaturado del triterpeno para la formación de la isoxazolina¹⁵⁴ **45** (Esquema 13), tras la adición catalítica de BF_3OEt_2 a temperatura ambiente, no se obtuvo el heterociclo **45**.



Esquema 13. Intento de preparación de isoxazolina **45**.

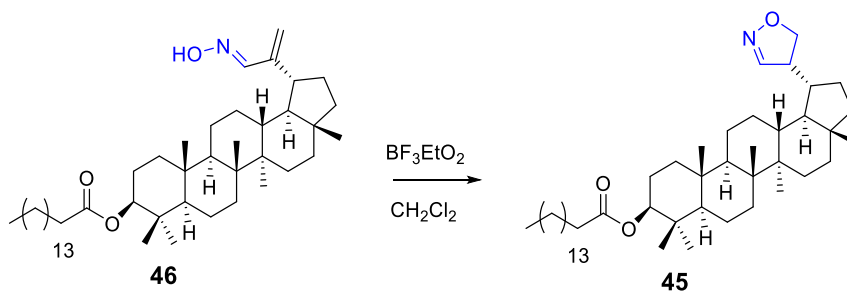
Con la base en el resultado anterior, se decidió llevar a cabo inicialmente la formación de la oxima **46** (Esquema 14) y su posterior ciclación (Esquema 15).



Esquema 14. Preparación de la oxima **46**.

Tabla 12. Condiciones para la obtención de **46**.

Calentamiento	Condiciones	Rendimiento
Microondas	90 °C, 10 min	95 %



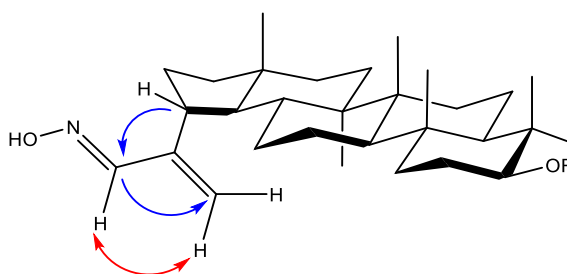
Esquema 15. Intento de preparación de la isoxazolina **45**.

Tabla 13. Condiciones para la obtención de **45**.

Condiciones	Observación
1) 25 °C, 6 h	
2) 40 °C, 26 h	
3) 70 °C (M.O), 20 min	n.r
4) 75 °C (M.O), 20 min	

n.r: no reaccionó. M.O: microondas

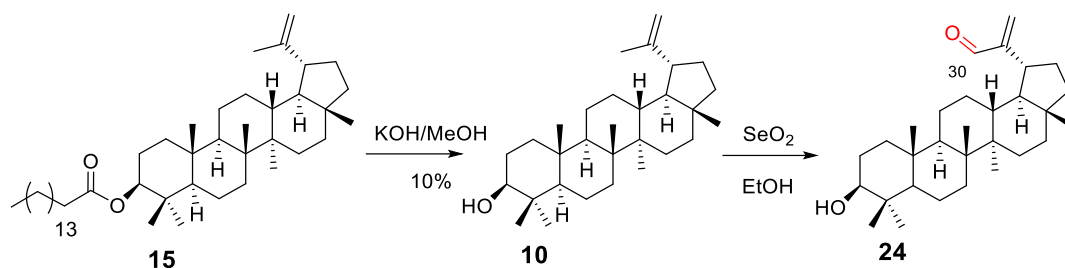
En este caso se puede inferir que los requerimientos configuracionales fueron determinantes,¹⁵⁵ ya que bajo las condiciones de reacción ensayadas no se obtuvo el producto deseado, la 2-isoxazolina (**45**), debido presumiblemente la configuración *E* de la oxima (Esquema 16) no favorece la formación del anillo, por la falta de proximidad de los fragmentos reaccionantes.^{154,153}



Esquema 16. Correlaciones selectas **NOESY** y **HMBC** de H-30, compuesto **46**.

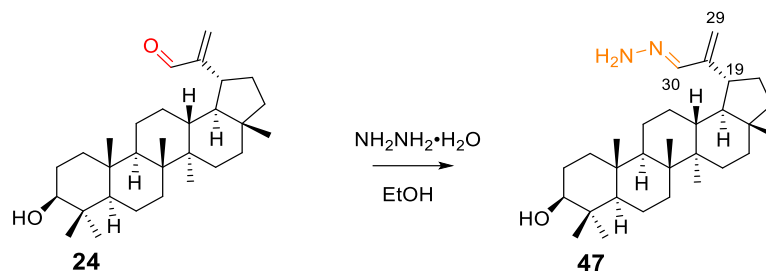
6.2.4 Preparación de 30-azoderivados a partir de lupeol (10)

Como se observa en el Esquema 17, a partir del palmitato de lupeño (15) se obtuvo lupeol (10), mediante una hidrólisis básica, posteriormente el lupeol se oxidó en la posición 30, para obtener el aldehído 24 que es la materia prima para obtener 30-azoderivados análogos a los obtenidos a partir de 15.



Esquema 17. Preparación de 30-oxo-lupeol (24) a partir de 15.

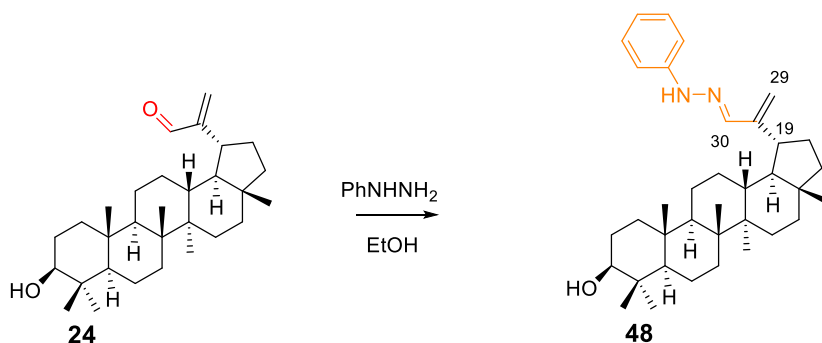
6.2.4.1 Reacción del aldehído 24 con NH₂NH₂



Esquema 18. Preparación de la hidrazona del 30-oxo-lupeol (47).

La hidrazona del 30-oxo-lupeol (47) (Esquema 18), se obtuvo de manera análoga a la hidrazona derivada de 30-oxo-palmitato de lupeño (42), descrito con anterioridad (ver parte experimental, Espectro 13).

6.2.4.2 Reacción del aldehído 24 con PhNHNH₂

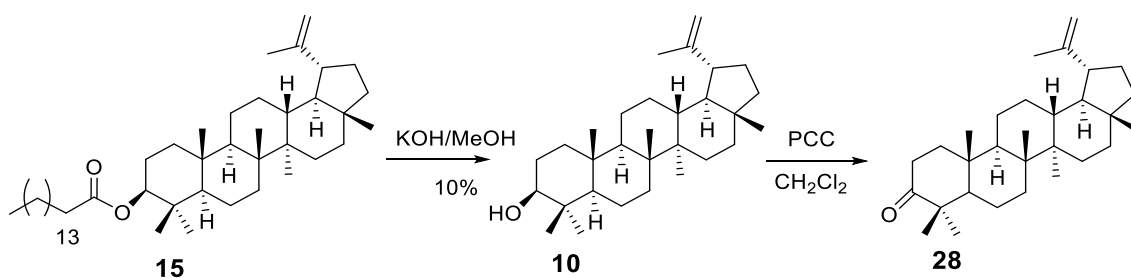


Esquema 19. Preparación de la fenilhidrazona del 30-oxo-lupeol (**48**).

La fenilhidrazona del 30-oxo-lupeol (**48**) (Esquema 19) se obtuvo mediante el procedimiento descrito con anterioridad para el 30-oxo-palmitato de lupeño (**44**). (Ver parte experimental, Espectro 14).

6.2.5 Pirazina derivada de lupeol (**10**)

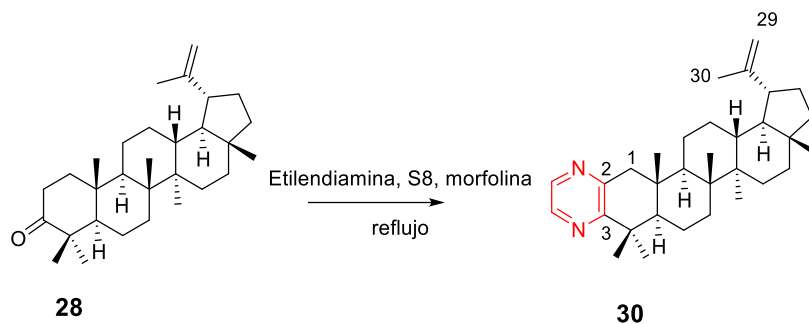
Se llevó a cabo la secuencia de reacciones que se muestra en el Esquema 20, la cual permitió obtener la lupenona (**28**) que es la materia prima para obtener el derivado pirazino.



Esquema 20. Preparación de lupenona (**28**) a partir de **15**.

6.2.5.1 Pirazina derivada del palmitato de lupeól (15)

La obtención de la pirazina **30** se llevó a cabo bajo las condiciones de la reacción Willgerodt – Kindler¹⁴² que se muestra en el Esquema 21:



Esquema 21. Preparación de la pirazina **30**.

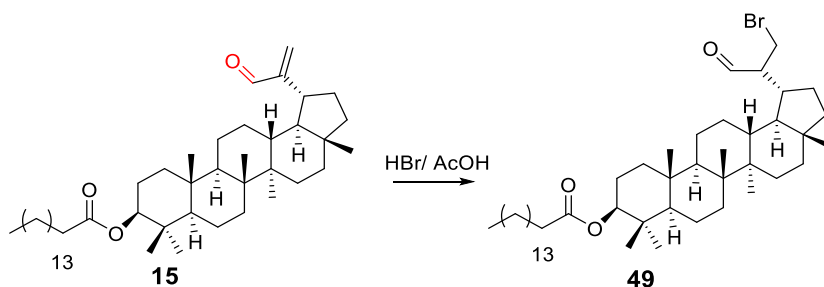
El derivado **30** está constituido por 32 carbonos (Espectro 16) y es consistente con la fórmula molecular $C_{32}H_{48}N_2$. En el espectro de RMN 1H (Espectro 15) se observan dos señales de hidrógenos aromáticos en δ_H 8.41 y en δ_H 8.27 que forman un sistema tipo AB, se observa la correlación de estos protones en el espectro de HSQC con los carbonos en δ_C 142.43 y en δ_C 141.47 que son señales típicas de las pirazinas 2,3 disustituídas; complementariamente se observan las señales de los carbonos C-2 y C-3 en δ_C 150.99 y en δ_C 159.93, respectivamente. En el espectro de RMN 1H se observan dos señales dobles ($J = 16.5$ Hz) en δ_H 3.03 y en δ_H 2.45 que integran cada una para un hidrógeno, que forman un sistema tipo AB, ambas señales presentaron correlación en el espectro de HSQC con la señal en δ_C 48.77 por lo que fueron asignadas a los protones diasterotópicos del metileno C-1, que por la presencia del heterociclo se desplaza a mayor frecuencia respecto a la señal para el mismo carbono de la materia prima (**28**).

En el espectro de RMN 1H se observa una señal doble de triples en δ_H 2.39 ($J = 10.5$ y 5.4 Hz), que integra para un hidrógeno, y en el espectro de HSQC correlaciona con δ_C 48.11 (C-19). También se observan una señal doble en δ_H 4.71 ($J = 2.3$ Hz) (Hb) y una señal múltiple en δ_H 4.60 (Ha), que integran cada una para un hidrógeno, correspondientes a los hidrógenos vinílicos asignadas al metileno C-29 por su correlación en el espectro de HSQC con la señal en δ_C 109.61.

6.2.6 Reacción del aldehído 15 con HBr

Los compuestos carbonílicos β -halogenados son intermediarios ampliamente utilizados, susceptibles a reacciones de sustitución que favorecen la síntesis de heterociclos.¹⁵⁶

La hidrobromación de olefinas generalmente se lleva a cabo por dos mecanismos en competencia:¹⁵⁷ La vía polar a través del carbocatión más estable que típicamente resulta en el producto con orientación Markovnikov, y la vía radicalaria a través del radical más estable, lo que resulta en el producto con la orientación anti-Markovnikov, esta última en disolventes apolares en presencia de radicales libres.¹⁵⁸ Recientemente se informó la hidrobromación selectiva anti-Markovnikov directa de alquenos terminales alifáticos y, por primera vez, alquenos aromáticos en ausencia de un iniciador de radicales libres, lo que condujo a la aplicación de condiciones simples (retomadas de Sherril¹⁵⁹), poco frecuentes, escalables y de alto rendimiento para esta reacción.¹⁶⁰ Con base en lo anterior se exploraron las condiciones de reacción que se muestran en la Tabla 14 (Esquema 22):



Esquema 22. Preparación de β -bromoderivado 49.

Tabla 14. Condiciones para la obtención de 49*

Disolvente	Temperatura	Observación
1) Hexano	0°C	
2) Tolueno	0°C	
3) Tolueno	Reflujo	No reaccionó
4) CCl ₄	0°C	
5) CCl ₄	Reflujo	

*Tiempo de reacción: 24 h

Las condiciones de reacción de Sherril¹⁵⁹ (HBr en ácido acético y *n*-hexano) también se han aplicado en otros sistemas α,β -insaturados monosustituídos en donde se ha llevado a cabo la adición anti-Markovnikov esperada,¹⁶¹ de acuerdo al mecanismo radicalario,¹⁶² basado en las condiciones experimentales informadas que indican el paso de aire (burbujeo) por el disolvente, lo que sugiere que el O₂ disuelto inicia la producción de radicales.¹⁶⁰ Sin embargo, en algunos casos se ha considerado que estas condiciones no son reproducibles.¹⁶² Tal es el presente caso, en donde no se observó la transformación deseada.

Con base en la no obtención del β -bromoderivado **49**, se decidió llevar a cabo la reacción en presencia de un iniciador de radicales libres. Tras la adición catalítica de peróxido de benzoilo y el azobisisobutironitrilo, en CCl₄ a reflujo durante 8 horas, se obtuvieron rendimientos bajos (de 11 y 22 %, respectivamente), del aldehído bromado **49**, presumiblemente por la competencia de las vías radicalaria e iónica, ya que se observó la presencia de varios subproductos en el monitoreo del crudo de reacción (ccf), aunado a la inestabilidad del derivado.

6.2.7 *N*-acetilpirazolininas

Por otra parte, con base en los resultados descritos en el presente trabajo, que permitieron concluir que la reactividad de los aldehídos α,β -insaturados frente a hidrazinas en las condiciones ensayadas no permitió la obtención de 2-pirazolininas (Ver Tablas 10 y 11), se decidió explorar un procedimiento alternativo.

En la literatura se encuentran informadas pirazolininas derivadas de esteroides, tanto con *N*-alquilo como con sustituyentes aromáticos en las posiciones 3 y/o 5 del heterociclo.^{163,164} Las estructuras **50-52** constituyen algunos ejemplos (Figura 34).

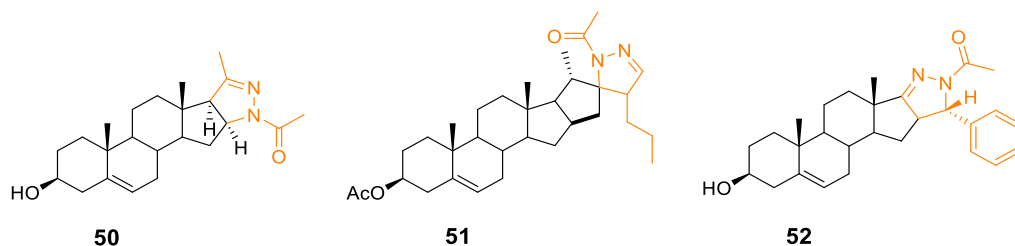
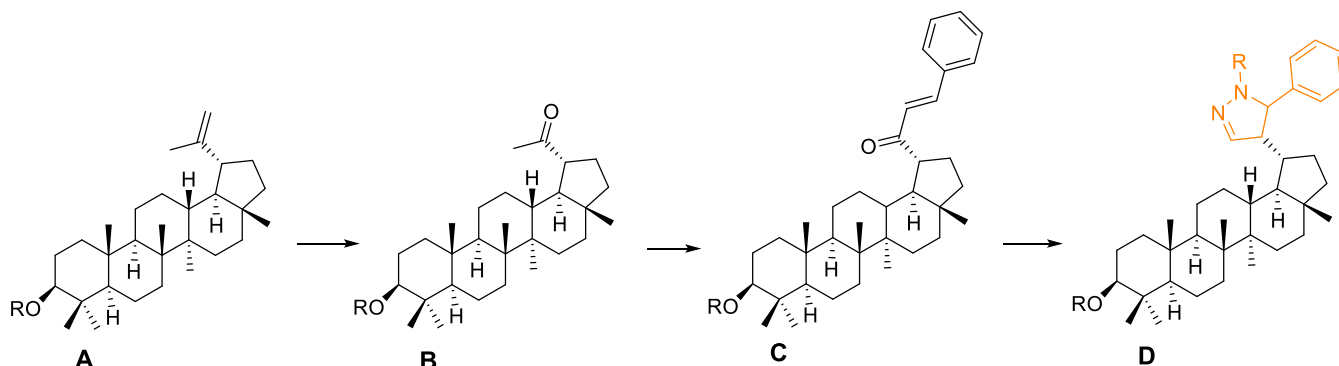


Figura 34. Ejemplos de *N*-acetilpirazolininas derivadas de esteroides.

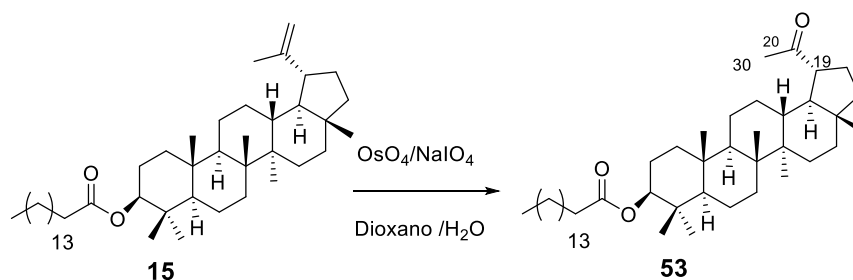
Por lo tanto, se planteó que a partir de la materia prima **A**, mediante una ruptura oxidativa de la olefina, se obtendría la cetona **B**, la cual, mediante una condensación aldólica con benzaldehído, conduciría al bencilidenderivado **C**. La reacción de **C** con hidrato de hidrazina en ácido acético permitiría obtener las respectivas *N*-acetilpirazolinas **D**, como se muestra en el Esquema 23:



Esquema 23. Esquema sintético para la obtención de *N*-acetilpirazolinas.

6.2.7.1 Ruptura oxidativa de C20-C29 del palmitato de lupeól (15)

Para la obtención de la cetona en la posición C-20 se llevó a cabo la escisión de la olefina utilizando OsO_4 y NaIO_4 ; ésta reacción se conoce como oxidación de Lemieux-Johnson.¹⁶⁵ La reacción procede en dos etapas; primero el tetraóxido de osmio lleva a cabo la dihidroxilación del alqueno, y, posteriormente, se lleva a cabo la ruptura del glicol (reacción de Malaprade)¹⁶⁶ por el peryodato de sodio.



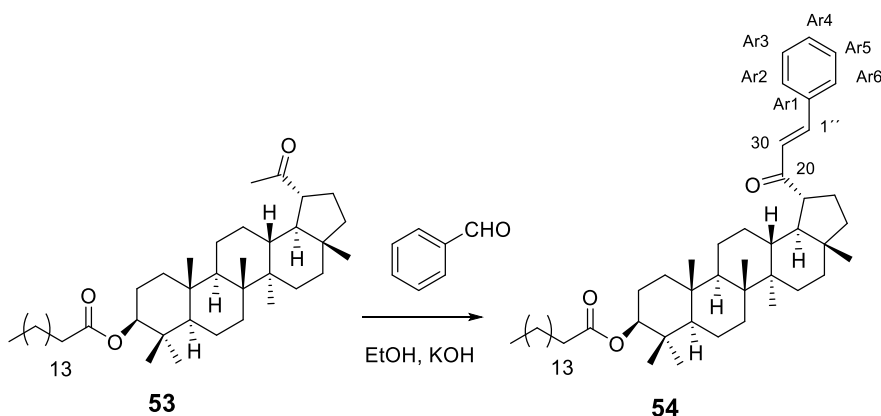
Esquema 24. Preparación de la cetona **53**.

La ruptura oxidativa del palmitato de lupeól (**15**) (Esquema 24)¹⁶⁷ condujo a la obtención del derivado **53** que está constituido por 45 carbonos (Espectro 18), lo que es

consistente con la fórmula molecular $C_{45}H_{78}O_3$ la cual se estableció con base en su espectro de masas de alta resolución. En el espectro de RMN ^{13}C (Espectro 18) se observa una señal en δ_C 213.01 asignada al carbono del carbonilo C-20. La señal simple observada en el espectro de RMN 1H (Espectro 17) en δ_H 2.1, que integra para tres protones, presentó correlación en el espectro de HSQC con la señal en δ_C 29.16 por lo que fue asignada al metilo C-30, esta señal también correlacionó en el espectro de HMBC con las señales en δ_C 213.01 y en δ_C 52.88, correspondientes a C-20 y C-19, respectivamente. Debido a que sólo se modificaron las posiciones C-29- C-30 de la materia prima **15**, las señales del esqueleto del triterpeno se mantuvieron prácticamente inalteradas.

6.2.7.2 Condensación aldólica entre la cetona **53** y benzaldehído

En secuencia con el Esquema 23, se llevó a cabo la condensación aldólica entre el palmitato de 29-nor-20-lupeílo (**53**) y benzaldehído.



Esquema 25. Preparación de la enona **54**.

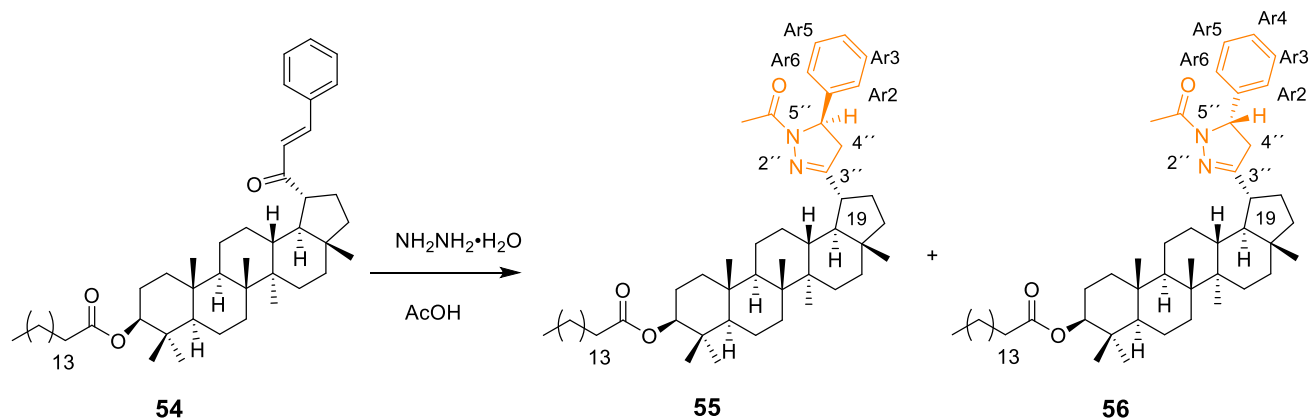
La condensación aldólica (Esquema 25) permitió obtener el bencilidenderivado **54** que está constituido por 52 carbonos (Espectro 20) lo que es consistente con la fórmula $C_{52}H_{82}O_3$ la cual se estableció con base en su espectro de masas de alta resolución. En el espectro de RMN 1H (Espectro 19) se observan dos señales dobles en δ_H 7.64 ($J = 16.2$ Hz) y en δ_H 6.94 ($J = 16.2$ Hz) que integran cada una para un hidrógeno vinílico, asignadas a los protones H-1'' y H-30, estas señales presentaron correlación en el espectro de HSQC con los carbonos en

δ_C 142.58 y en δ_C 127.58 respectivamente. El valor de la constante de acoplamiento ($J = 16.2$ Hz) indica la configuración *E* del doble enlace, esperable con base en que los arimetilenos en esa disposición están más favorecidos termodinámicamente y menos impedidos estéricamente.¹⁶⁸

Las señales correspondientes a los protones del grupo fenilo se observan como una señal múltiple en δ_H 7.70, que integra para dos protones, y correlaciona en el espectro de HSQC con los carbonos en δ_C 129.19 (C-Ar2 y C-Ar6) y la señal múltiple en δ_H 7.43, que integra para tres protones, y correlaciona en el espectro de HSQC con los carbonos en δ_C 129.80 (C-Ar3 y C-Ar5) y δ_C 131.04 (C-Ar4).

6.2.7.3 Reacción entre la enona **54** y NH_2NH_2 . Formación de *N*-acetilpirazolininas

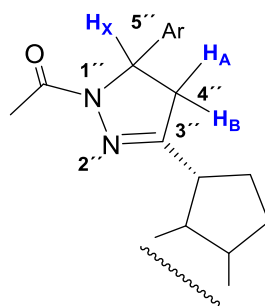
La ciclocondensación de arilcetonas α,β -insaturadas con hidrazinas es una metodología empleada para obtener 5-arilpirazolininas, que generalmente se lleva a cabo en etanol. Sin embargo, muchos artículos informan que bajo las condiciones anteriores no se han obtenido los heterociclos deseados debido a la inestabilidad de las pirazolininas.¹⁶⁹⁻¹⁶³ Al llevar a cabo la reacción en ácido acético se obtienen las *N*-acetilpirazolininas que son más estables.¹⁷⁰



Esquema 26. Preparación de las *N*-acetilpirazolininas **55** y **56**.

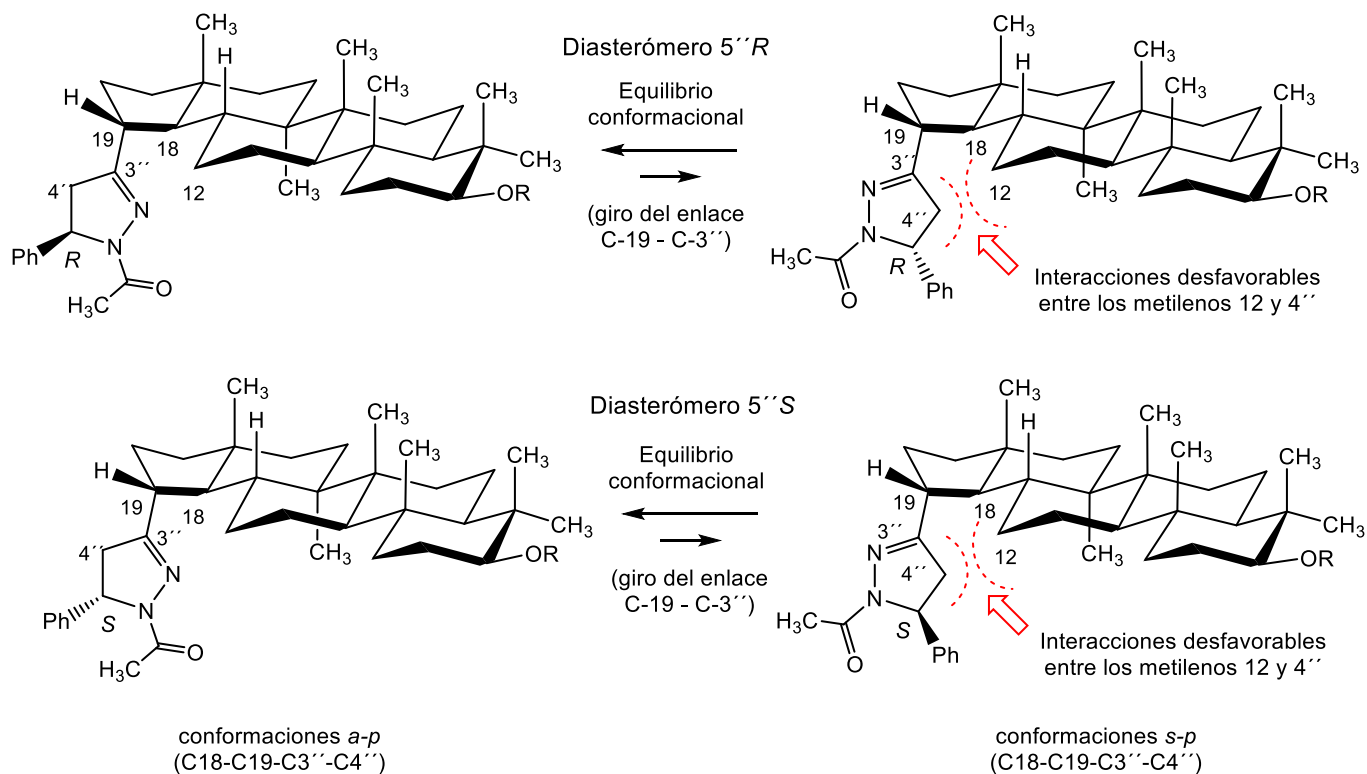
El avance de la transformación fue monitoreado por ccf. La reacción tardó 24 h en completarse bajo reflujo y se observó la presencia de dos productos. Las manchas fueron distinguibles ($R_f = 0.20$ y 0.14) en el sistema eluyente *n*-Hex: AcOEt (9:1).

Los espectros de RMN ^1H de los epímeros **55** y **56** mostraron un perfil característico del sistema ABX generado por los protones del metileno en la posición C-4'' y el protón del metino en la posición C-5'' del anillo de pirazolina (Esquema 27).



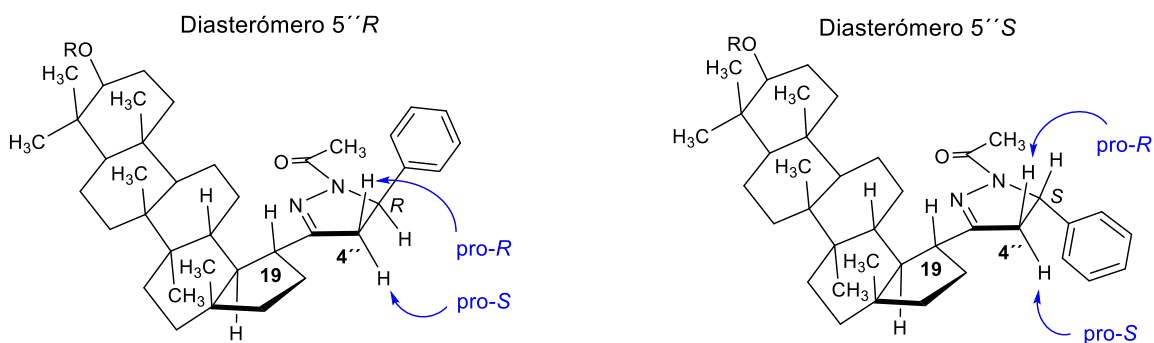
Esquema 27. Fragmento estructural que genera al sistema ABX de las *N*-acetilpirazolininas.

Con el objetivo de definir la configuración (*R*-, *S*-) en el centro quiral C-5'' (dados los dos conjuntos de datos físicos y espectroscópicos obtenidos, uno para cada diastereómero), es necesario, inicialmente, establecer la conformación preferida de los derivados, dado que existe rotación (libre giro) a lo largo del enlace σ entre C-19 y C-3'' en ambas sustancias. La rigidez del triterpeno pentacíclico y la orientación α - de la pirazolina unida en C-19 permite identificar la existencia de dos conformaciones extremas: (a) aquella en que el enlace C-19-C1-8 se encuentra en disposición *anti-periplanar* con el enlace C-3''-C-4'', y (b) la conformación en que el enlace C-19-C18 se encuentra en disposición *syn-periplanar* con el enlace C-3''-C-4''. El equilibrio entre ambas conformaciones para cada uno de los dos diastereómeros (C-5''*R*- y C-5''*S*-) se muestra en el Esquema 28. El escrutinio de ambas conformaciones permite identificar que en la conformación *syn-periplanar* existen interacciones estéricas desfavorables entre los metilenos C-12 y C-4'', las cuales no existen en la conformación *anti-periplanar*. Cabe señalar que esta identificación está basada en la evidencia de que el volumen del nitrógeno N2'' es menor al del metileno C-4''.



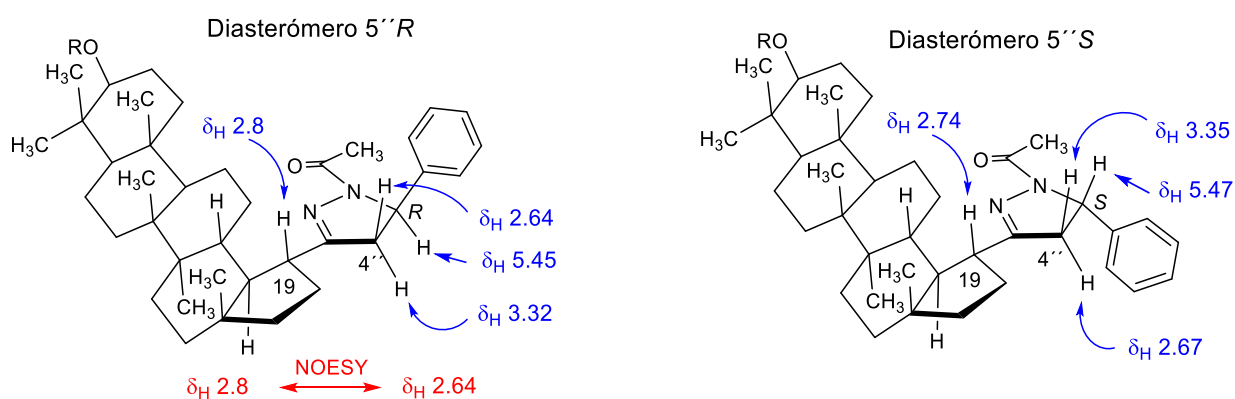
Esquema 28. Equilibrio conformacional de los diastereómeros 5''R (**55**) y 5''S (**56**).

Los hidrógenos diastereotópicos en C4'' se denominan, de acuerdo con su orientación como *pro-R* y *pro-S*. En el diastereómero 5''R el hidrógeno *pro-R* se encuentra *cis*- al fenilo, mientras que en el diastereómero 5''S, el hidrógeno *pro-S* es el que se encuentra *cis*- al grupo aromático (Esquema 29).

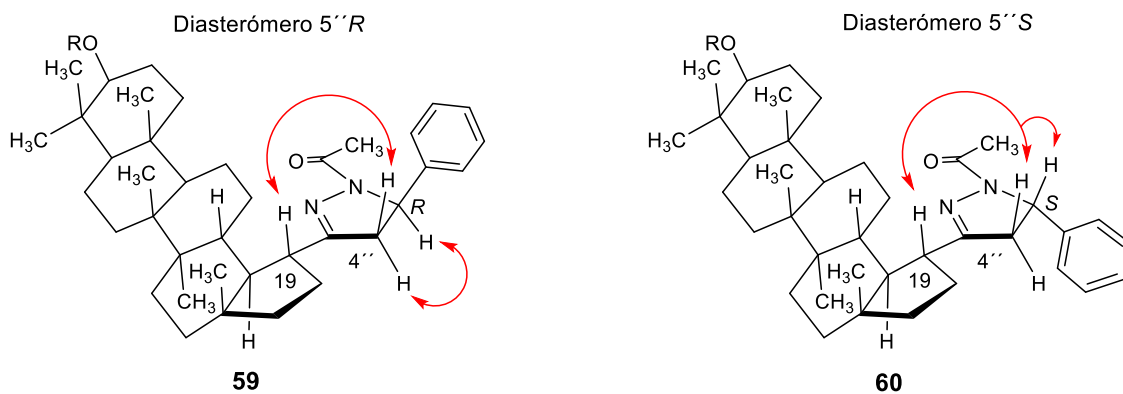


Esquema 29. Denominación de los hidrógenos diastereotópicos en C4'' de los diastereómeros 5''R (**55**) y 5''S (**56**).

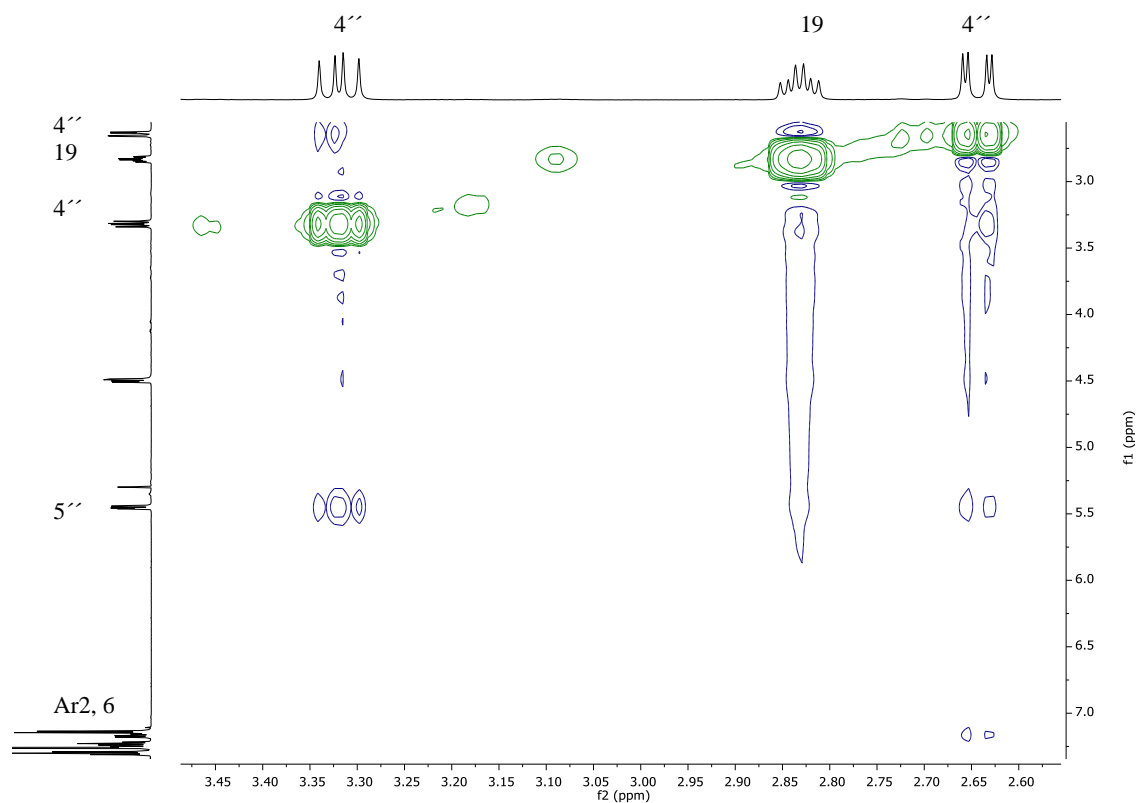
El trazo de los espectros de RMN ^1H (Figuras 35 y 36) muestra la diferencia en los desplazamientos químicos de los hidrógenos diasterotópicos del metileno C-4''. La señal doble de dobles en menor frecuencia es atribuible al protón H-4'' que se ubica con orientación *cis*- al aromático, debido al efecto protector que ejerce el fenilo. Esta asignación está de acuerdo con las constantes de acoplamiento observadas, ya que los protones geminales en C-4'', tienen una constante de acoplamiento grande ($J_{\text{proR-proS}} = 17.7 \text{ Hz}$), en ambos epímeros, mientras que las constantes vecinales son de menor valor. La constante vecinal del acoplamiento del protón H-4'' más protegido con el protón H-5'' es de un valor menor ($J_{\text{proR-H5''}} = 3.9 \text{ Hz}$ para el diasterómero 5''*R*; $J_{\text{proS-H5''}} = 4.4 \text{ Hz}$ para el diasterómero 5''*S*) respecto a la constante vecinal del acoplamiento del protón H-4'' menos protegido con el protón H-5'' ($J_{\text{proS-H5''}} = 11.6 \text{ Hz}$ para el diasterómero 5''*R*; $J_{\text{proR-H5''}} = 11.6 \text{ Hz}$ para el diasterómero 5''*S*), lo cual es consistente con que la constante vecinal *cis*- es de mayor magnitud que la constante de acoplamiento *trans*- en el anillo de 5 miembros, por lo que los datos observados pueden asignarse como se muestra en el Esquema 30. Tales asignaciones se confirman con el efecto NOESY intenso que se observa en el espectro correspondiente entre los hidrógenos H-19 y el H-pro*R* de C-4'' y se muestran en el Esquema 31.



Esquema 30. Comparación de los desplazamientos químicos de los hidrógenos 19, 4'' y 5'' de los diasterómeros 5''*R* (55) y 5''*S* (56).



Esquema 31. Correlaciones selectas NOESY de diasterómeros 5''R (**55**) y 5''S (**56**).



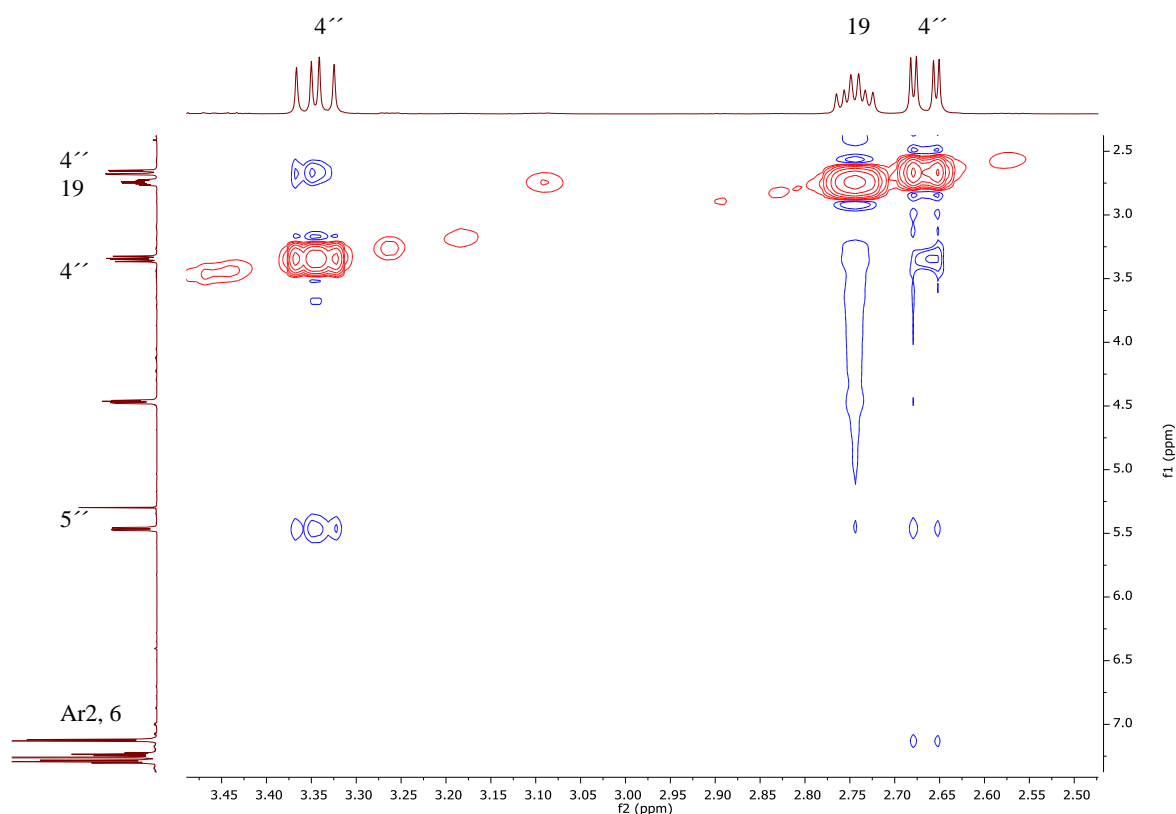


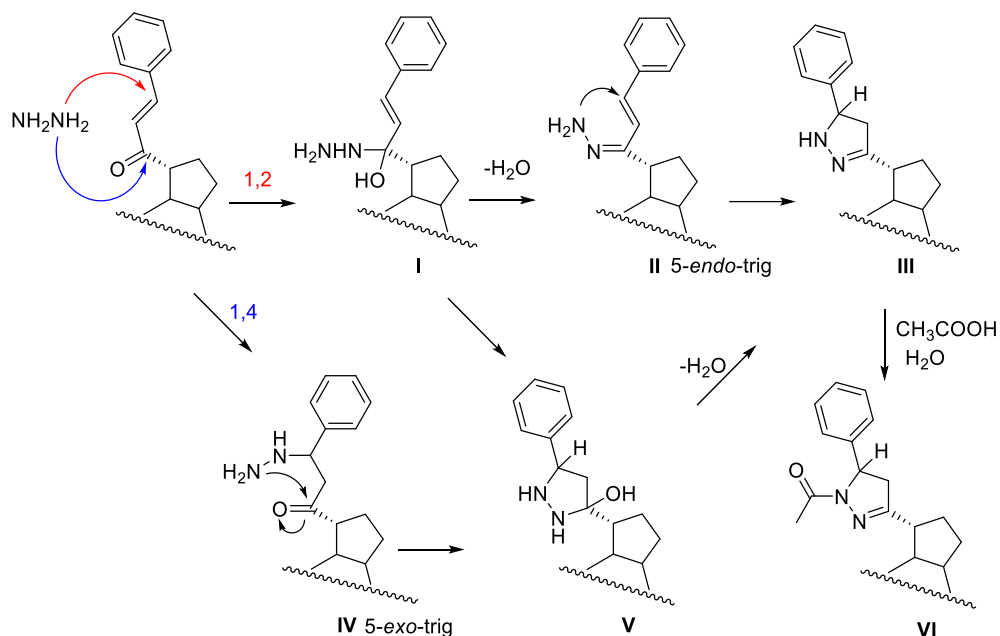
Figura 36. Espectro NOESY, diasterómero 5''S (**56**).

En el espectro en el IR del epímero 5''R (**55**), $R_f = 0.2$, en *n*-Hex: AcOEt (9:1), se observan las bandas en 1720 y 1646 cm^{-1} asignadas al carbonilo del éster y al carbonilo del *N*-acetilo respectivamente. En el espectro de RMN ^{13}C (Espectro 22) se observa una señal en $\delta_{\text{C}} 163.95$ (C-3''), que fue asignada a dicha posición con base en su desplazamiento y a la correlación observada en el espectro HMBC con el protón H-19 ($\delta_{\text{H}} 2.8$). En el espectro de RMN ^1H (Espectro 21) se observan dos señales dobles de dobles en $\delta_{\text{H}} 2.64$ ($J = 17.7, 3.9$ Hz) y en $\delta_{\text{H}} 3.32$ ($J = 17.7, 11.6$ Hz) que integran para un protón cada una, asignadas a los protones del metileno C-4'' del anillo de pirazolina con base en su correlación en el espectro de HSQC con el carbono en $\delta_{\text{C}} 42.20$ y las correlaciones observadas en el espectro de HMBC con el carbono cuaternario en $\delta_{\text{C}} 163.95$ (C-3''), el carbono en $\delta_{\text{C}} 59.14$ (C-5'') y el carbono aromático en $\delta_{\text{C}} 142.20$ (C-Ar1). En el espectro de RMN ^1H también se observa una señal doble de dobles en $\delta_{\text{H}} 5.45$ ($J = 11.3, 3.8$ Hz) asignada al metino C-5'' que correlaciona en el espectro de HSQC con la señal en $\delta_{\text{C}} 59.14$ y en el espectro HMBC se puede observar su

correlación con δ_C 42.20 (C-4'), δ_C 142.20 (C-Ar1) y δ_C 125.42 (C-Ar2,6). La señal en δ_C 168.28 fue asignada con base en su desplazamiento al carbono del carbonilo del *N*-acetilo. La señal simple en δ_H 2.28, que integra para tres protones, correlacionó en el espectro de HSQC con el carbono en δ_C 22.10 y en el espectro de HMBC con la señal en δ_C 168.28 por lo que se asignó a los protones del metilo del *N*-acetilo.

En el espectro en el IR del epímero 5''S (**56**), $R_f = 0.14$, en *n*-Hex: AcOEt (9:1), se observan las bandas en 1720 y 1646 cm^{-1} asignadas al carbonilo del éster y al carbonilo de *N*-acetilo respectivamente. En el espectro de RMN ^{13}C (Espectro 24) se observa una señal en δ_C 163.94 (C-3'), que fue asignada a dicha posición con base en su desplazamiento y a la correlación observada en el espectro HMBC con el protón H-19 (δ_H 2.74). En el espectro de RMN ^1H (Espectro 23) se observan dos señales dobles en δ_H 2.67 ($J = 17.7, 4.4$ Hz) y en δ_H 3.35 ($J = 17.7, 11.6$ Hz) que integran para un proton cada una, asignadas a los protones del metileno C-4'' del anillo de pirazolina con base en su correlación en el espectro de HSQC con el carbono en δ_C 42.44 y las correlaciones observadas en el espectro de HMBC con el carbono cuaternario en δ_C 163.94 (C-3''), el carbono en δ_C 59.11 (C-5'') y el carbono aromático en δ_C 142.03 (C-Ar1). En el espectro de RMN ^1H también se observa una señal doble de dobles en δ_H 5.47 ($J = 11.3, 4.3$ Hz) asignada al metino C-5'' que correlaciona en el espectro de HSQC con la señal en δ_C 59.14 y en el espectro HMBC se puede observar su correlación con los carbonos en δ_C 42.44 (C-4''), en δ_C 142.03 (C-Ar1) y en δ_C 125.45 (C-Ar2,6). La señal en δ_C 168.48 fue asignada con base en su desplazamiento al carbono del carbonilo del *N*-acetilo. La señal simple en δ_H 2.32, que integra para tres protones, correlacionó en el espectro de HSQC con el carbono en δ_C 22.04 y en el espectro de HMBC con la señal en δ_C 168.48 por lo que se asignó a los protones del metilo del la *N*-acetilo

Es importante considerar que la selectividad de cetonas α,β -insaturadas con derivados de hidrazina es de particular interés, ya que estas reacciones pueden conducir a diversos productos, dependiendo de la estructura del compuesto carbonílico y de las condiciones de reacción. Con respecto al mecanismo de la reacción, en el Esquema 32 se presentan las dos posibilidades basadas en el tipo de adición 1,2 o 1,4 de la hidrazina al sistema α,β -insaturado.



Esquema 32. Mecanismos propuestos para la formación de *N*-acetilpirazolinas.

Al respecto de la adición 1,2, el ataque nucleofílico del nitrógeno de la hidrazina tiene lugar en el grupo carbonilo de la enona y se forma el intermediario I, posteriormente la eliminación de una molécula de agua genera la hidrazona II y finalmente la adición intramolecular del nitrógeno de la hidrazona al carbono C-1'' de la olefina conduce a la pirazolina III. El mecanismo anterior permite explicar la formación de los epímeros 5''*R* y 5''*S* como consecuencia de la adición del nitrógeno de la hidrazona al carbono C-1'' de la olefina que puede ser por la cara α o β . El aislamiento de las hidrazonas intermediarias muchas veces es la evidencia de que la formación de la pirazolininas procedió bajo este mecanismo.^{145,164,171}

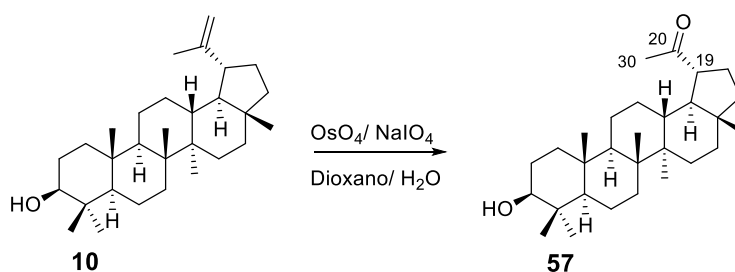
Al respecto de la adición 1,4 (tipo Michael) de la hidrazina al alqueno, en la literatura se menciona que se necesitan condiciones experimentales especiales (adición de piperidina), para que se lleve a cabo,¹⁷² sin embargo, con base en las reglas de Baldwin,¹⁷³ la formación de pirazolininas que involucran un cierre de anillo 5-*exo*-trigonal se prefiere sobre aquellas que involucra un cierre 5-*endo*-trigonal.¹⁷⁴ En este caso el ataque nucleofílico del nitrógeno de la hidrazina sobre la olefina, por la cara α o β , define la quiralidad en el C-5'' (intermediario IV) posteriormente la adición nucleofílica al carbonilo genera el intermediario

hidroxipirazolidina V que con la eliminación de una molécula de agua conduce a la pirazolina III. Este mecanismo ha sido propuesto para la formación de estos heterociclos en sistemas tipo chalcona.^{175,176}

6.2.8 *N*-acetilpirazolininas derivadas de lupeol (10)

Con base en el esquema sintético 23, se obtuvieron los análogos intermediarios para la síntesis de las *N*-acetilpirazolininas derivadas del lupeol.

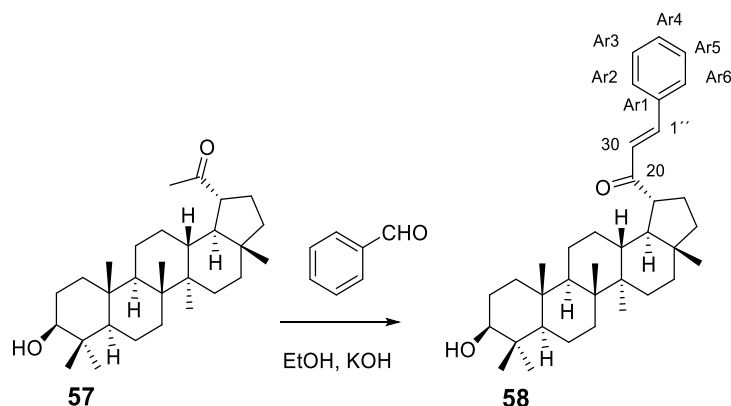
6.2.8.1 Ruptura oxidativa de C20-C29 de lupeol (10)



Esquema 33. Preparación de la cetona **57**.

La ruptura oxidativa del lupeol (**10**), condujo a la obtención del derivado **57** (Esquema 33). En el espectro de RMN ¹³C se observa una señal en δ_C 213.10 asignada al carbono del carbonilo C-20. La señal simple observada en el espectro de RMN ¹H en δ_H 2.15, que integra para tres protones, presentó correlación en el espectro de HSQC con la señal en δ_C 29.32 por lo que fue asignada al metilo C-30. La señal simple de la metil cetona también correlacionó en el espectro de HMBC con las señales en δ_C 213.10 (C-20) y en δ_C 52.76 (C-19). Debido a que sólo se modificaron las posiciones C-29- C-30 de la materia prima **15**, las señales del esqueleto base se mantuvieron prácticamente inalteradas. En δ_H 3.18 se observa un doble de dobles ($J = 11.3, 5.0$ Hz) que integra para un hidrógeno de C-3 (δ_C 79.05); los metilos δ_H 1.01, 0.96, 0.94, 0.82, 0.77, 0.75 se observan como señales simples correspondientes a los metilos de las posiciones 26, 23, 27, 25, 28 y 24, respectivamente; estos datos espectroscópicos fueron consistentes con lo informado en la literatura.¹⁷⁷

6.2.8.2 Condensación aldólica entre la cetona **57** y benzaldehído

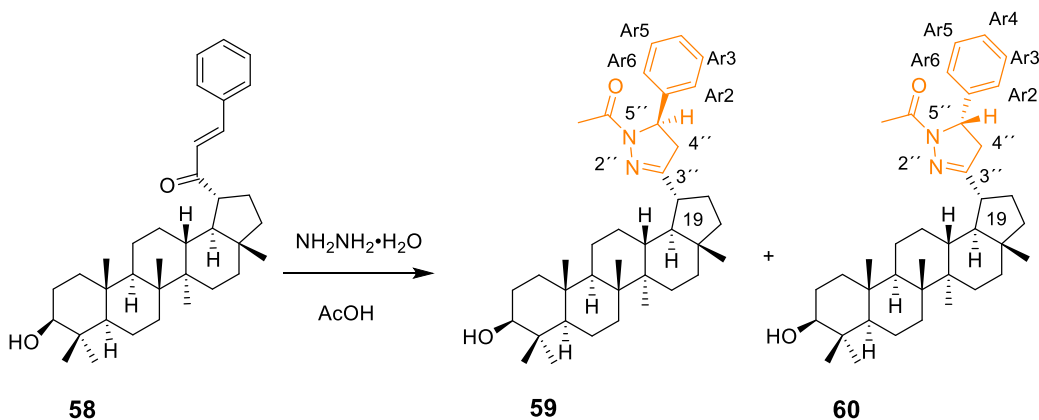


Esquema 34. Preparación de la enona **58**.

La condensación aldólica (Esquema 34) permitió obtener el bencilidenderivado **58** que está constituido por 36 carbonos (Espectro 26) lo que es consistente con la fórmula C₃₆H₅₂O₂ la cual se estableció con base en su espectro de masas de alta resolución. En el espectro de RMN ¹H (Espectro 25) se observan dos señales dobles en δ_H 7.53 (*J* = 15.8 Hz) y en δ_H 6.78 (*J* = 16.1 Hz) que integran cada una para un hidrógeno vinílico, asignadas a los protones H-1' y H-30 respectivamente, estas señales presentaron correlación en el espectro de HSQC con los carbonos en δ_C 142.39 (C-1') y en δ_C 126.43 (C-30).

Las señales correspondientes a los protones del grupo fenilo se observan como una señal múltiple en δ_H 7.54 que correlaciona en el espectro de HSQC con los carbonos en δ_C 128.45 (C-Ar2 y C-Ar6), y la señal múltiple en δ_H 7.38 que correlaciona en el espectro HSQC con los carbonos en δ_C 129.06 (C-Ar3 y C-Ar5) y δ_C 130.46 (C-Ar4). Debido a que sólo se modificaron las posiciones C-29 y C-30 de la materia prima, las señales del esqueleto base se mantuvieron prácticamente constantes.

6.2.8.1 Reacción entre la enona **58** y NH_2NH_2 . Formación de *N*-acetilpirazolinas



Esquema 35. Preparación de las *N*-acetilpirazolinas **59** y **60**.

La reacción del bencilidenderivado **58** con hidrazina en ácido acético (Esquema 35) permitió obtener la mezcla de los diastereómeros **59** y **60**. En comparación con los diastereómeros esterificados, **55** y **56** (que fue posible separar mediante cromatografía en capa fina), en este caso en la cromatoplaqa analítica sólo se observó una mancha que no fue posible separar con los diferentes sistemas de elución ensayados. Lo anterior es consistente con lo informado en la literatura, donde se reportan ejemplos de obtención de mezclas diastereoméricas de esteroides de difícil separación, algunas de las cuales pudieron separarse mediante reacciones adicionales.¹⁶⁴

En el espectro de RMN de ^1H del crudo de reacción (Espectro 27) se observan las señales de los protones que forman el sistema ABX asignados a los protones del anillo de pirazolina de los epímeros obtenidos. Las señales múltiples en δ_{H} 2.69 y en δ_{H} 3.35 corresponden a los protones del metileno C-4'' y la señal múltiple en δ_{H} 5.47 corresponde al metino C-5''. La señal simple en δ_{H} 2.32 fue asignada a los protones del metilo del *N*-acetilo del heterociclo.

La resolución de los diastereómeros **59** y **60** fue posible mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), y como se observa en el cromatograma (Figura 37), cada epímero tuvo un tiempo de retención diferente. Mediante el análisis cuantitativo de los picos

fue posible establecer el porcentaje de cada epímero siendo de 53.02 y 46.98 % para el compuesto con mayor y menor tiempo de retención respectivamente.

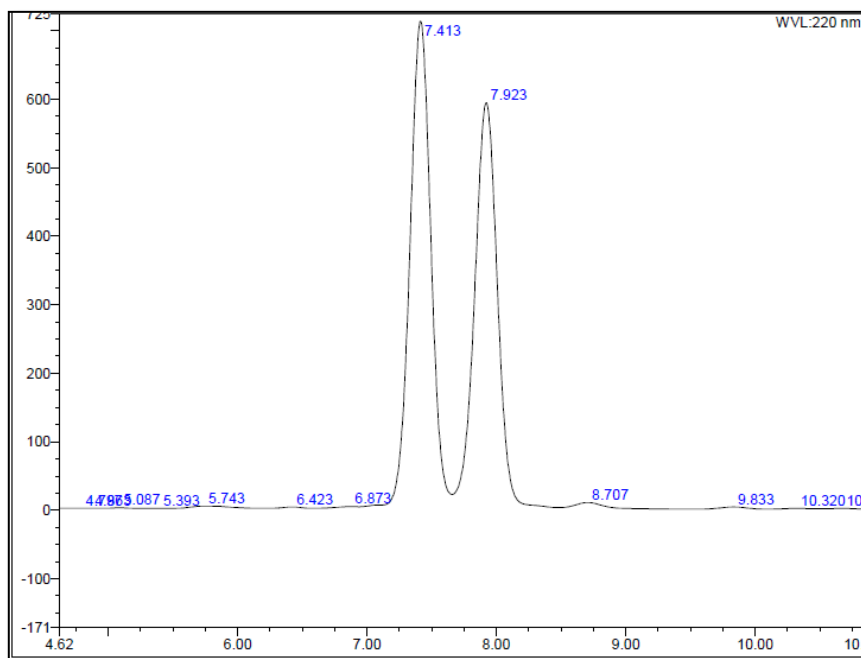
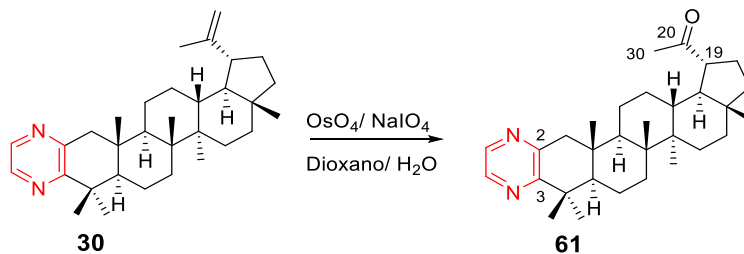


Figura 37. Cromatograma de la mezcla de **59** y **60**. Flujo: 1 mL/min Isocrático: Acetonitrilo. 35 °C, columna C-18 fase reversa (Agilent technologies 30m x 0.320 mm).

6.2.9 *N*-acetilpirazolinas derivadas de pirazina de lupeol (**30**)

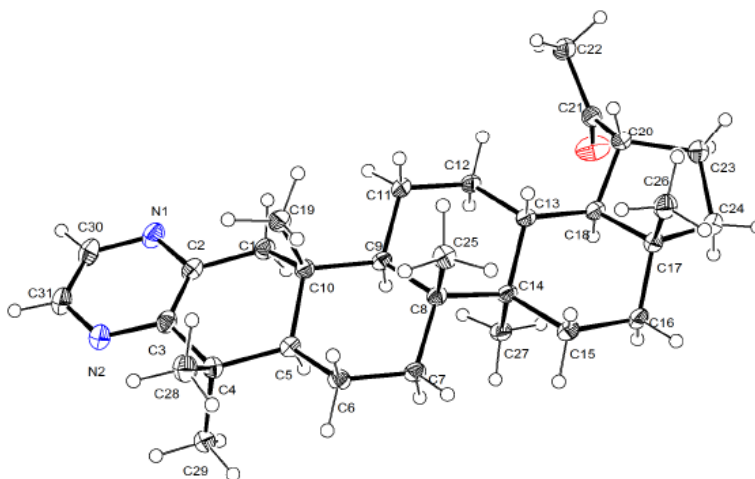
6.2.9.1 Ruptura oxidativa de C20-C29 de la pirazina de lupeol (**30**)



Esquema 36. Preparación de la cetona **61**.

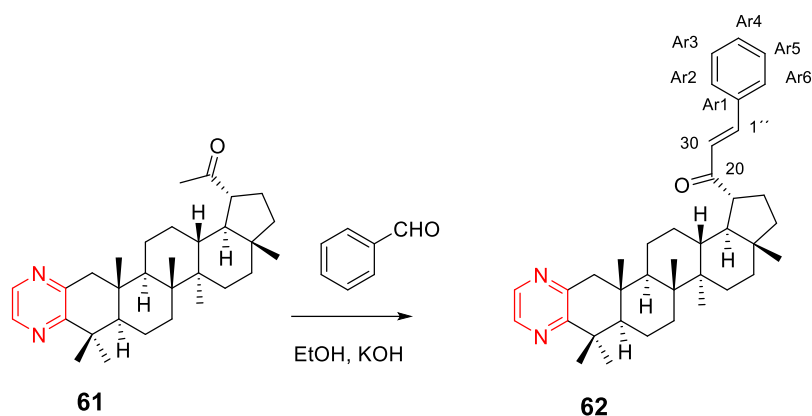
La ruptura oxidativa de la pirazina **30** (Esquema 36) condujo a la obtención del derivado **61** que está constituido por 31 carbonos (Espectro 29), lo que es consistente con la fórmula molecular $C_{31}H_{46}N_2O$ la cual se estableció con base en su espectro de masas de alta resolución. En el espectro de RMN 1H (Espectro 28) se observan dos señales de hidrógenos aromáticos en δ_H 8.40 y 8.27 que forman un sistema tipo AB. Estos protones correlacionan en el espectro de HSQC con los carbonos en δ_C 142.46 y en δ_C 141.66 que son señales características de las pirazinas 2,3 disustituídas. Complementariamente se observan las señales de los carbonos C-2 y C-3 en δ_C 150.95 y en δ_C 159.81, respectivamente. En el espectro de RMN 1H se observan dos señales dobles en δ_H 3.02 y en δ_H 2.45 ($J = 16.5$ Hz) que integran cada una para un hidrógeno, en un sistema tipo AB, ambas señales presentaron correlación en el espectro de HSQC con la señal en δ_C 48.78 por lo que fueron asignadas a los protones del metileno C-1.

Las señales observadas en los espectros de RMN 1H y RMN ^{13}C fueron consistentes con las asignadas a la pirazina 30 a excepción de la señal simple observada en el espectro de RMN 1H (Espectro 28) en δ_H 2.18, que integra para tres protones y que presentó correlación en el espectro de HSQC con la señal en δ_C 29.16 asignada al metilo C-30. La señal simple de la metil cetona también correlacionó en el espectro de HMBC con las señales en δ_C 212.92 y en δ_C 52.69, correspondientes a C-20 y C-19, respectivamente. La configuración relativa del triterpeno fue confirmada mediante el análisis por difracción de rayos X de un cristal de esta muestra (Esquema 37).



Esquema 37. Estereovista ORTEP de la pirazina **61**.

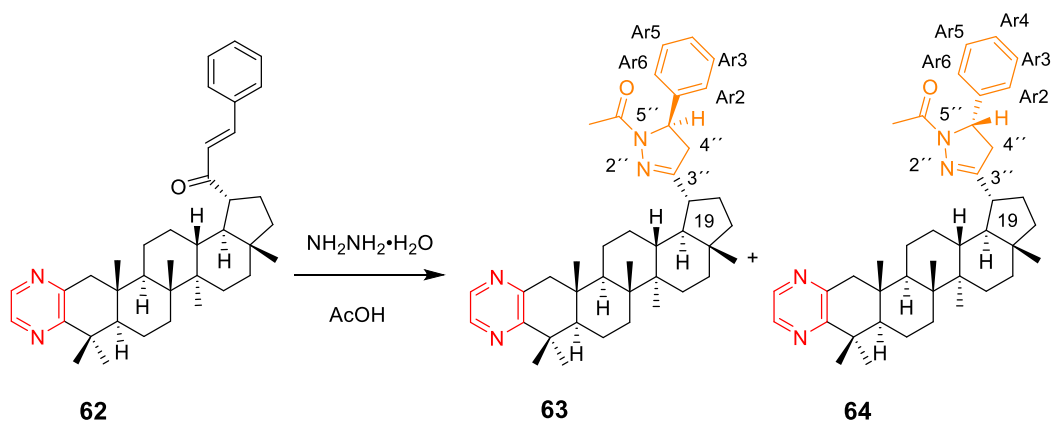
6.2.9.2 Condensación aldólica entre la cetona **61** y benzaldehído



Esquema 38. Preparación de la enona **62**.

La condensación aldólica (Esquema 38) permitió obtener el bencilidenderivado **62** que está constituido por 52 carbonos (Espectro 31) consistente con la fórmula $C_{38}H_{50}N_2O$ la cual se estableció con base en su espectro de masas de alta resolución. En el espectro de RMN 1H (Espectro 30) se observan dos señales dobles en δ_H 7.67 ($J = 16.2$ Hz) y 6.97 ($J = 16.2$ Hz) que integran cada una para un hidrógeno vinílico, asignadas a los protones H-1'' y H-30 respectivamente, estas señales correlacionaron en el espectro de HSQC con las señales en δ_C 143.19 y en δ_C 127.58 respectivamente. Las señales correspondientes a los protones del grupo fenilo se observan como una señal múltiple en δ_H 7.73 que correlaciona en el espectro de HSQC con los carbonos en δ_C 129.21 (C-Ar2 y C-Ar6) y la señal múltiple en δ_H 7.43 correlaciona en el espectro de HSQC con los carbonos en δ_C 129.82 (C-Ar3 y C-Ar5) y δ_C 131.04 (C-Ar4). Debido a que únicamente se modificaron las posiciones C-29 y C-30 de la materia prima **61**, las señales del esqueleto triterpénico se mantuvieron prácticamente constantes.

6.2.9.3 Reacción de la enona **62** con NH_2NH_2 . Formación de *N*-acetilpirazolinas

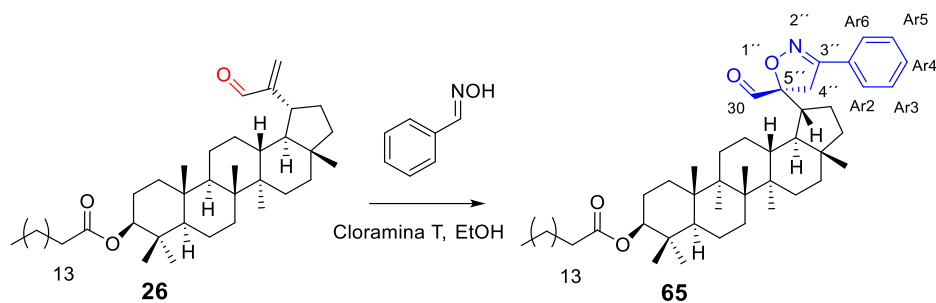


Esquema 39. Preparación de las *N*-acetilpirazolinas **63** y **64**.

La reacción del bencilidenderivado **62** con hidrazina en ácido acético (Esquema 39) permitió obtener la mezcla de los diastereómeros **63** y **64**. Al igual que los diastereómeros del lupeol **59** y **60**, en este caso en la cromatoplaaca analítica sólo se observó una mancha homogénea que no fue posible separar con los diferentes sistemas de disolventes empleados como eluyentes cromatográficos. En el espectro de RMN de ^1H del crudo de reacción (Espectro 32) se observan las señales de los protones que forman el sistema ABX asignados a los protones del anillo de pirazolina de los epímeros obtenidos. Las señales múltiples en δ_{H} 2.67 y en δ_{H} 3.38 corresponden a los protones de la posición C-4'' y la señal múltiple en δ_{H} 5.47 corresponde al metino C-5''. La señal simple en δ_{H} 2.34 fue asignada a los protones del metilo del *N*-acetilo del heterociclo. Las dos señales de hidrógenos aromáticos en δ_{H} 8.42 y en δ_{H} 8.31 corresponden al anillo de la pirazina.

6.2.10 Isoxazolina derivada de palmitato de lupeól (15)

Una de las metodologías frecuentemente utilizadas para la síntesis de isoxazolininas es mediante la cicloadición 1,3 dipolar entre óxidos de nitrilo y alquenos.¹⁷⁸

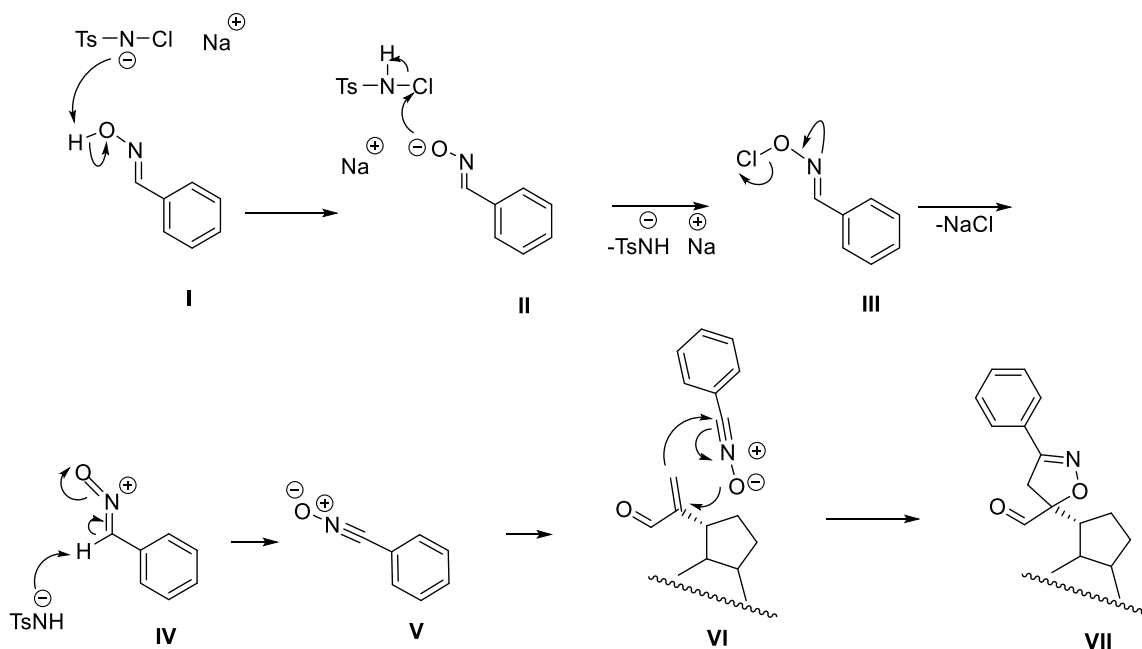


Esquema 40. Preparación de la isoxazolina **65**.

Tabla 15. Condiciones para la obtención de **65**.

Condiciones	Rendimiento
6 h, reflujo	17 %

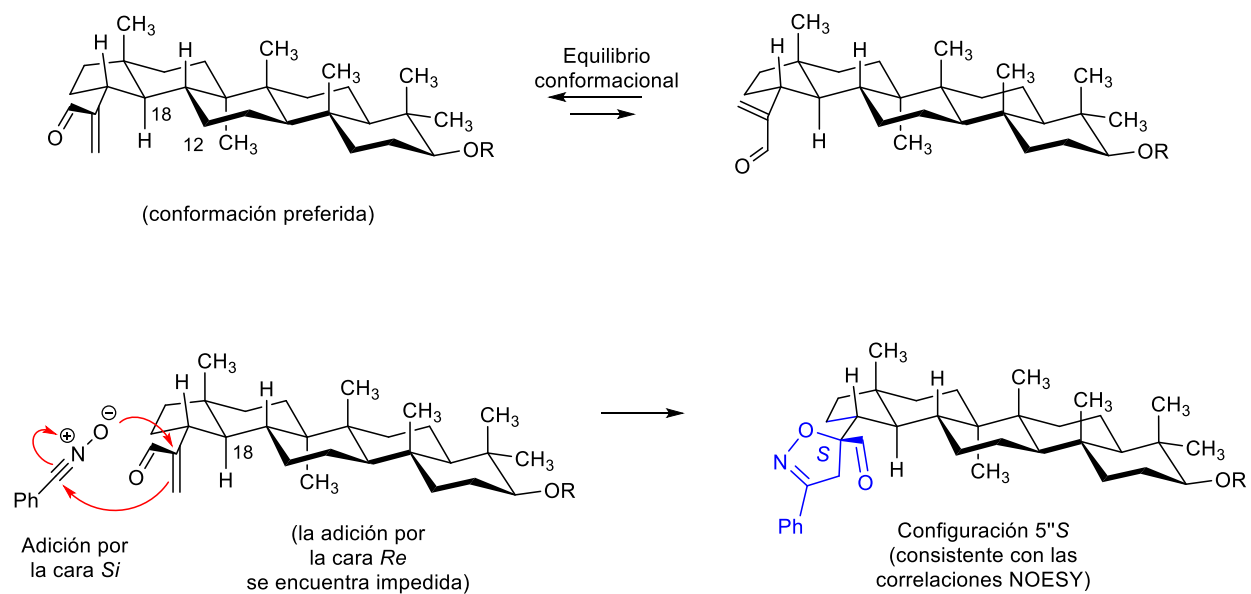
La reacción entre benzaldehído y cloruro de hidroxilamina (Esquema 40) bajo las condiciones de la Tabla 15, permitió la obtención de la benzalaldoxima, la cual en presencia de cloramina T (*N*-cloro-*N*-sodio-4-metilbencenosulfonato) en etanol, generó el óxido de nitrilo *in situ*, el cual llevó a cabo la cicloadición 1,3-dipolar con la olefina del aldehído **26** para la generación de la isoxazolina correspondiente. El mecanismo probable para esta transformación se muestra en el Esquema 41. El nitrógeno de la cloramina-T sustrae al protón de la oxima (I) que posteriormente lleva a cabo un ataque nucleofílico sobre el átomo de cloro del TsNHCl (II), y con la introducción del par de electrones del nitrógeno se elimina el cloruro (intermediario III). La abstracción de un protón del intermediario IV por la base suave TsNH⁻, que se produce en la reacción, forma óxido de nitrilo (intermediario V) que lleva a cabo la cicloadición 1,3-dipolar (VI) con la olefina del triterpeno, para formar el heterociclo VII.



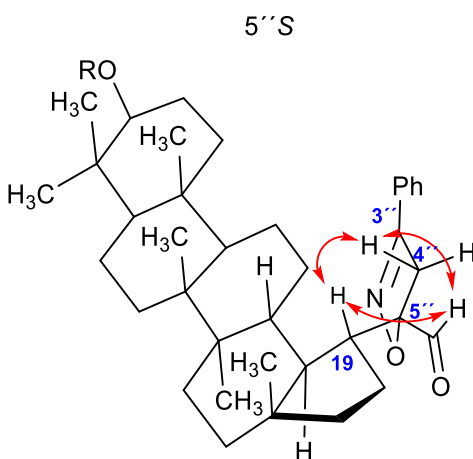
Esquema 41. Propuesta mecanística para la formación de 2-isoxazolinas catalizada por cloramina T.

En este caso, la cicloadición 1,3-dipolar procedió con *regio-* y *diastereo-* selectividad lo que condujo a un solo producto mayoritario; la 2-isoxazolina (**65**) en la que el polo aniónico del óxido de nitrilo se adicionó al carbono α al carbonilo. La regioquímica se asignó en función de los valores de desplazamiento químico de RMN de los protones de metileno C-4''.

Para definir el curso estereoquímico de la adición del óxido de nitrilo a la olefina, inicialmente se definirá la conformación preferida del fragmento de la enona (dipolarófilo) unida al pentaciclo. La rotación (libre giro) a lo largo del enlace σ entre C-19 y C-20 permite identificar a dos conformaciones extremas representadas en el Esquema 42, de las cuales puede proponerse que el grupo aldehído tiene preferencia por ubicarse hacia la parte exterior (*exo-*) del pentaciclo, ya que en este acomodo puede haber mejor superposición de los enlaces π de la enona. Así, el dipolo (óxido de nitrilo) se adiciona por la cara *Si-* del dipolarófilo (enona) generándose la isoxazolina indicada con la configuración *S* en C-5'', lo anterior se confirma con el efecto NOESY intenso que se observa en el espectro correspondiente entre los hidrógenos H-19 y el H-del aldehído y entre H-19 y el H-pro*S* de C-4'' (Esquema 43).



Esquema 42. Equilibrio conformacional de la cicloadición 1,3-dipolar del oxido de nitrilo a la olefina C20-C29 de **15**.



Esquema 43. Correlaciones selectas NOESY de (5''*S*)-2-isoxazolina (**65**).

En el espectro de RMN ^1H (Espectro 33) de la isoxazolina **65** se observa una señal simple en δ_{H} 9.57 correspondiente al hidrógeno del aldehído en C-30 (δ_{C} 195.57). El hidrógeno aldehídico correlaciona en el espectro de HMBC con el carbono cuaternario en δ_{C} 95.14 (C-5'') y con el carbono en δ_{C} 37.2 (C-4'').

En el espectro de RMN ^1H se observan dos señales dobles de dobles en δ_{H} 3.06 ($J = 16.5$ Hz) y en δ_{H} 3.76 ($J = 16.5$ Hz), que integran para un protón cada una, asignadas a los protones del metileno en C-4'' por su correlación en el espectro de HSQC con la señal en δ_{C} 37.2 y en el espectro HMBC con los carbonos en δ_{C} 95.14 (C-5''), en δ_{C} 195.57 (C-30) y en δ_{C} 157.61 (C-3'').

Las señales correspondientes a los protones del grupo fenilo se observan como una señal múltiple en δ_{H} 7.68, que integra para dos protones, y correlaciona en el espectro de HSQC con los carbonos en δ_{C} 129.97 (C-Ar2 y C-Ar6) y la señal múltiple en δ_{H} 7.39, que integra para tres protones, y correlaciona en el espectro de HSQC con los carbonos en δ_{C} 128.49 (C-Ar3-CAr5).

6.3 Evaluación de la actividad antiproliferativa celular en líneas cancerosas humanas

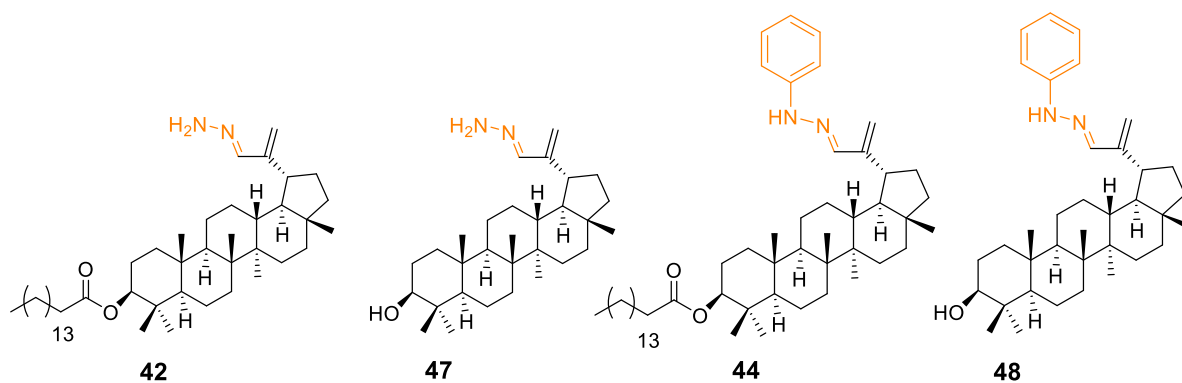
La actividad citotóxica de los derivados fue evaluada frente a las líneas celulares cancerosas U251, K562, HCT, MCF-7 y SKLU-1. Los resultados se presentan en la Tabla 16.

Tabla 16. Evaluación de actividad inhibitoria de la proliferación celular de **42, 44, 47, 48, 53-62** (25 μ M).

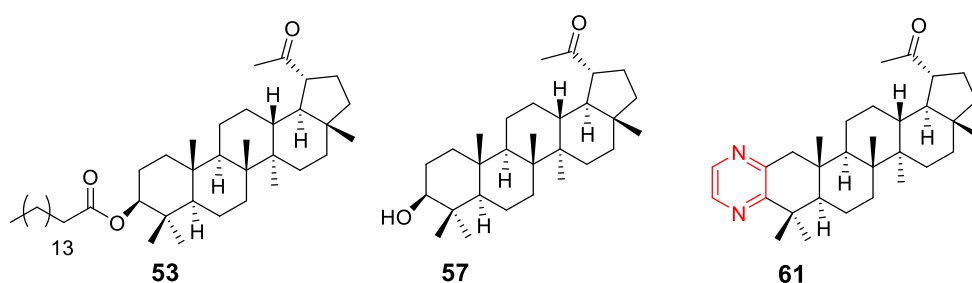
Compuesto	% de inhibición de la proliferación celular en líneas cancerosas humanas						
	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1	COS7
42	NC	16.8	15.7	NC	14.6	46.8	9.6
44	NC	11.8	5.6	NC	3.2	48.1	1.8
47	NC	17.1	NC	NC	2.2	NC	6.6
48	3.6	7.3	39.3	7.3	3.8	9.2	NC
53	NC	NC	4.1	NC	NC	NC	NC
54	3.8	22.5	NC	NC	NC	NC	NC
55	NC	3.9	32.3	NC	18.1	3.1	NC
56	NC	5.3	23.8	NC	15	3	1.2
57	8.4	NC	4.5	NC	5.7	NC	6.7
58	10.9	21.5	53.8	10.6	35.2	39.9	NC
59+60	100	100	98.3	90.7	100	100	100
61	0.5	NC	3	NC	NC	NC	8.6
62	NC	16.6	21.6	NC	NC	4.7	NC
Etopósido	91.2	40.2	91.3	81.6	57.1	80.7	70.9

Vehículo: DMSO. U251: glía de sistema nervioso central, PC-3: próstata, K562: leucemia, HCT-1: colon, MCF-7: mama, SKLU: pulmón, COS7: riñón de mono, NC: no citotóxico a la concentración evaluada.

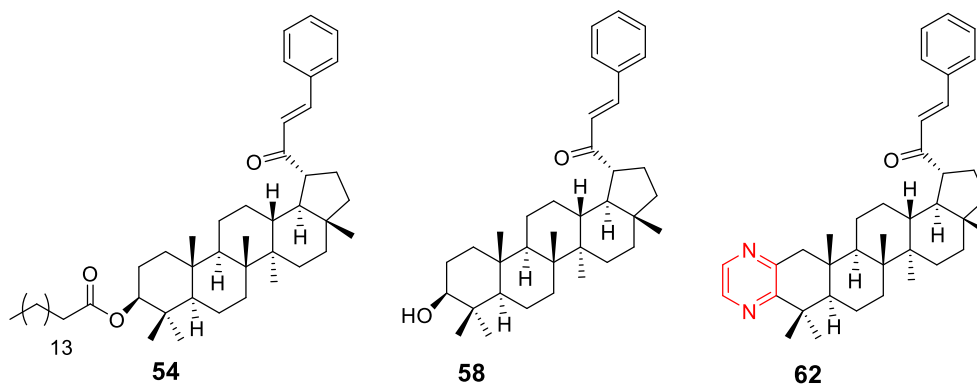
Como se observa en la Tabla 16, ninguna de las hidrazonas evaluadas (**42, 44, 47 y 48**), presenta una actividad citotóxica mayor al 50 %. La mayor inhibición se observó en la línea de pulmón (SKLU-1) para las hidrazonas **42 y 44**, en este caso el éster resulta importante para esta actividad ya que la 30-hidrazona de lupeol (**47**) y la 30-fenilhidrazona (**48**) presentan una notable disminución de la inhibición en dicha línea celular. La fenilhidrazona **48** destacó por su actividad inhibitoria en la línea de leucemia en comparación con las hidrazonas **42, 44 y 47**.



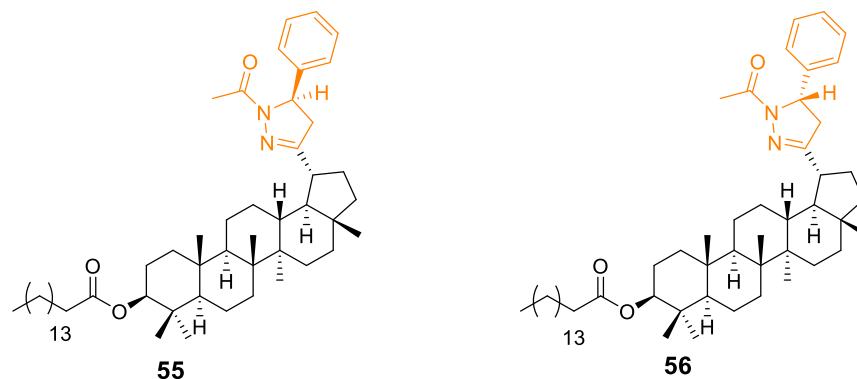
Por otra parte, la ruptura oxidativa de la olefina C20-29 condujo a las cetonas **53**, **57** y **61** que exhibieron baja actividad inhibitoria.



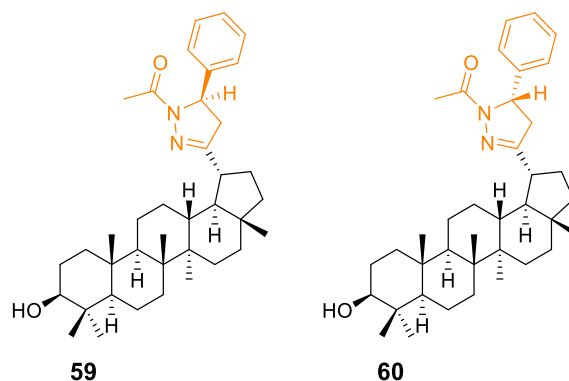
Respecto a los bencilidenderivados **54**, **58** y **62**, sólo se observó un aumento de inhibición en el compuesto **58** que presenta el hidroxilo en C-3, cuya actividad inhibitoria fue mayor que la de sus análogos en casi todas las líneas celulares, y selectiva para la línea K562 de leucemia (53.8 % de inhibición).



Las *N*-acetilpirazonas derivadas del palmitato de lupeólo (diasterómeros **55** y **56**) mostraron porcentajes de inhibición en las líneas evaluadas menores al 50 %, siendo la mayor inhibición, para ambos compuestos, la presentada en la línea de leucemia (K562, 32.3 y 23.8 %, respectivamente).



La mezcla de diasterómeros **59** y **60** presentó la mayor actividad inhibitoria entre los compuestos evaluados, aún mayor que la del etopósido (que fue el control utilizado). La comparación con la actividad de sus análogos **55** y **56** indica que el éster en la posición C-3 disminuye la actividad citotóxica. Esta observación sugiere entonces que la presencia conjunta del alcohol en C-3 y la acetilpirazolina es importante para la inhibición celular. Sin embargo, las actividades antiproliferativas de los epímeros individuales deben evaluarse, ya que pueden diferir considerablemente de su efecto citotóxico conjunto, considerando que la mezcla epimérica puede ejercer un efecto inhibitorio aditivo o sinérgico.



Con base en los resultados del cribado primario (Tabla 16), se obtuvo la concentración inhibitoria media (CI₅₀) para la mezcla de epímeros **59** y **60** (Tabla 17). Como se observa, los valores de CI₅₀ (Figura 38) son relativamente similares a los del control positivo (etopósido) en todas las líneas celulares evaluadas, y en particular, la concentración inhibitoria media para la línea de próstata (CI₅₀ 9.77 ± 0.13 μM), es tres veces menor que la del etopósido (31.47±2.2 μM), lo cual constituye un resultado sobresaliente, ya que no es frecuente encontrar valores de mayor bioactividad con respecto a la sustancia de referencia positiva.

Tabla 17. CI₅₀ de la mezcla epimérica **59** + **60**.

	CI ₅₀ (μM)					
	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1
59+60	13.53±0.72	9.77±0.13	7.25±0.75	12.98±0.17	9.33±0.32	10.06±0.09
Etopósido	2.38±0.24	31.47±2.2	2.21±0.7	4.75±0.5	4.93±0.04	2.60±0.25

Vehículo: DMSO. U251: glía de sistema nervioso central, PC-3: próstata, K562: leucemia, HCT-15: colon, MCF-7: mama, SKLU: pulmón.

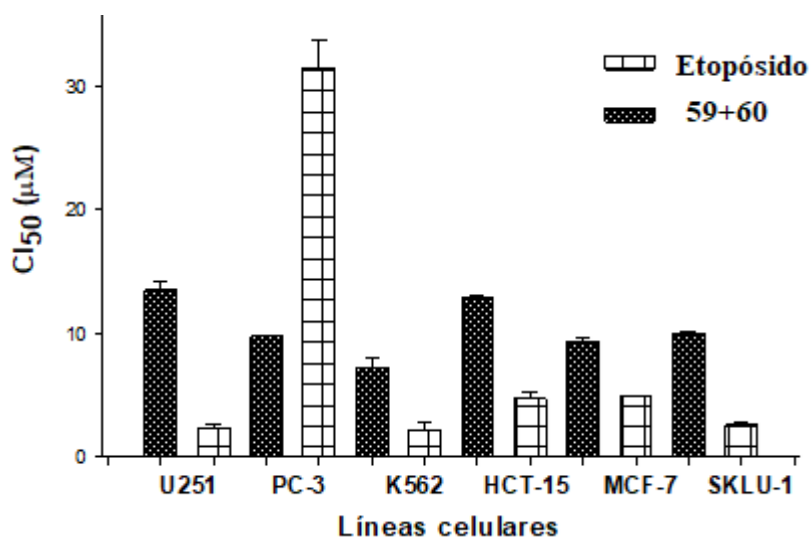


Figura 38. Gráfica de CI₅₀ de las *N*-acetilpirazolininas **59** y **60**.

6.3.1 Estudios de acoplamiento molecular con el factor nuclear κ B (NF- κ B)

Diversas sustancias exhiben actividades contra el cáncer a través de una variedad de mecanismos, tales como (a) la inducción de la apoptosis, (b) la detención del ciclo celular, (c) la modulación de las vías de señalización celular, (d) la prevención de cambios epigenéticos, (e) daños en el ADN, entre otros, y pueden ejercer su acción mediante uno o varios mecanismos biológicos.¹⁷⁹

Por ello, la identificación de las posibles dianas terapéuticas en cáncer en las que actúan diferentes productos naturales o derivados para exhibir acciones quimioterapéuticas y / o quimiopreventivas, es de suma importancia. Con base en lo anterior, en el presente trabajo se realizó la búsqueda de dianas mediante el programa computacional denominado “Predicción de Espectros de Actividad para Sustancias” (Prediction Activity Spectra for Substances, PASS on line),¹⁸⁰ que es una herramienta de cómputo que calcula la actividad biológica potencial de una molécula, y permite evaluar la similitud con respecto a fármacos de referencia presentes en el programa. Los resultados de esta aproximación teórica (basada en algoritmos y en bases de datos continuamente perfeccionados) son expresados como probabilidades de actividad (Pa). Los resultados que cumplen con valores de Pa mayor que 0.7 (Tabla 18) presentan una alta probabilidad de que la sustancia sea activa en las condiciones del experimento *in vitro*, mientras que si el valor de Pa se encuentra dentro del rango de 0.5-0.7, existe una probabilidad ligeramente menor de confirmar la actividad de la sustancia en los estudios biológicos.¹⁸¹

Con base en los resultados de la actividad citotóxica de los compuestos obtenidos, se aplicó esta metodología computacional para un grupo de sustancias. En la Tabla 18 se presentan las actividades biológicas predecibles con una probabilidad (Pa) > 0.7 de los compuestos **25**, **31**, **32**, **59** y **60**, donde las principales bioactividades de los compuestos están relacionadas con la inhibición de la proliferación celular. En el caso del compuesto **25** se observa que la probabilidad de inhibición más alta es con la caspasa 3 que interviene en la mediación nuclear de la apoptosis, incluyendo la condensación cromática y la fragmentación de ADN,¹⁸² lo que representa un blanco para realizar el acoplamiento molecular. Sin embargo en este caso el valor de la CI₅₀ del derivado **25** quedó por debajo del valor del derivado más

activo **32** que (como se observa en la Tabla 18) presenta una interacción notable y específica con el factor de transcripción NF- κ B (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas), por lo que para realizar una comparación entre la actividad antiproliferativa entre los derivados **25, 31, 32, 59 y 60**, se decidió explorar el modo de unión con este factor que resultó constante en todos los compuestos.

Tabla 18. Probabilidad ($P_a > 0.7$) de actividad de acuerdo a la predicción realizada por PASS online¹⁸⁰ para los compuestos **25, 31, 32, 59 y 60**.

25		31		32		59 y 60	
Actividad	P_a	Actividad	P_a	Actividad	P_a	Actividad	P_a
Caspasa 3	0.949	Antineoplásico	0.904	Antineoplásico	0.862	Inhibidor de fosfatasa	0.735
Factor de Transcripción NF-κB	0.885	Agonista de apoptosis	0.887	Factor de transcripción	0.837	Factor de Transcripción NF-κB	0.726
Factor de transcripción	0.885	Factor de transcripción	0.809	Factor de transcripción NF-κB	0.837	Factor de transcripción	0.726
Antineoplásico	0.833	Factor de transcripción NF-κB	0.809	Agonista de apoptosis	0.769		
Agonista de apoptosis	0.761	Antineoplásico (cáncer de pulmón)	0.718	Caspasa 3	0.764		
Inhibidor de fosfatasa	0.739			Antineoplásico (cáncer de pulmón)	0.762		
Antiprotozoario (Leishmania)	0.735						
Caspasa 8	0.726						

NF- κ B participa en el control de la transcripción del ADN, involucrado en la respuesta celular a estímulos como estrés, radicales libres, entre otros. NF- κ B comúnmente se sobreexpresa y se activa constitutivamente en diferentes tipos de cáncer hematológicos y en tumores sólidos.¹⁸³ Hay varias evidencias que sugieren que la inhibición de la activación de NF- κ B puede prevenir la resistencia tumoral a los agentes quimioterapéuticos, cambiar el equilibrio muerte-supervivencia hacia la apoptosis y mejorar la eficacia de los regímenes quimioterapéuticos actuales.¹⁸⁴

Basándose en los resultados predictivos obtenidos con el programa PASS on line, y en continuación con la investigación, se exploró teóricamente el modo de unión de los compuestos **25**, **31**, **32**, **59** y **60** (Figura 39) mediante un estudio de acoplamiento molecular con la proteína del factor de transcripción NF- κ B humano en complejo con los interferones factor de respuesta IRF-3 y IRF-7 (PDB: 2O61),¹⁸⁵ utilizando los programas computacionales Autodock 4.2¹⁸⁶ y VINA.¹⁸⁷

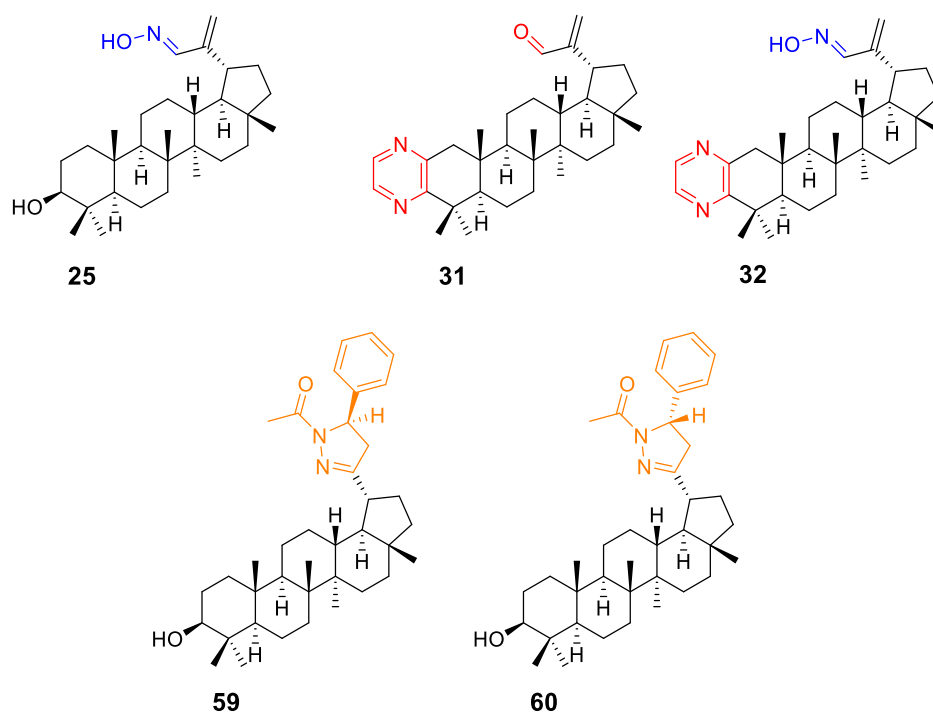


Figura 39. Derivados con mayor actividad antiproliferativa.

Las energías de enlace calculadas de la interacción de cada compuesto con el factor de transcripción NF- κ B humano se muestran en la Tabla 19:

Tabla 19. Energía de unión para los compuestos **25**, **31**, **32**, **59** y **60**.

Compuesto	ΔG (kcal/mol)	
	Autodock 4.2	VINA
25	-7.63	-7.2
31	-8.12	-7.2
32	-8.44	-7.9
59	-7.53	-9.2
60	-8.22	-9.4

En el caso del compuesto **25**, se observó la formación de enlaces de hidrógeno entre la oxima con el grupo amino y carbonilo del residuo Arg-57, así como entre la oxima y el grupo guanidino de Arg-59. También se observó una interacción de enlace de hidrógeno entre el hidroxilo en C-3 del compuesto **25** con el grupo hidroxilo de Ser-249. Este último grupo no es parte del sitio de reconocimiento, pero ayuda a estabilizar el compuesto en la proteína. Estas interacciones presumiblemente pueden hacer que el derivado **25** interfiera con el reconocimiento del ADN, lo que conduciría a la inhibición de la función de NF- κ B, promoviendo la muerte de las células cancerosas (Figura 40).

El compuesto **31**, por otro lado, adopta una conformación similar a **32**, pero no se observa la formación de enlaces de hidrógeno con el factor de transcripción NF- κ B. Se identifican interacciones van der Waals e interacciones hidrofóbicas con los residuos Lys-275, Phe-310 y Arg-57 (Figura 41).

El compuesto **32** adoptó una conformación dentro de la proteína de tal manera que formó enlaces de hidrógeno entre el grupo oxima con los carbonilos de los residuos Ala-245 y Lys-244, de modo análogo al compuesto **25**, la pirazina **32** podría interferir con el reconocimiento del ADN e inhibir la función del NF- κ B. Con respecto a las energías de unión, se puede observar que es mayor que la del compuesto **25**, a pesar de tener menor número de enlaces de hidrógeno. Esto puede deberse a que el derivado **32** los forma con dos residuos del sitio de reconocimiento, mientras que el compuesto **25** lo hace con solo uno de los residuos (Figura 42).

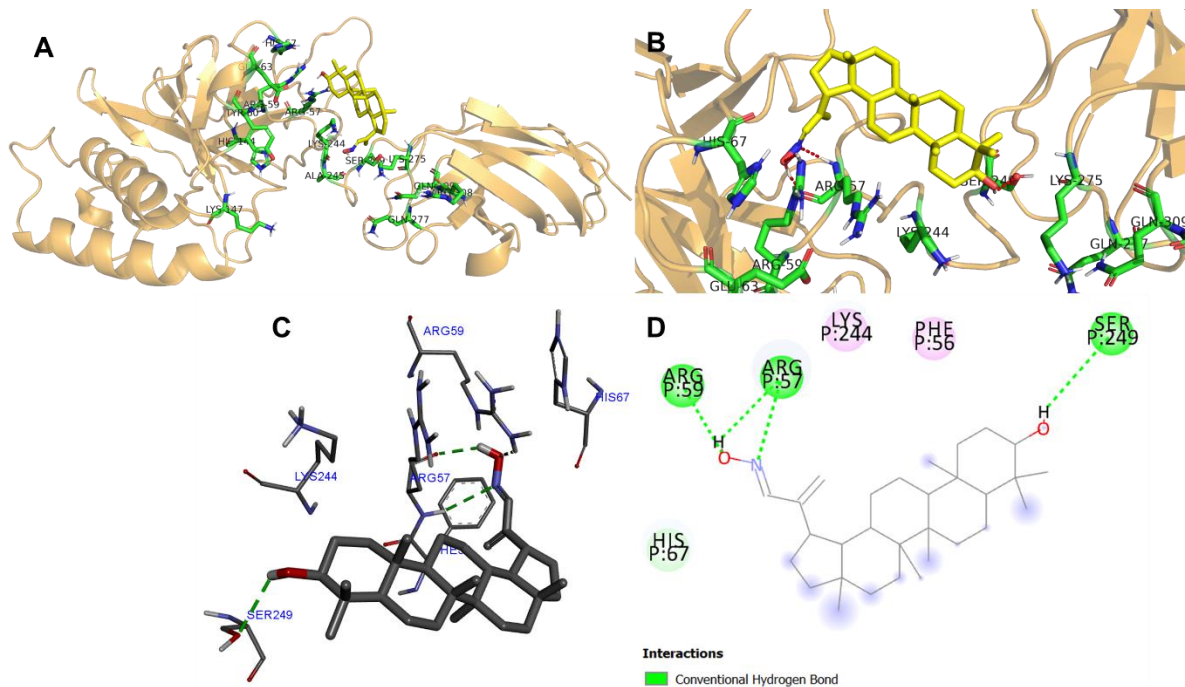


Figura 40. A, B y C: Interacciones del compuesto **25** con NF- κ B. D: Diagrama 2D de la interacción ligando-proteína con los residuos Arg-59, Arg-57 y Ser-249. Las interacciones se representan como: enlace H con la cadena principal de aminoácidos (círculo verde y línea discontinua).

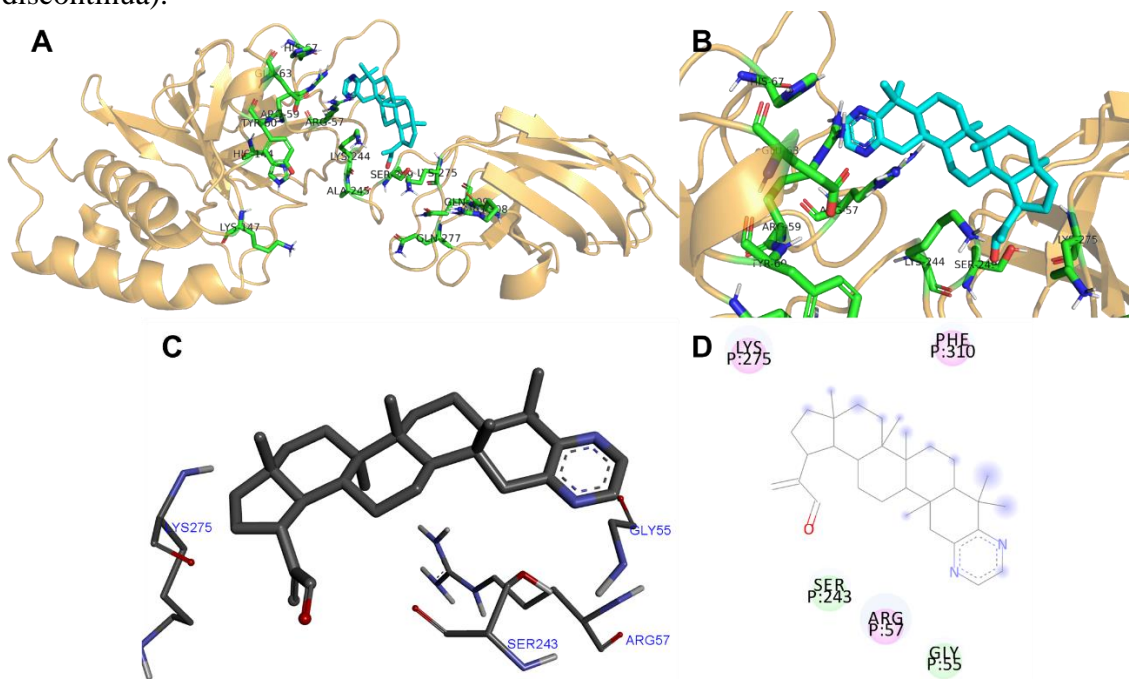


Figura 41. Interacciones del compuesto **31** con NF- κ B. D: Diagrama 2D de la interacción ligando-proteína, interacciones de tipo Van der Waals son observadas con los residuos Lys-275, Phe-310 y Arg-57.

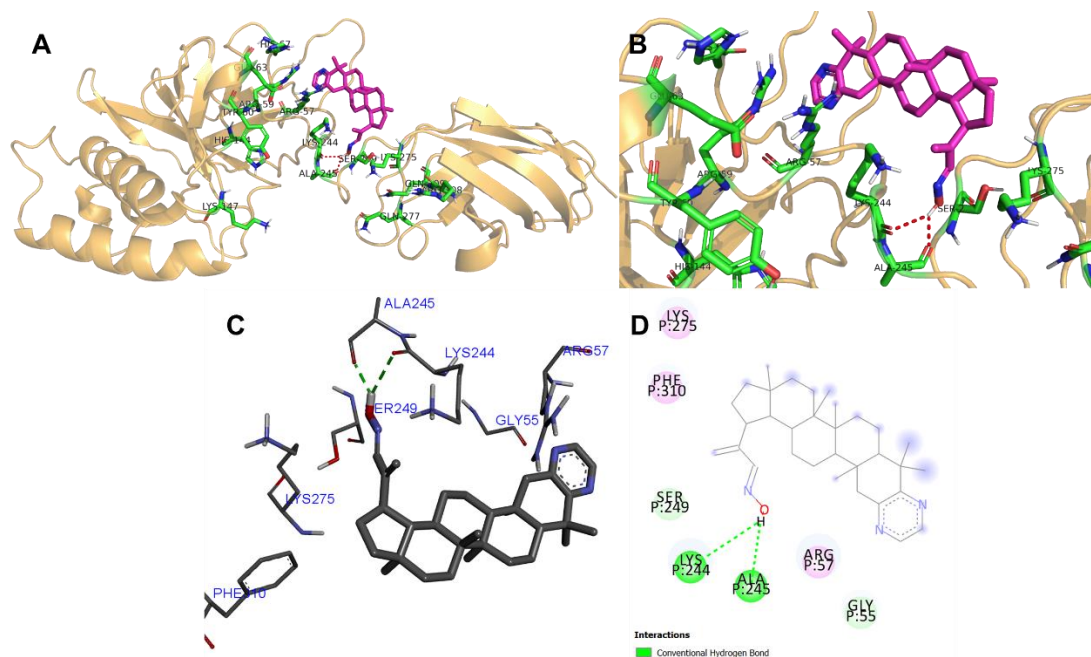


Figura 42. Interacciones del compuesto **32** con NF- κ B. D: Diagrama 2D de la interacción ligando-proteína con los residuos Lys-244 y Ala-245. Las interacciones se representan como: enlace H con la cadena principal de aminoácidos (círculo verde y línea discontinua).

Respecto a los epímeros de *N*-acetilpirazolina (**59** y **60**) los resultados muestran que los compuestos no interactúan directamente con los residuos de aminoácidos responsables de la unión a ADN, sino que interactúan con aminoácidos en sitios cercanos o alostéricos al sitio de unión con el ADN, en particular, con el interferón IRF-7 por lo cual puede ejercer su actividad modificando la posición de este sitio activo, así como interferir en la formación del complejo con NF- κ B, lo cual es crucial para que el complejo se active. Los resultados calculados de energía se muestran en la Tabla 19, y se puede observar que en ambos compuestos se sigue la misma tendencia, siendo la pirazolina **60** la que presenta mayor afinidad.

En la Figura 43 se observan las interacciones entre el compuesto **59** y el complejo NF- κ B-IRF3-IRF7. Se observa la formación de dos puentes de hidrógeno entre el grupo hidroxilo de la pirazolina con los carbonilos de Leu-1108 y el carbonilo del residuo Ser-1132, así como se presentan interacciones de tipo van der Waals, sobre todo con los residuos Arg-1100 y Met-1107 lo que permite mantener estable al compuesto. Si bien estos residuos no forman parte de los aminoácidos responsables de la interacción con el ADN, sí se encuentran en una

región alostérica, tanto en la unión con el ADN, como en la zona de unión entre el complejo IRF-7 y el fragmento IRF-3, por lo que también podría interferir con la formación del complejo activo, afectando la actividad de éste.

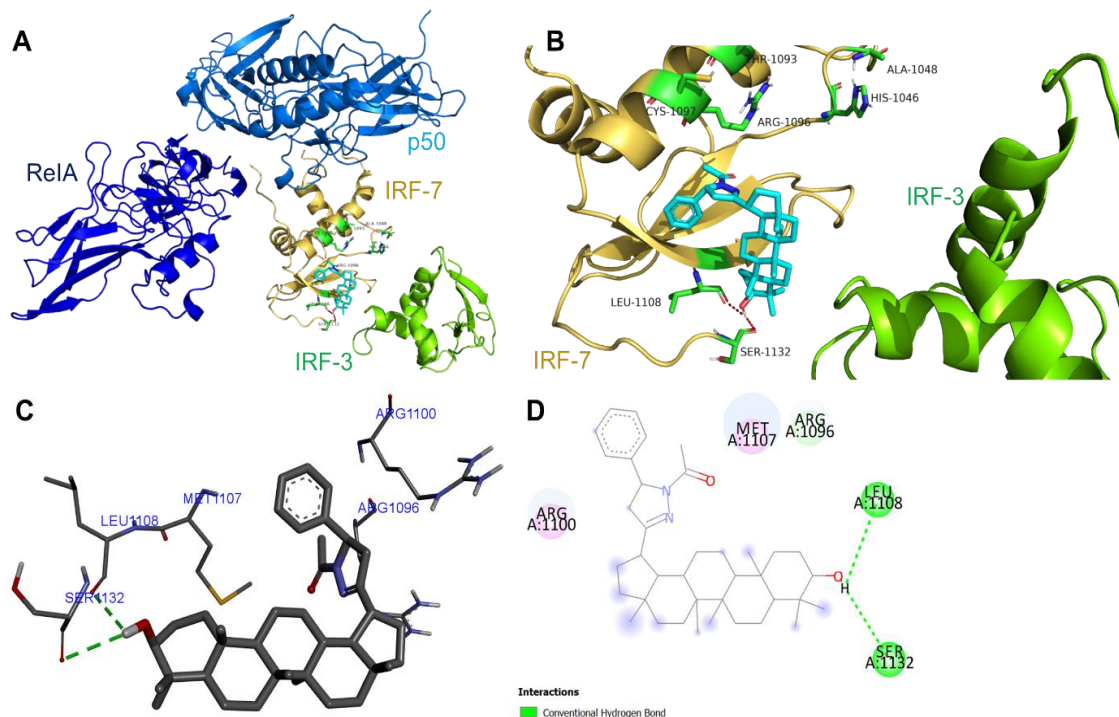


Figura 43. (A) y (B) Interacción del compuesto **59** con el complejo NF- κ B-IRF7-IRF3. (C) Formación de dos puentes de hidrógeno de **59** con los residuos Ser-1132 y Leu-1108. (D) Imagen 2D de la interacción de **59** con NF- κ B mostrando la formación de puentes de hidrógeno e interacciones de tipo van der Waals.

En la Figura 44 se observa la interacción entre el compuesto **60** y el complejo NF- κ B-IRF7-IRF3. Se puede observar el reconocimiento molecular tipo π - π entre el anillo del fenilo del compuesto **60** con el anillo aromático del residuo Trp-1070, así como las interacciones de tipo van der Waals, sobre todo con los residuos Ala-1083, Pro-1081, Pro-1071 y Lys-74, lo que permite mantener estable al compuesto. A pesar de no ser aminoácidos responsables de la interacción con el ADN, también se encuentra en una región alostérica en IRF-7 que permite la unión con el ADN, lo que permitirá modificar la región del sitio activo. Además, el compuesto se coloca en el espacio de interacción entre IRF-7 y el fragmento p50 de NF-

κ B, lo que podría provocar inestabilidad en este complejo y provocar una mala interacción, lo que no permitirá que este complejo funcione adecuadamente.

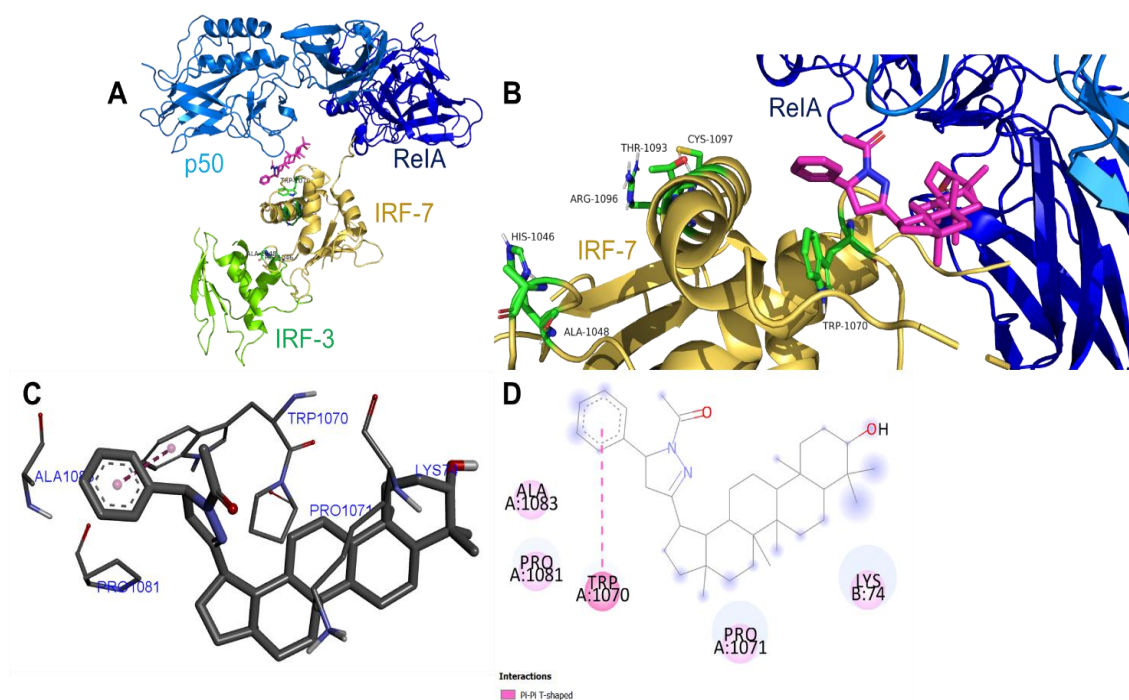


Figura 44. (A) y (B) Interacción del compuesto **60** con la proteína NF- κ B. (C) Formación de una interacción de tipo π - π entre **60** con el residuo Trp-1070. (D) Imagen 2D de la interacción de **60** con NF- κ B mostrando la interacción de tipo π - π .

El estudio de acoplamiento molecular entre el factor de transcripción NF- κ B y los compuestos **25**, **31** y **32** permitió identificar que éstos se unen directamente o cerca de los aminoácidos que forman el sitio de reconocimiento del ADN (His-67, Arg-59, Glu-63, Arg-57, Tyr-60, Lys-244, His-144, Lys-147, Lys-275, Gln-277, Gln-309, Arg-308). En el caso de las pirazolinas **59** y **60**, se observa una interacción con una región alostérica en el interferón IRF-7 (Leu-1108, Ser-1132, Arg-1100, Met-1107, Trp-1070, Ala-1083, Pro-1081, Pro-1071 y Lys-74). Los resultados descritos, aunados con lo informado para el lupeol²⁹ y otros triterpenos pentacíclicos, permiten identificar la pertinencia de realización de experimentación dirigida a la evaluación de estas sustancias como inhibidores del factor de transcripción NF- κ B, en búsqueda de derivados prometedores como agentes en el tratamiento del cáncer.^{188,189}

6.4 Evaluación de la actividad antiinflamatoria

La inflamación crónica y persistente es un proceso que contribuye al desarrollo de cáncer y predispone a la carcinogénesis. Las moléculas implicadas en la relación tumor-inflamación pueden surgir como dianas en la búsqueda de alternativas en la terapia contra el cáncer.¹⁹⁰ Con el propósito de contribuir al conocimiento de las propiedades biológicas de los derivados semisintéticos, y con base en los resultados de acoplamiento molecular de los compuestos **25**, **31**, **32**, **59** y **60** con el factor NF- κ B, se llevó a cabo la evaluación de su actividad antiinflamatoria ya que la activación de la vía del factor nuclear NF- κ B y su cascada de señalización transductora se ha asociado al proceso inflamatorio.¹⁹¹

6.4.1 Evaluación de la actividad antiinflamatoria en el modelo de edema murino inducido por acetato de tetradecanoilforbol (ATF).

Se ha informado que los triterpenos pentacíclicos disminuyen la respuesta de procesos inflamatorios en varios modelos experimentales, incluido el bioensayo murino con 12-acetato 12-tetradecanoilforbol,¹⁹² por lo que se evaluaron algunos derivados en este modelo de inflamación aguda. Los resultados de esta actividad se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20. Evaluación antiinflamatoria en el modelo de edema murino de los derivados del lupeol (**10**).

Compuesto	Dosis (μ mol/oreja)	Edema (mg)	Inhibición (%)
Control	-	15.73 \pm 0.27	-
42	1	13.13 \pm 0.24	16.52 \pm 1.52
47	1	12.56 \pm 1.17	20.13 \pm 7.49
48	0.6	9.03 \pm 1.86**	42.58\pm11.87**
53	1	14.33 \pm 0.23	8.89 \pm 1.48
54	1	11.16 \pm 1.12	29.02\pm7.17
57	1	9.70 \pm 2.34*	38.34\pm14.89*
61	1	14.13 \pm 0.14	10.16 \pm 0.92
Indometacina	1	2.88 \pm 0.73**	78.76 \pm 7.68

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

Como se observa en la gráfica (Figura 45) los compuestos **48** y **57** disminuyeron el edema inducido por el acetato de tetradecanoil forbol (ATF), observándose diferencias estadísticamente significativas respecto al control, con valores de inhibición ~50 %.

De las hidrazonas evaluadas (**42**, **47** y **48**), la fenilhidrazona de 30-oxo-lupeol (**48**) fue la que presentó mayor inhibición del edema, a pesar de ser evaluada en menor dosis y también fue el derivado de lupeol más activo de los tres evaluados (**47**, **48** y **57**).

Es pertinente notar que la variación del sustituyente en la posición C-3 de las cetonas **53**, **57** y **61** impacta significativamente en la actividad antiinflamatoria, lo cual se observa al comparar el porcentaje de inhibición de la inflamación del compuesto **57** (38.54 %), que tiene un grupo hidroxilo en dicho carbono, con respecto a los porcentajes de inhibición del éster **53** (16.52 % de inhibición) y de la pirazina **61** (10.16 %).

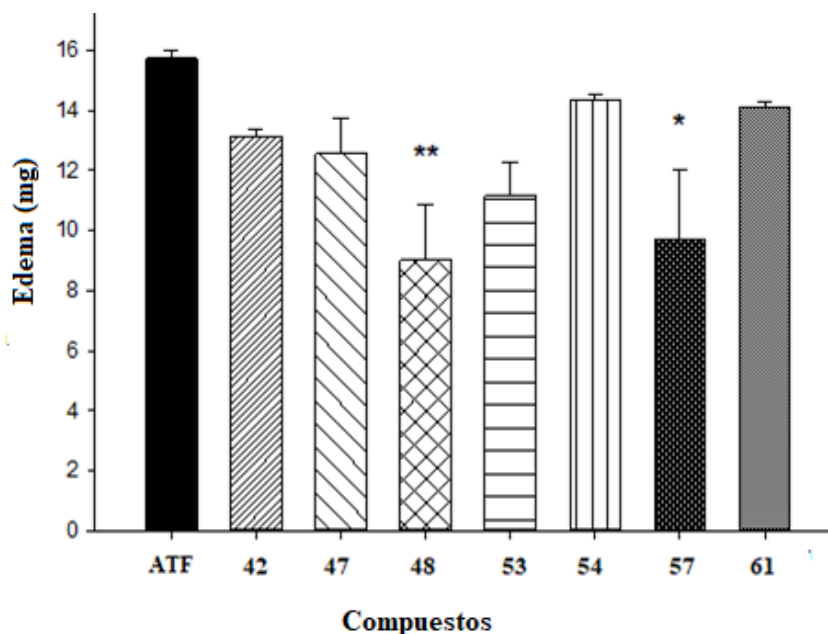


Figura 45. Gráfica de la actividad antiinflamatoria de los derivados evaluados.

La comparación de los porcentajes de inhibición de la inflamación de los ésteres **54** (29 %), **42** (16.52 %) y **53** (8.89 %) indica claramente que la introducción del grupo bencilideno en C-30 aumenta la actividad antiinflamatoria.

6.4.2 Evaluación de la actividad inhibitoria de COX-1 y COX-2

El factor nuclear kappa B (NF- κ B) desempeña una función crucial en la respuesta inflamatoria mediante el control de la transcripción de genes de citocinas inflamatorias.¹⁹³ El proceso inflamatorio se caracteriza por la liberación de varios mediadores, que incluyen citocinas, moléculas quimiotácticas, prostaglandinas y péptidos vasoactivos, que culmina en cambios en la permeabilidad vascular y la infiltración celular. Algunos triterpenos pentacíclicos han mostrado interacción con algunas de estas dianas terapéuticas relacionadas con la inflamación, como COX-1 y COX-2; LOX-5; MPO, PLA2 e i-NOS.¹⁹⁴

La ciclooxigenasa-1 (COX-1) se encuentra expresada de manera constitutiva en la mayoría de los tejidos mientras que la ciclooxigenasa-2 (COX-2) es la isoforma inducible en respuesta a estímulos físicos, químicos y biológicos. La función de las ciclooxigenasas es la síntesis de prostanoïdes proinflamatorios a partir del ácido araquidónico, la inhibición de estas enzimas es un blanco importante en el tratamiento de enfermedades que impliquen procesos inflamatorios.¹⁹⁵

Con base en los resultados de la actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido de acetato de tetradecanoilforbol (ATF), se decidió explorar la actividad antiinflamatoria de manera más específica determinando el efecto inhibitorio sobre las enzimas COX-1 y COX-2 de la fenilhidrazona derivada de lupeol (**48**) y del 30-oxolupeol (**58**), que fueron los derivados más activos (Tabla 20). Los derivados **44**, **55-60**, **62** y **65** también fueron evaluados en este ensayo. Como se observa en la Tabla 21, ninguno de los derivados evaluados inhibió de manera notable a las dos isoformas de la enzima COX en comparación con sus controles positivos (indometacina y celecoxib para COX-1 y COX-2, respectivamente).

Las fenilhidrazonas **44** y **48** inhibieron selectivamente a COX-2 a la concentración más alta (100 μ M) (Figura 47).

La presencia de la pirazina en el bencilidenderivado **62** generó un aumento significativo en la actividad inhibitoria sobre las dos enzimas COX, respecto a su análogo derivado del lupeol (**58**).

Tabla 21. Evaluación de inhibición (%) en COX-1 y COX-2 de **44**, **48**, **55-60**, **62** y **65**

Compuesto	Concentración (μM)	COX-1	COX-2
44	1	0 \pm 0.016	4.04 \pm 0.025
	10	0 \pm 0.009	1.10 \pm 0.021
	100	10.11 \pm 0.012	23.16 \pm 0.008
48	1	0 \pm 0.014	4.04 \pm 0.017
	10	0 \pm 0.008	13.60 \pm 0.015
	100	19.15 \pm 0.016	26.84\pm0.014
55	1	0 \pm 0.005	3.31 \pm 0.025
	10	0 \pm 0.014	12.87 \pm 0.009
	100	16.49 \pm 0.012	15.44 \pm 0.002
56	1	9.57 \pm 0.023	14.34 \pm 0.003
	10	13.83 \pm 0.017	12.87 \pm 0.006
	100	0 \pm 0.039	15.81 \pm 0.006
57	1	0 \pm 0.038	0 \pm 0.032
	10	25.00 \pm 0.095	0 \pm 0.003
	100	0 \pm 0.083	0 \pm 0.041
58	1	0 \pm 0.007	4.41 \pm 0.032
	10	0 \pm 0.009	5.51 \pm 0.013
	100	0 \pm 0.01	0 \pm 0.03
59+60	1	0.53 \pm 0.018	11.40 \pm 0.013
	10	0 \pm 0.023	14.43 \pm 0.013
	100	36.17\pm0.008	21.69 \pm 0.01
62	1	1.06 \pm 0.025	2.21 \pm 0.008
	10	12.23 \pm 0.035	4.78 \pm 0.011
	100	17.02 \pm 0.027	22.06 \pm 0.012
65	1	0 \pm 0.007	17.65 \pm 0.011
	10	0 \pm 0.006	18.38 \pm 0.011
	100	19.15 \pm 0.011	16.54 \pm 0.01
Control	1	71.28 \pm 0.098 ^a	97.43 \pm 0.002 ^b
	10	100 \pm 0.001 ^a	98.53 \pm 0.005 ^b
	100	100 \pm 0.004 ^a	100 \pm 0.001 ^b

a) Indometacina COX-1 b) Celecoxib COX-2. Los datos representan el promedio de tres experimentos \pm el error estándar de la media $\bar{x} \pm EEM$.

Los ésteres epiméricos **55** y **56** no inhibieron más de 18 % a las enzimas COX. En contraste, la mezcla de los alcoholes epiméricos de lupeol (**59** y **60**) presentó la mejor inhibición de todos los compuestos evaluados sobre COX-1 como se observa en la Figura

46. Lo anterior proporciona evidencia adicional de que la presencia del hidroxilo en C-3 y la presencia conjunta de los epímeros es importante para dicha actividad.

La incorporación de la isoxazolina en el palmitato de lupeólo (**15**), compuesto **65**, tampoco generó un aumento de la actividad inhibitoria.

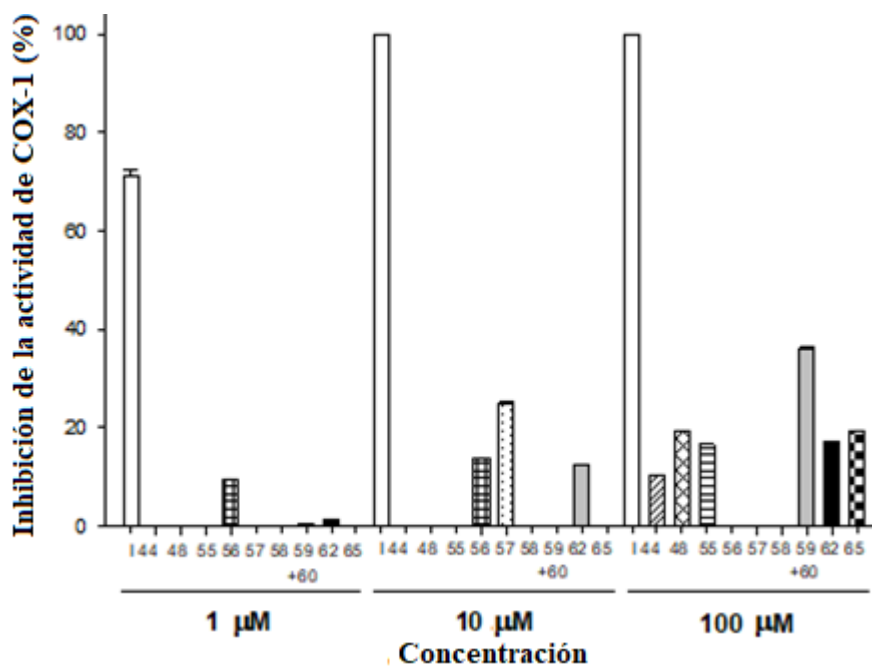


Figura 46. Gráfica de inhibición enzimática en COX-1 de **44**, **48**, **55-60**, **62** y **65**.

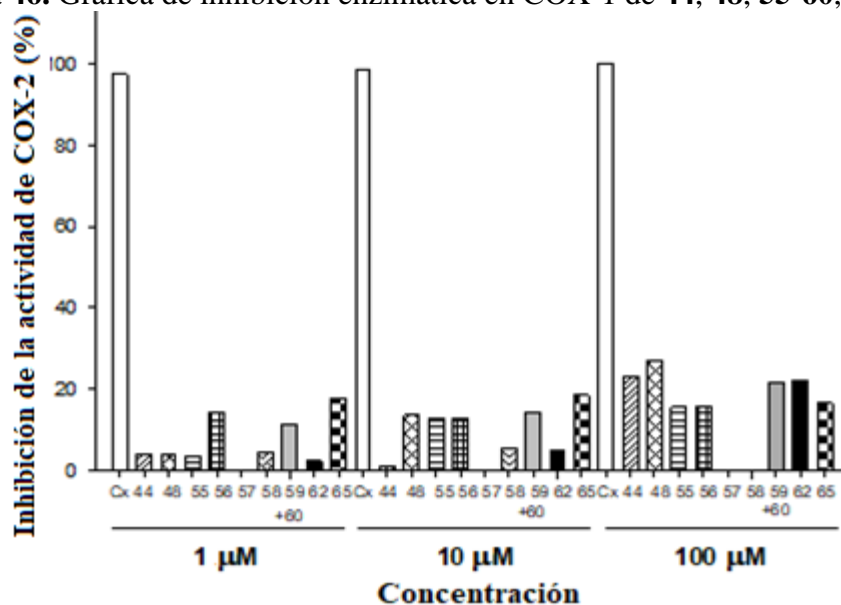


Figura 47. Gráfica de inhibición enzimática en COX-2 de **44**, **48**, **55-60**, **62** y **65**.

7. CONCLUSIONES

La investigación química de las partes aéreas de *Cnidocolus spinosus* resultó en el aislamiento de triterpenos de tipo hopano; 3 β -acetoxi-hop-22(29)-eno (**33**), informado por primera vez como producto natural, 3-oxo-hop-22(29)-eno (**34**) y 3 β -hidroxi-hop-22(29)-eno (**35**), palmitato de β -amirilo (**17**) y tres fitosteroles.

Los compuestos **33–35** no mostraron actividad citotóxica frente a un panel de células cancerosas humanas

El hopano **33** tuvo un efecto antiinflamatorio relevante en el modelo de edema de ratón inducido por ATF, e inhibió significativamente la actividad de la enzima α -glucosidasa de levadura *in vitro* e *in silico*.

Los compuestos **34** y **35** exhibieron actividades marginales contra *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania mexicana*.

La exploración de la reactividad química de los productos naturales mediante reacciones de hidrólisis, oxidación (con PCC y SeO₂), condensación aldólica, cicloadición 1,3 dipolar y la reacción de Willgerodt-Kindler permitió integrar un grupo de compuestos que guardan semejanza estructural.

Los derivados obtenidos de hopanos: **38** (30-oxo-acetato de hopenilo), **39** (30-oxo-hopenol) y **40** ([2,3-*b*]-pirazina de hopenol) se informan por primera vez en la literatura.

Los derivados **42** (hidrazona de 30-oxo-palmitato de lupeílo), **44** (fenilhidrazona de 30-oxo-palmitato de lupeílo), **47** (hidrazona de 30-oxo-lupeol), **48** (fenilhidrazona de 30-oxo-lupeol), **53** (palmitato de 29-nor-20-oxolupeílo), **54** (palmitato de 29-nor-20-bencilidenlupeílo), **55** (5''*R*)-*N*-acetil-5''-fenil-pirazolina de palmitato de lupeílo), **56** (5''*S*)-*N*-acetil-5''-fenil-pirazolina de palmitato de lupeílo), **57** (29-nor-20-oxolupeol), **58** (29-nor-20-bencilidenlupeol), mezcla de **59** y **60** ((5''*R*)-*N*-acetil-5''-fenil-pirazolina de lupeol (**59**) y (5''*S*)-*N*-acetil-5''-fenil-pirazolina de lupeol)), **61** ([2,3-*b*]-pirazina de 29-nor-20-oxolupeol), **62** ([2,3-*b*]-pirazina de 29-nor-20-bencilidenlupeol), la mezcla de **63** y **64** ((5''*R*)- [2,3-*b*]-pirazina de (*N*-acetil-5''-fenil)-pirazolina derivada de lupeol y (5''*S*)- [2,3-

b]-pirazina de (*N*-acetil-5''-fenil)-pirazolina derivada de lupeol)) y **65** (19-isoxazolina derivada del 30-oxo-palmitato de lupeño) también se informan por primera vez en la literatura.

Respecto a la actividad biológica de los derivados, la evaluación de la mezcla de epímeros de *N*-acetilpirazolinas de lupeol (**59** y **60**) exhibió alta citotoxicidad frente a las líneas celulares cancerosas evaluadas, donde destaca la CI_{50} en la línea de próstata cuyo valor de $9.77 \pm 0.13 \mu\text{M}$ es tres veces menor que la del etopósido $31.47 \pm 2.2 \mu\text{M}$ (control positivo).

La presencia conjunta del hidroxilo en C-3 y la *N*-acetilpirazolina son importantes para la inhibición de la proliferación celular que presenta la mezcla de **59** y **60**.

Respecto a la actividad antiinflamatoria en el modelo de inflamación murina por ATF, se observa que la modificación estructural en C-29 y C-30 conduce a cambios en la actividad biológica. Los compuestos más activos fueron **48** y **57** (actividad inhibitoria ~50 % a una dosis de 0.6 y 1.0 μM por oreja respectivamente). En el caso del compuesto **48**, la presencia conjunta de la fenilhidrazona en C-30 y el hidroxilo en C-3, conduce al aumento de la actividad inhibitoria, en comparación con las hidrazonas **42** y **47**. La presencia del grupo hidroxilo en C-3 del compuesto **57** provoca un aumento de la actividad en comparación con sus cetonas análogas esterificada (**53**) y con la pirazina en el anillo A (**61**).

Ninguno de los compuestos evaluados (**44**, **55-60**, **62** y **65**) inhibió notablemente a las dos isoformas de la enzima COX. Para la enzima COX-1 la mezcla de diasterómeros **59** y **60** generó la mayor inhibición, y para la enzima COX-2 fue la 30-fenilhidrazona de lupeol (**48**).

Las principales bioactividades predichas por el programa PASS on line de los compuestos **25**, **31**, **32**, **59** y **60** que son los más tóxicos en el ensayo de inhibición de la proliferación celular, están relacionadas de forma consistente con la interacción con el factor de transcripción NF- κ B.

El estudio de acoplamiento molecular entre el factor de transcripción NF- κ B y los compuestos **25**, **31** y **32** permitió identificar que éstos se unen directamente o cerca de los aminoácidos que forman el sitio de reconocimiento del ADN (His-67, Arg-59, Glu-63, Arg-57, Tyr-60, Lys-244, His-144, Lys-147, Lys-275, Gln-277, Gln-309, Arg-308) y en el caso

de las pirazolinas **59** y **60**, en particular con una región alostérica en el interferón IRF-7 (Leu-1108, Ser-1132, Arg-1100, Met-1107, Trp-1070, Ala-1083, Pro-1081, Pro-1071 y Lys-74), lo que denota la pertinencia de realizar experimentación dirigida a la evaluación de estas sustancias como inhibidores del factor de transcripción NF- κ B en búsqueda de derivados prometedores como agentes en el tratamiento del cáncer

Los resultados descritos permiten ampliar el espacio químico y biológico de los productos naturales y semisintéticos, por lo que se cumplieron los objetivos planteados para la presente investigación.

8. SECCION EXPERIMENTAL

Para las reacciones llevadas a cabo se emplearon disolventes de grado analítico y los reactivos (Sigma-Aldrich) se emplearon directamente. Donde se indica, se empleó un reactor de microondas Anton Paar Monowave 300, con el modo de calentamiento “Heat as fast as possible” con potencia variable, con viales de vidrio de borosilicato (10 mL). La temperatura se determinó con el termómetro interno de infrarrojo.

A menos que se indique de otra forma, la purificación por cromatografía en columna abierta se llevó a cabo con gel de sílice malla 230-400, que fue monitoreada por cromatografía en capa fina (cromatofolios Merck 60 F254 de 0.2 mm de espesor), visualizando con lámpara de ultravioleta y con revelador de sulfato cérico de amonio. Cuando fue necesario, se emplearon cromatoplasmas de gel de sílice (Merck 60 F254 2mm 20 x 20 cm).

Los espectros de RMN se adquirieron en equipos Varian Inova a 500 MHz, Bruker Avance III a 400 MHz, Jeol Eclipse a 300 MHz, y se reportan los desplazamientos químicos en ppm, referenciando con TMS o el disolvente. Los espectros de IR fueron adquiridos en un equipo FT-IR Bruker Tensor 750. La espectrometría de masas se llevó a cabo en un equipo Jeol AccuTOF JMS-T100LC. Los puntos de fusión fueron tomados con un aparato Fisher-Johns, y no están corregidos.

8.1 Materiales vegetales

Las partes aéreas (hojas) de *C. spinosus* Lundell se recolectaron en la reserva de la biósfera Chamela-Cuixmala, Jalisco, en agosto de 2013, y fueron identificadas por la Dra. Graciela García Guzmán (Instituto de Ecología, UNAM). Un espécimen muestra (LAPJ1778) se depositó en el Herbario Nacional de México (MEXU) en el Instituto de Biología de la UNAM.

Las hojas de *Sapium lateriflorum* (inicialmente identificada como *S. nitidum*) fueron colectadas e identificadas por el Biólogo Esteban Manuel Martínez Salas del Instituto de Biología de la UNAM. El material fue colectado en la localidad de Nueva Palestina (estado

de Chiapas). Una muestra se encuentra depositada en el Herbario Nacional del Instituto de Biología de la UNAM (registro preliminar EMM39268).

8.1.1 Extracción y aislamiento

El material vegetal (hojas) seco de *C. spinosus* (3.5 kg) se pulverizó y se extrajo 3 veces a 25 °C mediante maceración con una mezcla de CH₂Cl₂:MeOH 1:1. Después de eliminar el disolvente al vacío, se obtuvo un residuo (400 g), que se sometió a cromatografía en una columna de gel de sílice con un sistema de disolvente *n*-hexano-EtOAc en un gradiente de polaridad ascendente. Las fracciones (250 mL cada una) se monitorearon por ccv y se agruparon en veintiocho fracciones principales. Las fracciones 6-10 se sometieron a cromatografía en columna (gradiente *n*-hexano-EtOAc) se aisló el 3β-acetoxi-hop-22(29)-eno (**33**) (685.8 mg), 3-oxo-hop-22(29)-eno (**34**) (200 mg), 3β-hidroxi-hop-22 (29)-eno (**35**) (107.7 mg) y palmitato de β-amirina (**17**) (80 mg). La fracción 14 proporcionó β-sitosterol (**13**) (130 mg) y estigmasterol (**14**). De la fracción 27 se aisló 3-*O*-β-D-glucopiranosido de β-sitosterilo (**12**) (400 mg).

8.2 Ensayo citotóxico

Los compuestos se evaluaron *in vitro* contra seis líneas celulares de cáncer humano que incluyen HCT-15 (colon), K562 (leucemia), U251 (glioblastoma), MCF (mama), PC-3 (próstata), SKLU (pulmón), FGH (Fibroblastos gingivales humano) y COS7 (riñón de mono) que fueron proporcionados por el Instituto Nacional del Cáncer (EE. UU.). La inhibición de la proliferación celular se determinó usando el colorante de unión a proteínas sulforodamina B (SRB) en un ensayo de microcultivo para medir el crecimiento celular, como se describe en los protocolos establecidos por el NCI. La evaluación preliminar se realizó a 25 μM utilizando doxorubicina o etopósido como control. Las células se cultivaron en medio RPMI 1640, suplementado con suero bovino fetal inactivado al 10 % (v / v), penicilina 100 U / mL y sulfato de estreptomicina 100 μg / mL, glutamina 2 μg / mL y anfotericina B de 0,25 μg / mL se mantuvieron en una atmósfera humidificada (95 % de humedad) con 5% de CO₂ a 37 ° C durante 24 h antes de la adición de compuestos experimentales. La viabilidad de las células utilizadas en los experimentos excedió el 95 %, según lo determinado con un ensayo

de azul de tripano. Las células se retiraron de los matraces de cultivo de tejidos mediante tratamiento con tripsina y se diluyeron con medios frescos. Las suspensiones de células (100 μL), que contienen 5000 o 7500 células por pocillo, se pipetearon en placas de 96 pocillos (Corning, NY), y se incubaron a 37 ° C durante 24 h en una atmósfera de CO_2 al 5 % para alcanzar un crecimiento exponencial. Después de 24 h, se añadió una alícuota de 100 μL de los compuestos de prueba o control positivo (todas las sustancias de prueba se disolvieron en DMSO a una concentración máxima de 0.5 %, en la que DMSO era completamente inocuo) a cada pocillo. Los cultivos fueron expuestos a los compuestos durante 48 h. Después del período de incubación, las células se fijaron *in situ* mediante la adición de 50 μL de TCA acuoso al 50 % frío y se incubaron a 4 ° C durante 1 h. El sobrenadante se desechó, y las placas se lavaron con agua y se secaron al aire. Las células fijadas con TCA se tiñeron mediante la adición de SRB al 0.4 %. La solución de SRB libre se eliminó lavando con ácido acético acuoso al 1 %. Las placas se secaron al aire y el colorante unido se solubilizó mediante la adición de una base Tris 10 mM (100 μL). Las placas se colocaron en un agitador durante 5 min y se determinó la absorbancia a 515 nm usando un lector de microplacas Ultra ELx808, Bio-Tek Instruments, Inc. Vermont, EE. UU.

8.2.1 Predicción de Espectros de Actividad para Sustancias” (Prediction Activity Spectra for Substances, PASS on line)¹⁸⁰

Después de acceder a la herramientas en línea,¹⁸⁰ los archivos de los compuestos en formato SMILE (generados a partir de la versión Chemdraw Ultra 13.0) se enviaron a través de la columna proporcionada y se procedió a las predicciones. El resultado PASS se designa como Pa (probabilidad de compuesto activo) y Pi (probabilidad de compuesto inactivo). Al ser probabilidades, los valores de Pa y Pi varían de 0.000 a 1.000. Solo las actividades con $\text{Pa} > \text{Pi}$ se consideran posibles para un compuesto en particular. Si $\text{Pa} > 0,7$, la probabilidad de encontrar la actividad experimentalmente es alta. Cuando $0,5 < \text{Pa} < 0,7$, la posibilidad de encontrar la actividad experimentalmente es menor, pero el compuesto probablemente no sea tan similar a los agentes farmacéuticos conocidos.¹⁸¹

8.2.2 Estudio de acoplamiento molecular

Las estructuras **25**, **31**, **32**, **59** y **60** se construyeron y se optimizó su geometría aplicando el método MM2. La proteína se optimizó, las moléculas de agua innecesarias se eliminaron primero, al igual que se eliminaron las moléculas de artefacto. Después, la estructura se minimizó utilizando el software Chimera 1.13.1.¹⁹⁶ AutoDock 4.2¹⁹⁷ y VINA¹⁸⁷ se utilizaron para el acoplamiento molecular entre compuestos seleccionados con NF-κB (PDB ID: 2O61).¹⁸⁵ El programa AutoGrid suministrado con AutoDock4 se utilizó para la preparación de mapas de cuadrícula. El Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA) fue elegido para buscar los mejores conformeros. Las posiciones finales de los compuestos se clasificaron según los valores más bajos de energía de interacción (expresados en kcal / mol y residuos de unión) y se eligieron los resultados donde se obtuvo el mayor número de conformeros en ambos programas. AutoDock 4.2¹⁹⁷ y VINA¹⁸⁷ se utilizaron para consensuar los resultados obtenidos para validar este método, eligiendo los resultados que coincidían en ambos software. Las interacciones del enlace H entre los compuestos y la proteína se exploraron y analizaron con PyMOL software package (Schrodinger, LLC, NY, USA) and Discovery Studio Visualizer (Dassault Systems, BIOVIA Corp., CA, USA).

8.3 Actividad antiinflamatoria

8.3.1 Actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido con ATF

Los experimentos se realizaron con ratones CD-1 machos adultos (25-30 g) comprados en la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Ciudad de México. Se alojaron a 22 ± 2 ° C en un ciclo de 12 h de luz / 12 h de oscuridad, con acceso a alimentos y agua ad libitum. Los ratones se aclimataron durante al menos tres días antes de la prueba y se usaron solo una vez durante los experimentos. Los experimentos reportados en este estudio se realizaron de acuerdo con las Regulaciones Oficiales Mexicanas NOM-062-ZOO-1999 y fueron aprobados por el Comité Ético Interno (CICUAL-IQ-004-17).

Los compuestos se evaluaron usando el modelo de edema de oreja de ratón inducido por acetato 12-*O*-tetradecanoilforbol (ATF) de acuerdo con la metodología descrita en la literatura.¹⁹⁸ Se aplicó una solución de ATF (2.5 µg) en etanol (10 µL) por vía tópica a ambas caras (5 µL) de la oreja derecha de los ratones, 10 min después de que se aplicaron soluciones

de las sustancias de prueba en sus respectivos disolventes (10 μ L). La oreja izquierda recibió etanol (10 μ L) primero, y 20 μ L del disolvente respectivo posteriormente. Cuatro horas después, los ratones fueron sacrificados con CO₂. Se quitó un tapón de 7 mm de diámetro de cada oreja. La hinchazón se evaluó como la diferencia de peso entre el oído izquierdo y el derecho. Los animales de control recibieron el disolvente correspondiente en cada caso. La inhibición del edema (% IE) se calculó mediante la ecuación

$$IE (\%) = 100 - (B \times 100 / A)$$

Donde A es el edema inducido por el ATF solo y B es el edema inducido por ATF más el compuesto evaluado. Los compuestos que mostraron más del 50 % de inhibición del edema de la oreja se seleccionaron para analizar a diferentes dosis. El rango de dosis fue de 0.18, 0.32, 0.56 y 1 μ mol en 20 μ L de cloroformo (vehículo). La indometacina (Sigma-Aldrich) se utilizó como fármaco antiinflamatorio de referencia. Los grupos de tratamiento incluyeron 5–8 ratones, y se repitió el mismo procedimiento de prueba. Se analizó la gráfica de dosis-respuesta con regresión lineal para determinar la dosis que proporcionó el 50 % de inhibición (DI₅₀).

La actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO)¹⁹⁹ se midió en una biopsia tomada de las orejas 4 h después de la administración de ATF. Cada biopsia de oreja de ratón se colocó en 1 mL de solución salina buffer de fosfato (PBS) 80 mM, pH 5.4 que contenía bromuro de hexadeciltrimetilamonio al 0.5 % (HTAB). Cada uno se homogeneizó durante 30 seg a 4 °C con una pequeña muestra de laboratorio Tissue Tearor Homogenizer (OMNI International, modelo 125). El homogenado se congeló y descongeló a 25 °C, 3 veces, se sonicó durante 20 seg y se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min a 4 °C. Los sobrenadantes resultantes (10 μ L en cuadruplicado) se vertieron en microplacas de 96 pocillos y se añadieron 180 μ L de PBS 80 mM (pH 5.4) sin HTAB. La microplaca se calentó a 37 °C y luego se añadieron 20 μ L de peróxido de hidrógeno al 0.017 % a cada pocillo. Para el ensayo MPO, se agregaron 20 μ L de 18.4 mmol L⁻¹ 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina en DMF acuoso al 50 % para comenzar la reacción. Las placas se incubaron a 37 °C durante 5 min. La reacción se detuvo con 20 μ L de H₂SO₄ 2 M. La actividad de la enzima MPO se evaluó

colorimétricamente usando un lector de microplacas BioTek Synergy HT a una longitud de onda de absorbancia de 450 nm.

8.3.2 Cortes histológicos

Los cortes histológicos se obtuvieron como se ha descrito en la literatura.²⁰⁰ Los cortes se fijaron en solución de formaldehído al 10 %. Las orejas se deshidrataron, se incrustaron en parafina y se seccionaron. Se tiñeron secciones de 5 µm con hematoxilina-eosina. La infiltración de leucocitos se evaluó en áreas seleccionadas (objetivo 10 × y 40 ×).

8.3.3 Actividad inhibitoria en las enzimas COX-1 y COX-2

Los derivados fueron probados para determinar la actividad inhibitoria en un Kit de ensayo inmunoenzimático con las enzimas puras COX-1(ovino) y COX-2 (humano) de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes (Cayman Chemical Company, USA).

El ensayo de detección del inhibidor colorimétrico COX de Cayman mide el componente peroxidasa de las enzimas COX. La actividad de la peroxidasa se evalúa colorimétricamente controlado la aparición de *N,N,N',N'*-tetrametil-*p*-fenilendiamina (TMPD) oxidada a 590 nm.²⁰¹ Todas las muestras se analizaron por triplicado.

8.4 Actividad inhibitoria en α-glucosidasa

8.4.1 Actividad inhibitoria en α-glucosidasa de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*)

La actividad de glucosidasa se evaluó utilizando un método adaptado.²⁰² Una solución (25 mL) de muestras en DMSO-H₂O 1:1 se añadió a 150 µL de solución buffer de fosfato (PBS, 67 mM, pH 6,8) y se incubó a 37 °C durante 10 min con 25 µL de glutatión (3 mM en PBS) y 25 µL (0.2 U mL⁻¹) de α-glucosidasa tipo I (Sigma G5003-100 UN). La solución de sustrato (25 µL, 23.2 µL α-D-glucopiranosido de *p*-nitrofenilo, Sigma N1377, en PBS) se añadió luego y se incubó con agitación durante 15 min a 37 °C. La mezcla de reacción se detuvo con 50 µL de Na₂CO₃ (1 M) y después de 5 min de agitación se determinó la absorbancia a 405 nm. La acarbosa y quercetina se utilizaron como controles positivos. El porcentaje de inhibición se calculó mediante la ecuación:

$$\text{Inhibición (\%)} = [\text{ODcontrol} - (\text{ODcompuesto} - \text{ODblanco}) / \text{ODcontrol}] \times 100.$$

Donde OD_{control}, OD_{compuesto} y OD_{blanco} se definen como la absorbancia del 100 % de actividad enzimática, muestra de prueba con enzima y muestra de prueba sin enzima, respectivamente. La concentración de un inhibidor requerida para inhibir el 50 % de la actividad enzimática en las condiciones de ensayo mencionadas se define como el valor CI₅₀. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

8.4.2 Actividad inhibitoria en α -glucosidasa de mamífero

La α -glucosidasa se preparó con el método modificado.²⁰³ El polvo intestinal de rata en acetona (100 mg) se rehidrató con 4 mL de tampón de fosfato helado 67 mM (pH 6,8). Después de la homogeneización durante 3 min a 4 °C, la suspensión se centrifugó (13,400 rcf, 4 °C, 30 min) y el sobrenadante resultante se usó para el ensayo. Una mezcla de reacción que contenía 150 μ L de solución buffer de fosfatos (67 mM, pH 6.8), 25 μ L de α -glucosidasa y 25 μ L de muestra (en DMSO al 50 %) a diferentes concentraciones se preincubó durante 10 min a 37 °C y se agregaron 25 μ L de α -D-glucopiranosido de p-nitrofenilo (23.2 mM). Después de 15 min de incubación a 37 °C, la reacción se detuvo agregando 50 μ L de Na₂CO₃ (1 M). Se usó acarbosa como control positivo y DMSO 5 % como control negativo. La actividad de la enzima se cuantificó midiendo la absorbancia a 405 nm en un lector de microplacas BioTek Synergy HT. Los experimentos se realizaron por triplicado.

El porcentaje de inhibición enzimática se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Inhibición (\%)} = [(\text{AC} - \text{AS}) / \text{AC}] \times 100$$

Donde AC es la absorbancia del control negativo y AS es la absorbancia de la muestra analizada.

8.5 Estudio de acoplamiento molecular

Las estructuras **33-35** se construyeron y se optimizó su geometría aplicando el método semi-empírico AM1. AutoDock 4.2¹⁹⁷ se utilizó para el acoplamiento molecular entre compuestos con la enzima α -glucosidasa *Saccharomyces cerevisiae* (PDB ID: 4J5T).²⁰⁴ El programa AutoGrid suministrado con AutoDock4 se utilizó para la preparación de mapas de cuadrícula. El Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA) fue elegido para buscar los mejores

confórmeros. Durante el proceso de acoplamiento, se consideró un máximo de 10 confórmeros para cada ligando. Todos los procesos de acoplamiento se realizaron con los parámetros predeterminados. El tamaño de la población se estableció en 150, el número máximo de evaluaciones 2500000, el número máximo de generaciones 27000, el número máximo de individuos superiores que sobrevivieron automáticamente a 1, la tasa de mutación genética de 0.02 y la tasa de cruce de 0.8. Los resultados de AutoDock 4.2 se analizó con el software PyMOL y Discovery Studio Visualizer v16.

8.6 Actividad antiparasitaria

8.6.1 Cultivo de parásitos

Epimastigotes de cepas de *Trypanosoma cruzi* Silvio (MHOM / Br / 2000 / Silvio), CI Brener (MHOM / Br / 1987 / CI Brener) y Querétaro (Qro) (TBAR / MX / 2000 / Querétaro) se cultivaron en medio LIT ((NaCl 68.4 mM, KCl 2.29 mM, Na₂HPO₄ 56.3 mM, Triptosa 5 g / L, Caldo de infusión de hígado 5 g / L) suplementado con 10% de suero fetal bovino (26140-079, Gibco, EE. UU.) Y 25 µg / mL de hemina (H3888, Sigma USA), mantenido a 28 ° C. Epimastigotes de *Trypanosoma rangeli* se cultivaron en medio LIT suplementado con 20% de FBS y se mantuvieron a 28 °C. Promastigotes de *Leishmania mexicana bricaire* se cultivaron en medio 199 (1120312, Invitrogen USA) suplementado con 10% de FBS y 2 µg / mL de hemina, mantenida a 28 °C.

8.6.2 Ensayos tripanocidas

Los cultivos en fase exponencial de cada parásito se cosecharon y se ajustaron a una concentración de 10×10^7 parásitos/ mL en el medio de cultivo respectivo. Estas células se sembraron en placas de 96 pocillos (60 µL/pocillo, 0427A, Nest Biotech, China), en presencia o ausencia de varias concentraciones de compuestos **33**, **34** y **35**, durante 24 o 48 horas a 28 °C. Posteriormente, se lavaron dos veces con PBS (Na₂HPO₄ 2.53 mM, NaH₂PO₄·H₂O 7.97 mM, NaCl 154 mM, pH. 7.2) y el sedimento celular estéril se suspendió en 60 mL de LIT sin suero fetal bovino y hemina (*T. cruzi* y *T. rangeli*) o en medio completo 199 (*L. mexicana* Bricaire). Se añadió MTT (M4828, Sigma USA) a una concentración de 0.8 mg/mL. Los parásitos se incubaron durante 4 horas 28 °C y se recogieron a 12 800 x g durante 5 min. Se retiró el sobrenadante y se añadieron 120 µL de isopropanol (109634, Merck-Millipore, Alemania) y se incubaron a 25 °C con agitación durante 1 hora. Las

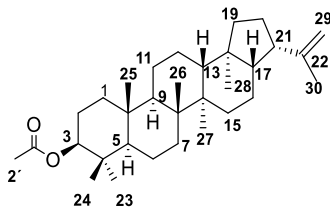
muestras se transfirieron a una placa de vinilo blando de 96 pocillos (2797, Corning Inc. USA) (50 μ L / pocillo) y la absorbancia se leyó a 595 nm con una referencia de 655 nm. Los valores de absorbancia se interpretaron como un porcentaje de viabilidad, considerando la absorbancia obtenida en ausencia de estímulo como 100 %. Los resultados se representaron como el promedio de 2 ensayos independientes con duplicados en cada uno \pm la desviación estándar.

8.6.3 Ensayos de citotoxicidad

Las células Vero se cultivaron en matraces de 25 cm² (3055, Corning, EE. UU.) En medio DMEM (12800-017, Gibco, EE. UU.) suplementado con suero bovino fetal al 10 %, a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % y cultivado durante 3-4 días hasta que alcanzaron el 85 % de confluencia. Para los ensayos de citotoxicidad, el cultivo se lavó con EDTA 5 mM estéril y las células se separaron de las placas con tripsina (1 mg/mL) durante 5 minutos. Se utilizaron 2 x 10⁴ células por condición experimental colocada en 180 μ L/pocillo en placas de 96 pocillos (0427A, Nest Biotech, China). Después del tiempo de incubación (24 o 48 h), se añadió MTT a una concentración de 0.8 mg/mL y se incubó durante 4 horas a 37 °C. El ensayo de sal de formazan metabolizado se realizó como se describió previamente para los epimastigotes de *T. cruzi*.

8.7 Síntesis y caracterización

Acetato de hopenilo (**33**)



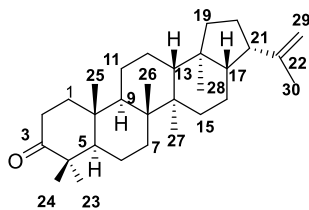
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4.78 (brs, 2H, H-29), 4.47 (dd, 1H, $J = 10.5, 6.0$, H-3), 2.68 (ddd, 1H, $J = 9.5, 9.5, 7.0$, H-21), 2.04 (s, 3H, H-2'), 1.75 (s, 3H, H-30), 0.96 (s, 3H, H-26), 0.93 (s, 3H, H-27), 0.85 (s, 3H, H-23), 0.84 (s, 3H, H-25), 0.83 (s, 3H, H-24), 0.72 (s, 3H, H-28).

RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 171.16 (C-1'), 148.83 (C-22), 110.28 (C-29), 81.13 (C-3), 55.35 (C-5), 55.04 (C-17), 50.23 (C-9), 49.47 (C-13), 46.47 (C-21), 44.77 (C-18), 42.05 (C-19), 41.91 (C-14), 41.72 (C-8), 38.39 (C-1), 37.79 (C-4), 37.03 (C-10), 33.66 (C-15), 33.25 (C-7), 27.99 (C-23), 27.39 (C-20), 25.00 (C-20), 23.90 (C-12), 23.71 (C-2), 21.64 (C-16), 21.32 (C-2'), 21.06 (C-11), 18.28 (C-6), 16.68 (C-26), 16.50 (C-27, C-24), 16.07 (C-25), 15.93 (C-28).

Datos cristalográficos de **33**: $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_2$, monoclinico, grupo espacial $C2$, $a = 13.084$ (4) Å, $b = 7.7797$ (18) Å, $c = 15.5894$ (10) Å, $\alpha = \gamma = 90.00^\circ$, $\beta = 97.557$ (12); $V = 2724.6$ (14) Å 3 , $T = 150$ (2) K, $Z = 4$, $D_{\text{calcd}} = 1.143$ Mg / m 3 , $F(000) = 1040$. Se recolectaron un total de 3066 reflexiones dentro del rango $2.744 \leq \theta \leq 68.323$, en las cuales 13899 reflexiones se observaron [$I > 2\sigma(I)$]. R final = 0.0491, $R_w = 0.1238$ y $S = 1.078$. Parámetro de Flack = 0.0 (2).

Los parámetros en el formato del Archivo de información cristalográfica (CIF) del compuesto **33** se depositaron en el Centro de Datos Cristalográficos de Cambridge, con la clave de registro CCDC1851812.

Hopenona (**34**)¹⁰⁹



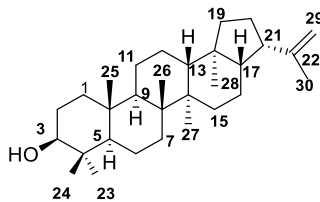
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.50 (ddd, *J* = 15.7, 10.1, 7.4, 1H, H-b), 2.39 (ddd, *J* = 15.7, 7.5, 1H, H-2a), 1.75 (s, 3H, H-30), 1.07 (s, 3H, H-23), 1.02 (s, 3H, H-24), 1.00 (s, 3H, H-26), 0.93 (s, 3H, H-25), 0.73 (s, 3H, H-28).

RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ 218.27 (C-3), 148.78 (C-22), 110.30 (C-29), 55.04 (C-5, C-17), 49.67 (C-9), 49.61 (C-13), 47.37 (C-4), 46.44 (C-21), 44.77 (C-18), 42.15 (C-14), 41.95 (C-19), 41.66 (C-8), 39.58 (C-1), 36.85 (C-10), 34.20 (C-2), 33.68 (C-7), 32.64 (C-15), 27.36 (C-20), 26.59 (C-23), 25.00 (C-30), 23.95 (C-12), 21.63 (C-11), 21.58 (C-16), 21.12 (C-24), 19.77 (C-6), 16.62 (C-27), 16.43 (C-26), 16.15 (C-28), 15.74 (C-25).

Datos cristalográficos de **34**: C₃₂H₄₈O, monoclinico, grupo espacial *P*21, *a* = 10.7651 (4) Å, *b* = 7.2610 (3) Å, *c* = 16.431 (6) Å, *a* = *γ* = 90.00°, *β* = 105.6544 (16); *V* = 1245.13 (8) Å³, *T* = 298 (2) K, *Z* = 2, *D*_{calcd} = 1.133 Mg / m³, *F*(000) = 1040. Se recolectaron un total de 11971 reflexiones dentro del rango 2.744 ≤ *θ* ≤ 68.374, en las cuales 13899 reflexiones se observaron [*I* > 2σ(*I*)]. *R* final = 0.0893, *R*_w = 0.1737 y *S* = 1.059. Parámetro Flack = 0.1 (6).

Los parámetros en el formato del Archivo de información cristalográfica (CIF) del compuesto **34** se depositaron en el Centro de Datos Cristalográficos de Cambridge, con la clave de registro CCDC1851813.

Hopenol (**35**)¹¹⁰



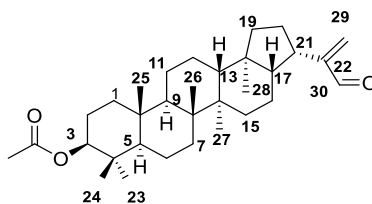
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 4.78 (brs, 2H, H-29), 3.19 (dd, *J* = 11.3 1H, H-3), 1.75 (s, 3H, H-30), 0.97 (s, 3H, H-23), 0.94 (s, 3H, H-24), 0.82 (s, 3H, H-26), 0.76 (s, 3H, H-25), 0.72 (s, 3H, H-28).

RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ 148.86 (C-22), 110.25 (C-29), 55.26 (C-5), 55.03 (C-17), 50.47 (C-9), 49.62 (C-13), 46.62 (C-21), 44.92 (C-18), 42.21 (C-14), 42.06 (C-4), 41.85 (C-8), 39.01 (C-19), 38.86 (C-1), 37.27 (C-10), 33.82 (C-7), 33.46 (C-15), 28.18 (C-23), 27.54 (C-2, 20), 25.15 (C-30), 24.08 (C-12), 21.79 (C-11), 21.19 (C-16), 18.55 (C-6), 16.87 (C-25), 16.79 (C-27), 16.24 (C-26), 16.02 (C-24), 15.53 (C-28).

8.8 Procedimiento general para la síntesis de 30-oxoderivados

Los triterpenos **10**, (mezcla **15** + **17**), **33**, **35** o **40** (0.15 mmol) fueron disueltos en un matraz de 25 mL en la mínima cantidad de CH₂Cl₂. Se adicionó etanol (10 mL) y posteriormente se añadió SeO₂ (84.8 mg, 0.76 mmol) y la reacción se mantuvo en agitación constante, a reflujo durante 72 h.

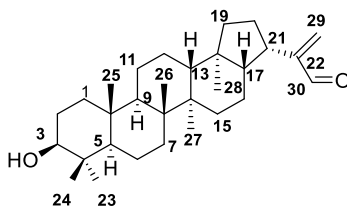
30-Oxo-acetato de hopenilo (38)



El crudo de la reacción utilizando el procedimiento general (Sección, 8.7) se concentró al vacío y la separación del compuesto **38** se llevó a cabo mediante ccf que se eluyó con el sistema *n*-Hex-AcOEt 9:1. El compuesto **38** (9.3 mg, 0.019 mmol, 60 %) se obtuvo como un sólido blanco.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 9.56 (s, 1H, H-30), 6.24 (s, 1H, H-29b), 5.98 (s, 1H, H-29a), 4.47 (m, H-3), 2.04 (s, 3H, H-2'), 1.75 (s, 3H, H-30), 0.96 (s, 3H, H-26), 0.93 (s, 3H, H-27), 0.85 (s, 3H, H-23), 0.84 (s, 3H, H-25), 0.83 (s, 3H, H-24), 0.72 (s, 3H, H-28).

30-Oxo-hopenol (39)



El crudo de la reacción utilizando el procedimiento general (Sección, 8.7) se concentró al vacío y la separación del compuesto **39** se llevó a cabo mediante ccf que se eluyó con el sistema *n*-Hex-AcOEt 8:2. El compuesto **39** (13.6 mg, 0.031 mmol, 66 %) se obtuvo como un sólido blanco.

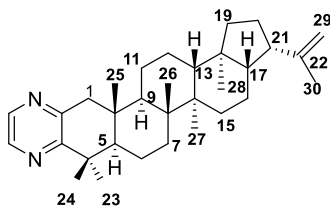
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): 9.51 (s, 1H, H-30), 6.29 (s, 1H, H-29b), 5.91 (s, 1H, H-29a), 3.17 (dd, $J = 10.7$ 1H, H-3), 1.75 (s, 3H, H-30), 0.96 (s, 3H, H-23), 0.92 (s, 3H, H-24), 0.81 (s, 3H, H-26), 0.75 (s, 6H, H-25, H-28).

8.9 Procedimiento general para síntesis de pirazinas

En un matraz se adicionó la hopenona (**34**) o lupenona (**28**) (0.23 mmol) en condiciones de agitación constante disuelta en la mínima cantidad de CH_2Cl_2 , posteriormente se agregó etilendiamina (1.5 mL, 25 mmol), azufre (200 mg, 6.25 mmol) y morfolina (15 mL). La reacción se mantuvo en condiciones de reflujo por 24 h. Transcurrido el tiempo de reacción se añadió H_2O (10 mL) y se realizó una extracción con AcOEt (10 mL x 3). La fase orgánica se lavó con 10 mL de HCl 10 % y luego con 10 mL de H_2O , finalmente se adicionaron 10 mL de una solución saturada de NaHCO_3 y luego 10 mL de H_2O .

[2,3-*b*]-Pirazina de hopenol (**40**)

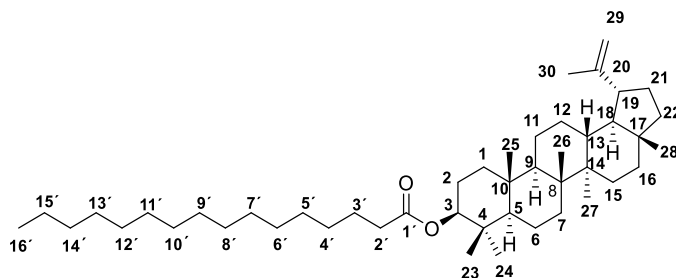
El crudo de la reacción utilizando el procedimiento general (Sección 8.8) se purificó mediante cromatografía en columna abierta con el sistema *n*-Hex-AcOEt 98:02. Se obtuvo el compuesto **40** (38.1 mg, 0.083 mmol; 35 %) como un sólido blanco.



R_f: 0.25 *n*-Hex-AcOEt (9:1).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 8.40 (s, 1H, H-pz), 8.26 (s, 1H, H-pz), 4.79 (brs, 2H, H-29), 3.05 (d, $J = 16.6$, 1H, H-1a), 2.50 (d, $J = 16.5$, 1H, H-1b), 1.76 (s, 3H, H- 30), 1.30 (s, 3H, H-24), 1.28 (s, 3H, H-23), 1.05 (s, 3H, H-26), 0.99 (s, 3H, H-27), 0.80 (s, 3H, H-25), 0.75 (s, 3H, H-28).

Palmitato de lupeól (15)²⁰⁵



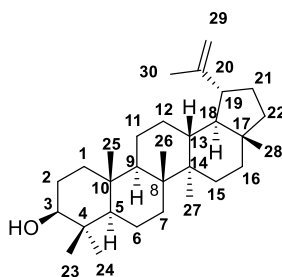
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 0.79 (s, 3H, H-28), 0.84 (s, 6H, H-25,16'), 0.86 (s, 3H, H-24), 0.87 (s, 3H, H-23), 0.94 (s, 3H, H-27), 1.02 (s, 3H, H-26), 1.25 (s, 20H, H4'-13'), 1.67 (s, 3H, H-30), 2.29 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, H-2'), 2.38 (td, 1H, *J* = 11, 5.8 Hz, H-19), 4.50 (dd, 1H, *J* = 9.2, 6.8 Hz, H-3) 4.69 (d, *J*=2.3 Hz, 1H, H-29b), 4.57 (m, 1H, H-29a).

RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ 173.68 (C-1'), 150.95 (C-20), 109.33 (C-29), 80.61 (C-3), 55.39 (C-5), 50.34 (C-9), 48.30 (C-18), 48.01 (C-19), 43.00 (C-17), 42.83 (C-14), 40.86 (C-8), 40.00 (C-22), 38.38 (C-1), 38.05 (C-13), 37.84 (C-4), 37.09 (C-10), 35.57 (C-16), 34.86 (C-2'), 34.22 (C-7), 31.92 (C-14'), 29.17-29.84 (C4'-13'), 29.69 (C-21), 27.97 (C-23), 27.44 (C-15), 25.11 (C-12), 25.17 (C-3'), 23.75 (C-2), 22.69 (C-15'), 20.95 (C-11), 19.28 (C-30), 18.21 (C-6), 18.00 (C-28), 16.57 (C-24), 16.17 (C-25), 15.98 (C-26), 14.52 (C-27), 14.11 (C-16').

8.10 Hidrólisis del palmitato de lupeño (15). Obtención de lupeol (10)

En un matraz bola, disuelto en la mínima cantidad de CH_2Cl_2 y en condiciones de agitación constante se adicionó palmitato de lupeño (200.3 mg, 0.301 mmol) y 10 mL de una solución de KOH/MeOH 10 %. Transcurrido el tiempo de reacción (24 h), al crudo resultante se le adicionó H_2O (10 mL) y se extrajo con AcOEt (3 x 10 mL). La fase orgánica se lavó con una solución saturada de NaCl y se trató con Na_2SO_4 . La separación del compuesto **10** se llevó a cabo por cca (2.5 cm de diámetro) con una suspensión de gel de sílice (10 g) en *n*-Hex-AcOEt 8:2, obteniéndose (115 mg, 0.271 mmol, 90 %), como un sólido cristalino. el cual se comparó por cromatografía en capa fina con una muestra de estándar de lupeol obtenida anteriormente en el laboratorio.

*Lupeol (10)*²⁰⁶



R_f: 0.5 *n*-Hex-AcOEt (8:2).

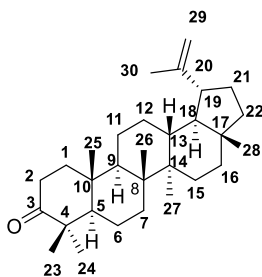
RMN ¹H (300 MHz, CDCl_3) δ 6.29 (s, 1H, H-29b), 5.92 (s, 1H, H-29a), 3.18 (dd, $J = 10.7, 5.3$ Hz, 1H, H-3), 2.73 (td, $J = 11.0, 5.6$ Hz, H-1, H-19), 1.68 (s, 3H, H-30), 1.01 (s, 3H, H-26), 0.96 (s, 3H, H-23), 0.96 (s, 3H, H-27), 0.82 (s, 3H, H-25), 0.81 (s, 3H, H-28), 0.75 (s, 3H, H-24).

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

8.11 Oxidación con PCC de 10. Obtención de lupenona (28)

A una solución de 100 mg de lupeol (**10**) (0.234 mmol) en 10 mL de CH₂Cl₂ anhidro se añadió clorocromato de piridinio (PCC) (200 g, 0.925 mmol), la mezcla se mantuvo a 25 °C y en condiciones de agitación constante por 6 h. Posteriormente el crudo de reacción se filtró a través de una columna de 2 cm de diámetro empacada con 5 g de sílice, se concentró al vacío y se purificó por cromatografía en columna abierta con *n*-Hex-AcOEt (98:02). Se obtuvo un sólido cristalino blanco (86 mg, 0.202 mmol, 86 %).

Lupenona (**28**)

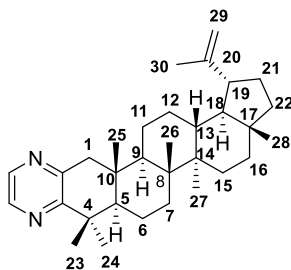


RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 4.63 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-29b), 4.50 (1H, dd, *J* = 2.6, 1.4 Hz, H-29a), 2.35 (1H, m, H-19), 1.62 (3H, s, H-30), 1.50 (1H, s, H-2b), 1.37 (1H, s, H-11), 1.00 (3H, s, H-26), 0.96 (6H, s, H-23, H-27), 0.81 (3H, s, H-25), 0.79 (3H, s, CH₃-24), 0.73 (3H, s, CH-28).

RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ 218.4 (C-3), 151.1 (C-20), 109.6 (C-29), 55.1 (C-5), 49.9 (C-9), 48.4 (C-18), 48.1 (C-19), 47.5 (C-4), 43.2 (C-17), 43.1 (C-14), 40.9 (C-8), 40.1 (C-22), 39.8 (C-1), 38.3 (C-13), 37.0 (C-10), 35.7 (C-16), 34.3 (C-2), 33.7 (C-7), 29.9 (C-21), 27.6 (C-15), 26.8 (C-23), 25.3 (C-12), 21.6 (C-11), 21.2 (C-24), 19.8 (C-6), 19.5 (C-30), 18.2 (C-28), 16.1 (C-25), 15.9 (C-26), 14.6 (C-27).

[2,3-*b*]-Pirazina de lupeol (**30**)

El crudo de la reacción utilizando el procedimiento general (Sección 8.8) se purificó mediante cromatografía en columna abierta con el sistema *n*-Hex-AcOEt (98:02). Se obtuvo el compuesto **30** (68.1 mg, 0.148 mmol; 65 %) como un sólido blanco.



R_f: 0.30 *n*-Hex-AcOEt (9:1) x 2. p.f. 162-164 °C

IR (CHCl₃) ν_{max}: 2950, 2871, 1640, 1454, 1433, 1403, 1382, 1239, 1232, 1212, 1195, 1184, 1138, 1107, 1064, 1028, 1012, 961, 918, 888, 853 cm⁻¹.

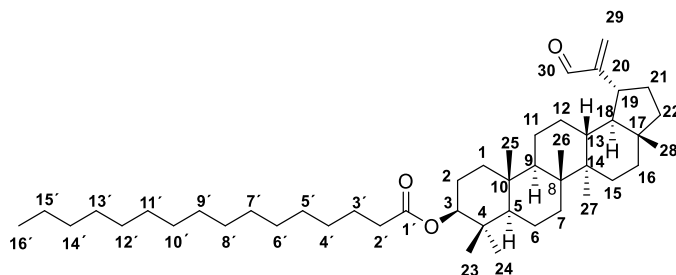
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8.41 (s, 1H, H-pz), 8.27 (s, 1H, H-pz), 4.71 (d, *J* = 2.4, 1H, H-29a), 4.60 (m, 1H, H-29b), 3.03 (d, *J* = 16.7, 1H, H-1a), 2.45(d, *J* = 16.7, 1H, H-1b), 1.70 (s, 3H, H- 30), 1.30 (s, 3H, H-24), 1.28 (s, 3H, H-23), 1.11 (s, 3H, H-26), 1.00 (s, 3H, H-27), 0.81 (s, 6H, H- 25, H-28).

RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ 159.94 (C-3), 150.99 (C-2), 150.93 (C-20), 142.43 (C-pz 1), 141.46 (C-pz 2), 109.61 (C-29), 53.15 (C-5), 48.81 (C-18), 48.77 (C-1), 48.37 (C-9), 48.11 (C-19), 43.20 (C-17), 43.06 (C-14), 40.85 (C-8), 40.13 (C-22), 39.65 (C-4), 38.32 (C-13), 36.93 (C-10), 35.67 (C-16), 33.44 (C-7), 31.66 (C-23), 30.03 (C-21), 27.61 (C-15), 25.30 (C-12), 24.20 (C-24), 21.64 (C-11), 20.28 (C-6), 19.52 (C-30), 18.19 (C-28), 16.28 (C-6), 15.75 (C-26), 14.69 (C-27).

EMAR-ESI+ *m/z* 461.38876 [M + H]⁺ (calculado para C₃₂H₄₉N₂: 461.38957)

30-Oxo-palmitato de lupeól (26)¹⁰¹

A la mezcla de triterpenos **15** + **17** (100.2 mg, 0.15 mmol) en EtOH (10 mL) se le añadió SeO₂ (84.8 mg, 0.76 mmol) y se calentó a reflujo durante 72 h. El crudo de la reacción utilizando el procedimiento general (Sección 8.7) se purificó mediante cromatografía en columna abierta con el sistema *n*-Hex-AcOEt 98:02. Se obtuvo el compuesto **26** (51 mg, 0.072 mmol, 68 %) como un sólido blanco.

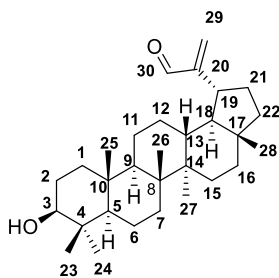


R_f: 0.6 *n*-Hex-AcOEt (9:1), p.f. 82-84 °C.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 9.51 (s, 1H, H-30), 6.29 (s, 1H, H-29b), 5.91 (s, 1H, H-29a), 4.46 (dd, *J* = 10.3, 5.7 Hz, 1H, H-3), 2.75 (td, *J* = 11, 5.8 Hz, 1H, H-19) 2.28 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H-2'), 1.24 (s, 20H, H-4'-13'), 1.01 (s, 3H, H-26), 0.92 (s, 3H, H-27), 0.83 (s, 9H, H-23, 24, 16'), 0.81 (s, 6H, s, H-25, H-28).

RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ 195.25 (C-30), 173.86 (C-1'), 157.31 (C-20), 133.36 (C-29), 80.71 (C-3), 55.51 (C-5), 50.28 (C-9, C-18), 43.41 (C-17), 42.82 (C-14), 40.93 (C-8), 40.07 (C-22), 38.50 (C-4), 37.97 (C-1), 37.85 (C-13), 37.19 (C-10), 35.52 (C-16, C-19), 35.01 (C-2'), 34.34 (C-7), 32.80 (C-21), 32.08 (C-14'), 29.82 (C-4'-C-13'), 28.11 (C-23), 27.77 (C-3'), 27.46 (C-15), 25.32 (C-12), 23.86 (C-2), 22.85 (C-15'), 21.09 (C-11), 18.32 (C-6), 17.94 (C-28), 16.72 (C-24), 16.26 (C-25), 16.08 (C-26), 14.52 (C-24), 14.28 (C-16').

30-Oxo-lupeol (**24**)



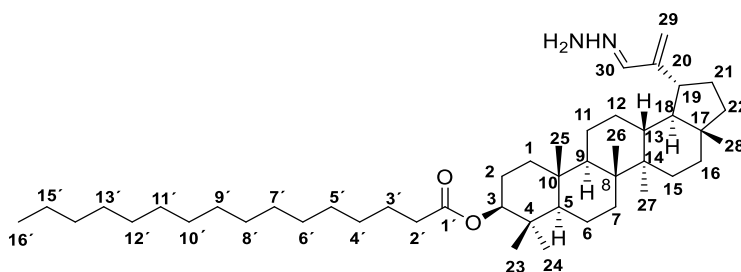
El crudo de la reacción utilizando el procedimiento general (Sección, 8.7) se concentró al vacío y la separación del compuesto **24** se llevó a cabo mediante una cromatografía en placa preparativa que se eluyó con el sistema *n*-Hex-AcOEt 8:2. El compuesto **24** (58.9 mg, 0.133 mmol, 56 %) se obtuvo como un sólido blanco.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 9.52 (s, 1H, H-30), 6.29 (s, 1H, H-29b), 5.9 (s, 1H, H-29a), 3.18 (dd, *J* = 10.7, 5.32 Hz, 1H, H-3), 2.73 (td, *J* = 11, 5.6 Hz, 1H, H-19), 1.01 (s, 3H, H-26), 0.96 (s, 3H, H-23), 0.96 (s, 3H, H-27), 0.82 (s, 3H, H-25), 0.81 (s, 3H, H-28), 0.75 (s, 3H, H-24).

8.12 Procedimiento general para la síntesis de 30-hidrazonas

En un vial de 4 mL, disuelto en la mínima cantidad de CH₂Cl₂ y en condiciones de agitación constante se adicionó el aldehído **24** o **26** (0.030 mmol), hidrocloreto de hidrazina (0.015 mmol) y 3 mL de EtOH. La reacción se mantuvo en agitación constante y a 25 °C por 2 h.

Hidrazona de 30-oxo-palmitato de lupeólo (42)



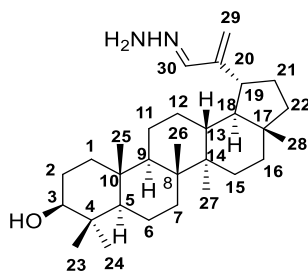
El crudo de la reacción utilizando el procedimiento general (Sección, 8.11) fue purificado por ccfc con el sistema de elución *n*-Hex-AcOEt 9:1. Se obtuvo **42** (17 mg, 0.024 mmol, 85 %) como un sólido amarillo.

R_f: 0.27 *n*-Hex-AcOEt (95:05).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 8.06 (s, 1H, H-30), 5.62 (s, 1H, H-29b), 5.42 (s, 1H, H-29a), 4.45 (m, 1H, H-3), 2.93 (m, 1H, H-19), 2.28 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-2'), 1.25 (s, 20H, H-4'-13'), 1.21 (s, 3H, H-26), 0.92 (s, 3H, H-27), 0.83 (s, 9H, H-23, 24, 16'), 0.81 (s, 6H, H-25, H-28).

EMAR-ESI+ *m/z* 693.62633[M+H]⁺ (calculado para C₅₂H₈₁N₂O₂: 693.62980)

Hidrazona de 30-Oxo-lupeol (47)



El crudo de la reacción utilizando el procedimiento general (Sección, 8.11) fue El crudo de la reacción utilizando el procedimiento general (Sección, 8.11) fue purificado por ccf con el sistema de elución *n*-Hex-AcOEt 6:4. Se obtuvo **47** (11 mg, 0.024 mmol, 84 %) como un sólido amarillo.

R_f: 0.58 *n*-Hex-AcOEt (6:4). p. f. 140-142 °C

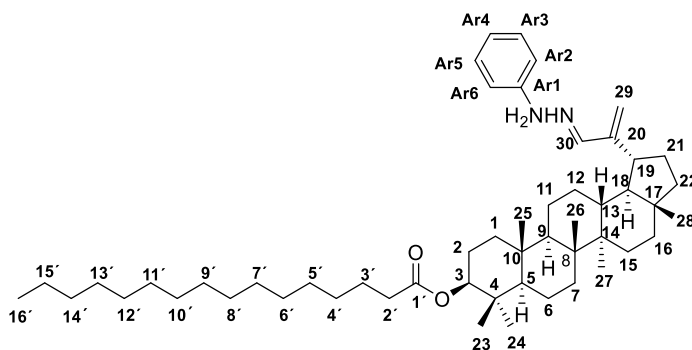
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 8.07 (s, 1H, H-30), 5.62 (s, 1H, H-29b), 5.42 (s, 1H, H-29a), 3.17 (dd, *J* = 11.0, 5.6 Hz, 1H, H-3), 1.0 (s, 3H, H-26), 0.96 (s, 3H, H-23), 0.94 (s, 3H, H-27), 0.81 (s, 3H, H-25), 0.80 (s, 3H, H-28), 0.75 (s, 3H, H-24).

8.13 Procedimiento general para la obtención de 30-fenilhidrazonas

En un vial de microondas, disuelto en la mínima cantidad de CH₂Cl₂ y en condiciones de agitación constante se adicionó el aldehído, **24** o **26** (0.030 mmol), hidrocloreuro de fenilhidrazina (0.09 mmol) y 3 mL de EtOH. La reacción anterior se calentó en el reactor de microondas durante 10 min a una temperatura de 80 °C.

Fenilhidrazona de 30-oxo-palmitato de lupeólo (44)

El crudo de la reacción utilizando el procedimiento general (Sección, 8.12) fue purificado por ccf preparativa con el sistema de elución *n*-Hex-AcOEt 9:1. Se obtuvo **44** (15 mg, 0.029 mmol, 67 %) como un sólido amarillo.



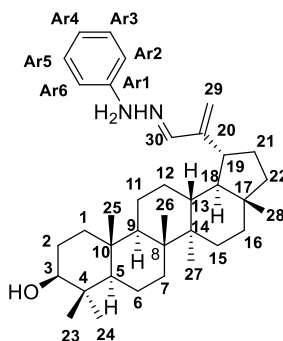
R_f: 0.55 *n*-Hex-AcOEt (9:1).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.36 (m, 2H, H-Ar3,5), 7.22 (m, 1H, H-30), 7.03 (m, 2H, H-Ar2, 6), 6.84 (m, 1H, H-Ar4), 5.27 (s, 1H, H-29b), 5.04 (s, 1H, H-29a), 4.44 (dd, *J* = 10.6, 5.5 Hz, 1H, H-3), 2.92 (m, 1H, H-19), 2.27 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-2'), 1.25 (s, 20H, H-4'-13'), 1.04 (s, 3H, H-26), 0.92 (s, 3H, H-27), 0.83 (s, 15H, H-23, 24, 16, 25, 28).

RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ 173.85 (C-1'), 145.00 (C-20), 140.75 (C-20), 129.35 (C-Ar3,5), 129.06 (C-Ar4), 119.98 (C-29), 112.68 (C-Ar2,6), 80.73 (C-3), 55.54 (C-5), 50.34 (C-9, C-18), 43.20 (C-17), 42.89 (C-14), 40.94 (C-8), 40.07 (C-19, C-22), 38.42 (C-4), 38.09 (C-1), 37.91 (C-13), 37.15 (C-10), 35.78 (C-16), 34.96 (C-1, C-2'), 34.31 (C-7), 32.80 (C-21), 32.02 (C-14'), 29.77 (C-4'-C-13'), 28.06 (C-23), 27.58 (C-3', C-15), 25.26 (C-12), 23.81 (C-2), 22.80 (C-15'), 21.13 (C-11), 18.20 (C-6), 18.06 (C-28), 16.67 (C-24), 16.26 (C-25), 16.10 (C-26), 14.66 (C-24), 14.283 (C-16').

Fenilhidrazona de 30-oxo-lupeol (48)

El crudo de la reacción utilizando el procedimiento general (Sección, 8.12) fue purificado por ccf preparativa con el sistema de elución *n*-Hex-AcOEt 7:3. Se obtuvo **48** (9.5 mg, 0.018 mmol, 60 %) como un sólido amarillo.



R_f: 0.5 *n*-Hex-AcOEt (7:3).

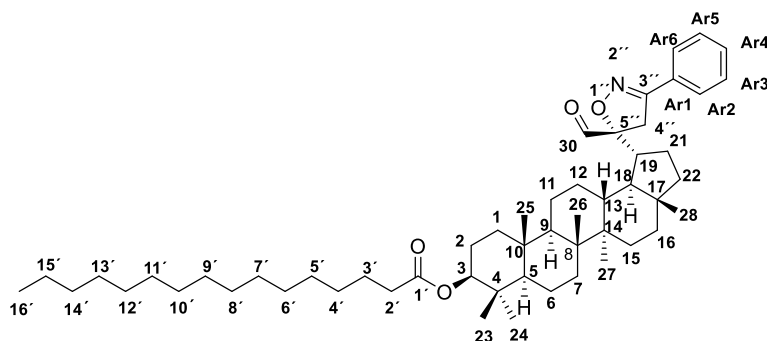
EMAR-ESI+ *m/z* 531.43079[M+H]⁺ (calculado para C₃₆H₅₅N₂O: 531.43144)

RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) δ 7.36 (m, 2H, H-Ar3,5), 7.23 (m, 1H, H-30), 7.03 7.36 (m, 2H, H-Ar2,6), 6.84 (m, 1H, H-Ar4), 5.26 (s, 1H, H-29b), 5.04 (s, 1H, H-29a), 3.14 (dd, *J* = 11.0, 5.6 Hz, 1H, H-3), 1.0 (s, 3H, H-26), 0.95 (s, 3H, H-23, H-27), 0.87 (s, 3H, H-25), 0.80 (s, 3H, H-28), 0.75 (s, 3H, H-24).

8.14 Procedimiento general para la síntesis de isoxazolina

En un matraz bola, disuelto en la mínima cantidad de CH_2Cl_2 y en condiciones de agitación constante se adicionó el aldehído **26** (0.030 mmol), 0.1 mL de benzaldoxima (0.91mmol) y cloramina T (0.052 mmol) en 2 mL de EtOH. La reacción se mantuvo en condiciones de agitación constante a reflujo por 3 h. Transcurrido el tiempo de reacción se añadió H_2O (10 mL) y se realizó una extracción con CH_2Cl_2 (5 mL x 2) La fase orgánica se trató con Na_2SO_4 , se evaporó el disolvente. La purificación se llevó a cabo por ccf preparativa con el sistema de elución *n*-Hex-AcOEt 9:1. Se obtuvo **65** (4 mg, 0.004 mmol, 17 %) como un aceite.

19-Isoxazolina derivada del 30-oxo-palmitato de lupeólo (65)



R_f: 0.38 *n*-Hex-AcOEt (9:1).

RMN ^1H (700 MHz, CDCl_3) δ 9.57 (s, 1H, H-30), 7.68 (m, 2H, H-Ar2, 6), 7.39 (m, 3H, H-Ar3-5), 4.49 (dd, $J = 11.5, 5.0$ Hz, 1H, H-3), 3.76 (d, $J = 16.5$ Hz, H-4'), 3.06 (d, $J = 16.5$ Hz, H-4'), 2.48 (td, $J = 10.56$ Hz, 4.7 Hz, 1H, H-19), 1.25 (s, 20H, H-4'-13'), 1.05 (s, 3H, H-26), 0.88 (s, 3H, H-27), 0.87 (s, 3H, H-23), 0.85 (s, 3H, H-24), 0.84 (s, 3H, H-16'), 0.83 (s, 6H, s, H-25, H-28).

RMN ^{13}C (175 MHz, CDCl_3) δ 195.57 (C-30), 173.84 (C-1'), 157.61 (C-3'), 130.60 (C-Ar1), 128.89 (C-Ar4), 128.49 (C-Ar3, Ar5), 126.97 (C-Ar2, Ar6), 95.14 (C-5'), 80.66 (C-3), 55.43 (C-5), 50.72 (C-9), 49.98 (C-18), 44.85 (C-17), 43.76 (C-14), 43.27 (C-19), 41.21 (C-8), 39.88 (C-22), 38.50 (C-4), 38.00 (C-1), 37.85 (C-13), 37.24 (C-10), 37.20 (C-4'), 35.48 (C-16), 35.01 (C-2'), 34.47 (C-7), 32.08 (C-14'), 31.74 (C-21), 29.86 (C-4'-C-13'), 28.14 (C-23), 27.16 (C-3'), 26.65 (C-15), 25.34 (C-12), 23.90 (C-2'), 22.85 (C-15'),

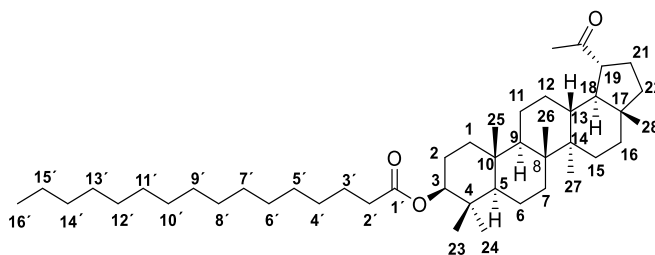
21.16 (C-11), 18.73(C-6, C-28, 16.72 (C-24), 16.26 (C-25), 16.08 (C-26), 14.28 (C-24, C-16').

8.15 Procedimiento general para la síntesis de 20-oxoderivados¹⁶⁷

En un matraz bola se adicionaron los triterpenos **10**, **15** o **30** (0.07 mmol) en condiciones de agitación constante disueltos en la mínima cantidad de CH₂Cl₂, posteriormente se agregó una mezcla de dioxano y agua (3.5 y 0.5 mL respectivamente) y 0.5 mL de una solución de OsO₄ en *ter*-butanol (1.5 mL, 25 mmol). La reacción se mantuvo en agitación constante hasta que adquirió una coloración gris oscuro (3 h) y se adicionó NaIO₄ (0.7 mmol) en pequeñas porciones, la reacción se mantuvo en agitación constante durante 72 h a 25 °C. Transcurrido el tiempo de reacción se añadió H₂O (10 mL) y se realizó una extracción con AcOEt (10 mL x 3). La fase orgánica se trató con Na₂SO₄, se evaporó el disolvente a presión reducida.

Palmitato de 29-nor-20-oxolupeílo (53)

El crudo de la reacción utilizando el procedimiento general (Sección, 8.14) fue purificado por CC (10 cm altura x 1.5 cm de diámetro) eluída con un gradiente *n*-Hex-AcOEt 100.00-95:05. Se obtuvo el compuesto **53** (93 mg, 0.139 mmol; 40 %) como un sólido blanco.



R_f: 0.5 *n*-Hex-AcOEt (6:4), p.f. 98-100 °C

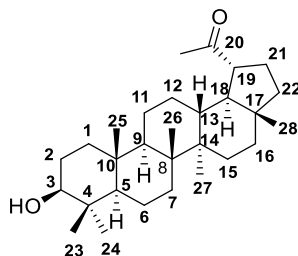
RMN ¹H (700 MHz, CDCl₃) δ 4.47 (dd, *J* = 11.5, 4.8 Hz, 1H, H-3), 2.57 (td, *J* = 11.3, 5.8 Hz, 1H, H-19), 2.28 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H-2'), 2.15 (s, 3H, H-30), 1.25 (s, 20H, H-4'-13'), 1.02 (s, 3H, H-26), 0.96 (s, 3H, H-27), 0.84 (s, 9H, H-23, 24, 16'), 0.77 (s, 6H, s, H-25, H-28).

RMN ^{13}C (175 MHz, CDCl_3) δ 213.01 (C-20), 173.81 (C-1'), 80.71 (C-3), 55.50 (C-5), 52.88 (C-19), 50.32 (C-9), 49.88 (C-18), 43.21 (C-17), 42.83 (C-14), 40.91 (C-8), 40.01 (C-22), 38.49 (C-1), 38.00 (C-13), 37.25 (C-4), 37.18 (C-10), 35.12 (C-16), 35.01 (C-2'), 34.28 (C-7), 32.08 (C-14'), 29.85 (C-4'-C-13'), 29.16 (C-30), 28.13 (C-23), 27.76 (C-12), 27.47 (C-21), 27.26 (C-15), 25.33 (C-3'), 23.87 (C-2), 22.85 (C-15'), 21.07 (C-11), 18.33 (C-6), 18.14 (C-28), 16.73 (C-24), 16.29 (C-25), 16.07 (C-26), 14.60 (C-27), 14.27 (C-16').

EMAR-ESI+ m/z 667.60176 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calculado para $\text{C}_{45}\text{H}_{79}\text{O}_3$: 667.60292).

*29-Nor-20-oxolupeol (57)*¹⁷⁷

El crudo de la reacción utilizando el procedimiento general (Sección, 8.14) fue purificado por ccf preparativa con el sistema de elución *n*-Hex-AcOEt 7:3. Se obtuvo **57** (12.6 mg, 0.029 mmol, 42 %) como un sólido blanco.



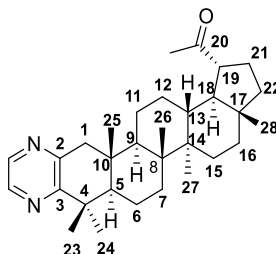
R_f: 0.25 *n*-Hex-AcOEt (7:3)

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 3.18 (dd, $J = 11.3, 4.96$ Hz, 1H, H-3), 2.57 (td, $J = 11.3, 5.9$ Hz, 1H, H-19), 2.14 (s, 3H, H-30), 1.01 (s, 3H, H-26), 0.96 (s, 6H, H-23, 27), 0.82 (s, 3H, H-25), 0.77 (s, 3H, H-28), 0.75 (s, 3H, H-24).

RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 213.10 (C-20), 79.05 (C-3), 55.38 (C-5), 52.76 (C-19), 50.39 (C-9), 49.82 (C-18), 43.19 (C-17), 42.81 (C-14), 40.86 (C-8), 39.99 (C-22), 38.99 (C-4), 38.79 (C-1), 37.31 (C-10), 37.15 (C-13), 35.10 (C-16), 34.32 (C-7), 29.32 (C-30), 28.13 (C-23), 27.79 (C-21), 27.51 (C-2), 27.45 (C-15), 27.32 (C-12), 21.03 (C-11), 18.43 (C-6), 18.13 (C-28), 16.23 (C-25), 16.05 (C-26), 15.53 (C-24), 14.61 (C-27).

[2,3-*b*]-Pirazina de 29-nor-20-oxolupano (**61**)

El crudo de la reacción utilizando el procedimiento general (Sección, 8.14) fue purificado por ccf preparativa con el sistema de elución *n*-Hex-AcOEt 6:4 dos veces. Se obtuvo el compuesto **61** (12.2 mg, 0.026 mmol; 38 %) como un sólido blanco.



R_f: 0.5 *n*-Hex-AcOEt (6:4) x 2. p.f. 243-245 °C

IR (CHCl₃) ν_{max}: 2958, 2859, 1705, 1603, 1455, 1433, 1404, 1382, 1188, 1138, 1110, 918 cm⁻¹.

RMN ¹H (700 MHz, CDCl₃) δ: 8.40 (s, 1H, H-pz2), 8.27 (s, 1H, H-pz1), 3.02 (d, *J* = 16.5, 1H, H-1b), 2.45 (d, *J* = 16.5, 1H, H-1a), 2.18 (s, 3H, H-30), 1.30 (s, 3H, H-24), 1.28 (s, 3H, H-23), 1.10 (s, 3H, H-26), 1.02 (s, 3H, H-27), 0.81 (s, 3H, H-25), 0.80 (s, 3H, H-28).

RMN ¹³C (175 MHz, CDCl₃) δ 212.92 (C-20), 159.81 (C-3), 150.95 (C-2), 142.46 (C-pz 1), 141.66 (C-pz 2), 53.14 (C-5), 52.69 (C-19), 49.69 (C-18), 48.78 (C-1), 48.67 (C-9), 43.24 (C-17), 42.93 (C-14), 40.77 (C-8), 39.98 (C-22), 39.65 (C-4), 37.31 (C-13), 36.94 (C-10), 35.07 (C-16), 33.37 (C-7), 31.66 (C-23), 29.46 (C-30), 27.84 (C-21), 27.51 (C-15), 27.37 (C-12), 24.20 (C-24), 21.61 (C-11), 20.26 (C-6), 18.17 (C-28), 16.25 (C-25), 15.68 (C-26), 14.63 (C-27).

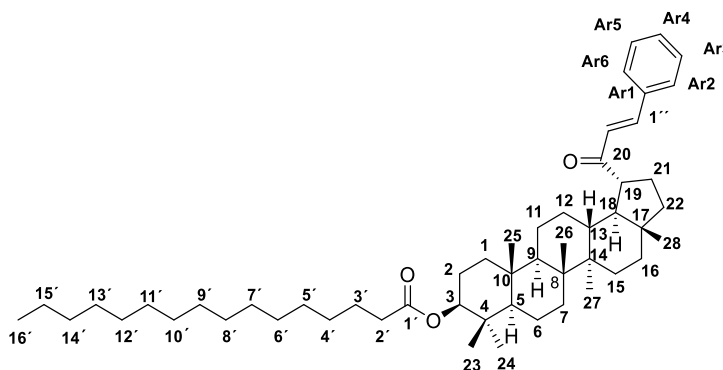
EMAR-ESI+ *m/z* 462.3595 [M]⁺ (calculada para C₃₁H₄₆N₂O: 462.3610)

8.16 Procedimiento general para la síntesis de 30-bencilidenderivados

En un vial de 4 mL se adicionaron los triterpenos **53**, **57** o **61** (0.045 mmol) en condiciones de agitación constante disueltos en la mínima cantidad de CH₂Cl₂, posteriormente se agregó una solución de 10 % KOH / EtOH (3 mL) y benzaldehído (0.09 mmol). La reacción se mantuvo condiciones de agitación constante durante 24 h a 25 °C. Transcurrido el tiempo de reacción el sólido formado se filtró y se lavó con EtOH.

Palmitato de 29-nor-30-bencilidenlupeilo (54)

El crudo de la reacción utilizando el procedimiento general (Sección, 8.15) se disolvió en CH₂Cl₂ y fue purificado mediante ccf preparativa con el sistema de elución *n*-Hex-AcOEt 6:4 una vez. Se obtuvo el compuesto **54** (28.8 mg, 0.04 mmol; 85 %) como un sólido amarillo.



R_f: 0.6 *n*-Hex-AcOEt (6:4).

RMN ¹H (700 MHz, Acetona) δ 7.7 (m, 2H, H-Ar2, 6), 7.64 (d, *J* = 16.2, 1H, H-1'), 7.43 (m, 2H, H-Ar3, 5), 6.94(d, *J* = 16.2, 1H, H-30), 4.44 (dd, *J* = 11.3, 5.1 Hz, 1H, H-3), 3.07 (td, *J* = 11.2, 5.8 Hz, 1H, H-19), 2.28 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H-2'), 1.28 (s, 20H, H-4'-13'), 1.08 (s, 3H, H-26), 1.02 (s, 3H, H-27), 0.88 (s, 9H, H-23, 24, 16'), 0.86 (s, 6H, s, H-25, H-28).

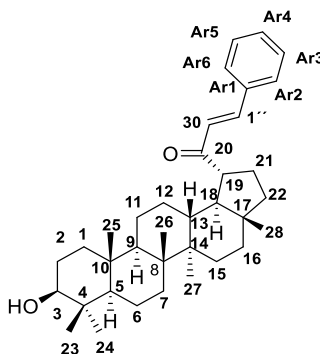
RMN ¹³C (175 MHz, Acetona) δ 203.55 (C-20), 173.35 (C-1'), 142.58 (C-1'), 136.04 (C-Ar1), 131.04 (C-Ar4), 129.80 (C-Ar3, 5), 129.19 (C-Ar2, 6), 127.58 (C-30), 80.84 (C-3), 56.11(C-5), 51.04 (C-9), 50.54 (C-18), 50.03 (C-19), 43.81 (C-17), 43.54 (C-14), 41.60 (C-8), 40.89 (C-22), 39.02 (C-4), 38.52 (C-1), 38.07 (C-13), 37.89 (C-10), 35.85 (C-16), 35.07 (C-2'), (34.94 (C-7), 32.65 (C-14'), 29.11 (C-23), 28.38 (C-3'), 28.36 (C-21), 28.24 (C-15)

(25.85 (C-12), 24.49 (C-2), 23.34 (C-15'), 21.75 (C-11), 18.93 (C-6), 18.43 (C-28), 17.01 (C-24), 16.56 (C-25), 16.40 (C-26), 14.92 (C-27), 14.36 (C-16').

EMAR-ESI+ m/z 755.63371 [M+H]⁺ (calculado para C₅₂H₈₃O₃: 755.63422).

29-Nor-30-bencilidenlupeol (58)

El crudo de la reacción utilizando el procedimiento general (Sección, 8.15) se disolvió en CH₂Cl₂ y fue purificado mediante ccf preparativa con el sistema de elución *n*-Hex-AcOEt 7:3, una vez. Se obtuvo el compuesto **58** (17.6 mg, 0.034 mmol; 76 %) como un sólido amarillo.



R_f: 0.33 *n*-Hex-AcOEt (7:3).

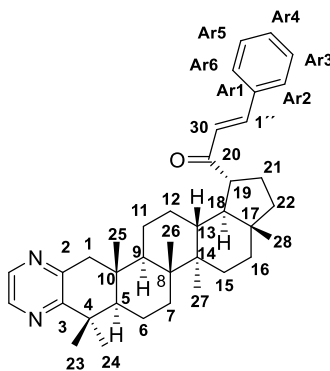
RMN ¹H (400MHz, CDCl₃): δ 7.57 (m, 2H, H-Ar2,6), 7.53 (d, *J* = 15.8, 1H, H-1'), 7.38 (m, 2H, H-Ar3,5), 6.78 (d, *J* = 16.1, 1H, H-30), 3.17 (dd, *J* = 11.2, 4.90 Hz, 1H, H-3), 2.90 (td, *J* = 11.2, 5.9 Hz, 1H, H-19), 1.02 (s, 3H, H-26), 0.98 (s, 3H, H-23), 0.96 (s, 3H, H-27), 0.85 (s, 3H, H-25), 0.80 (s, 3H, H-28), 0.75 (s, 3H, H-24).

RMN ¹³C (175 MHz, CDCl₃) δ 203.32 (C-20), 142.39 (C-1'), 136.52 (C-Ar1), 130.46 (C-Ar4), 129.06 (C-Ar3, 5), 128.45 (C-Ar2, 6), 126.43 (C-30), 79.05 (C-3), 55.37 (C-5), 50.38 (C-9, C-19), 50.06 (C-18), 43.31 (C-17), 42.94 (C-14), 40.87 (C-8), 40.29 (C-22), 38.99 (C-4), 38.76 (C-1), 37.31 (C-10, C-13), 35.22 (C-16), 34.34 (C-7), 28.73 (C-23), 28.13 (C-21), 27.79 (C-2), 27.51 (C-12, C-15), 21.11 (C-11), 18.44 (C-6), 18.32 (C-28), 16.21 (C-25), 16.07 (C-26), 14.67 (C-24), 14.35 (C-27).

EMAR-ESI+ m/z 517.40567 [M+H]⁺ (calculado para C₃₆H₅₃O₂: 517.40455)

[2,3-*b*]-Pirazina de 29-nor-30-bencilidenupeol (**62**)

El crudo de la reacción utilizando el procedimiento general (Sección, 8.15), se redisolvió en CH₂Cl₂ y fue purificado mediante ccf preparativa con el sistema de elución *n*-Hex-AcOEt 6:4, una vez. Se obtuvo el compuesto **62** (15 mg, 0.027 mmol; 60 %).



R_f: 0.64 (*n*-Hex-AcOEt 6:4 X 1).

RMN ¹H (700 MHz, Acetona) δ 8.39 (s, 1H, H-pz2), 8.26 (s, 1H, H-pz1), 7.73 (m, 2H, H-Ar2,6), 7.67 (d, *J* = 16.2, 1H, H-1''), 7.43 (m, 2H, H-Ar3,5), 6.97 (d, *J* = 16.2, 1H, H-30), 2.95 (d, *J* = 16.5, 1H, H-1b), 2.52 (d, *J* = 16.5, 1H, H-1a), 1.30 (s, 3H, H-24), 1.27 (s, 3H, H-23), 1.17 (s, 3H, H-26), 1.02 (s, 3H, H-27), 0.92 (s, 3H, H-25), 0.80 (s, 3H, H-28).

RMN ¹³C (175 MHz, Acetona) δ 203.55 (C-20), 159.89 (C-3), 151.55 (C-2), 143.19 (C-1''), 142.65 (C-pz1), 142.60 (C-pz 2), 136.06 (C-Ar1), 131.06 (C-Ar4), 129.82 (C-Ar3, 5), 129.21 (C-Ar2, 6), 127.58 (C-30), 54.97 (C-5), 53.63 (C-19), 49.69 (C-18), 49.24 (C-1), 48.67 (C-9), 43.85 (C-17), 43.63 (C-14), 41.43 (C-8), 40.89 (C-22), 40.16 (C-4), 38.23 (C-13), 37.52 (C-10), 35.82 (C-16), 34.07 (C-7), 31.82 (C-23), 29.14 (C-21), 28.45 (C-15), 28.27 (C-12), 24.43 (C-24), 22.31 (C-11), 20.84 (C-6), 18.45 (C-28), 16.46 (C-25), 15.99 (C-26), 14.91 (C-27)

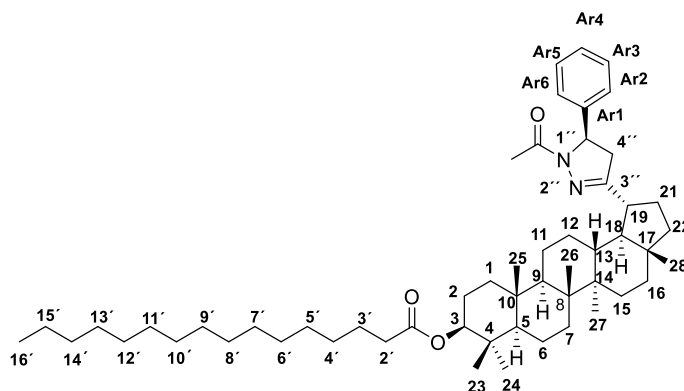
EMAR-ESI+ *m/z*: 551.39798 [M+H]⁺ (calculado para C₃₈H₅₁N₂O: 551.40014)

8.17 Procedimiento general para la síntesis de *N*-acetilpirazolinas

En un matraz bola de 5 mL se adicionaron los bencilidenderivados **54**, **58** y **62** (0.045 mmol), en ácido acético (1 mL), en condiciones de agitación constante disueltos en la mínima cantidad de CH₂Cl₂, posteriormente se agregó hidrazina monohidratada (0.09 mmol). La reacción se mantuvo condiciones de agitación constante a reflujo durante 24 h. Transcurrido el tiempo de reacción el sólido formado se filtró y se lavó con EtOH

(5′*R*)-*N*-Acetil-5′′-fenil-pirazolina de palmitato de lupeólo (**55**)

El crudo obtenido de la reacción, utilizando el procedimiento general, se redisolvió en CH₂Cl₂ y fue purificado mediante ccf preparativa con el sistema de elución *n*-Hex-AcOEt 9:1 (eluida dos veces). Se obtuvo el compuesto **55** (4 mg, 0.0049 mmol; 11 %) y **56** (3 mg, 0.0037 mmol; 8.2 %).



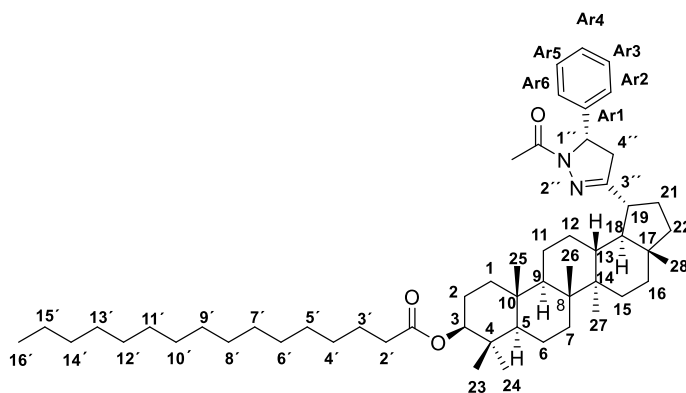
R_f: 0.2 *n*-Hex-AcOEt (9:1).

IR (CHCl₃) ν_{max}: 2929, 2856, 1720, 1646, 1459, 1424, 1384, 1362 cm⁻¹.

RMN ¹H (700 MHz, CDCl₃) δ 7.30 (t, 2H, H-Ar3, 5), 7.23 (m, 1H, H-Ar4), 7.14 (d, 2H, *J* = 7.2, H-Ar2,6), 5.45 (dd, *J* = 11.3, 3.8 Hz, 1H, H-5′′), 4.50 (dd, *J* = 11.6, 4.9 Hz, 1H, H-3), 3.32 (d, *J* = 17.7, 11.6 Hz, 1H, H-4′′), 2.64 (d, *J* = 17.7, 3.9 Hz, 1H, H-4′′), 2.8 (td, *J* = 11.3, 5.9 Hz, 1H, H-19), 2.29 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H-2′), 2.28 (s, 3H, N-Ac-CH₃), 1.25 (s, 20H, H-4′-13′), 1.04 (s, 3H, H-26), 0.93 (s, 3H, H-27), 0.87 (s, 9H, H-23, 24, 16′), 0.85 (s, 3H, s, H-25), 0.82 (s, 3H, s, H-28).

RMN ^{13}C (175 MHz, CDCl_3) δ 173.35 (C-1'), 168.28 (C-NCOCH $_3$), 163.95 (C-3'), 142.20 (C-Ar1), 129.00 (C-Ar3, 5), 127.61 (C-Ar4), 125.42 (C-Ar2, 6), 80.65 (C-3), 59.14 (C-5'), 56.11(C-5), 50.42 (18), 50.04 (C-9), 43.31 (C-17), 42.89 (C-14), 42.20 (C-4'), 41.01 (C-19), 40.99 (C-8), 39.95 (C-22), 38.56 (C-4), 38.02 (C-1), 37.64 (C-13), 37.27 (C-10), 35.3 (C-16), 35.02 (C-2'), 34.32 (C-7), 32.08 (C-14'), 29.81 (C-4'-13'), 28.26 (C-21), 28.13 (C-23), 27.39 (C-3'), 26.87 (C-15), 25.33 (C-12), 23.89 (C-2), 22.85 (C-15'), 22.10 (C-NCOCH $_3$), 21.04 (C-11), 18.33 (C-6), 17.87 (C-28), 16.73 (C-24), 16.33 (C-25), 16.08 (C-26), 14.54 (C-27), 14.27 (C-16').

(5''S)-N-Acetil- 5''-fenil-pirazolina de palmitato de lupeílo (**56**)



R_f: 0.14 *n*-Hex-AcOEt (9:1).

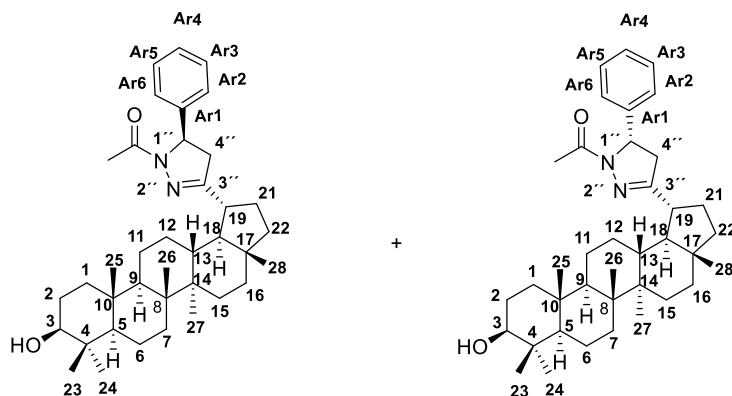
IR (CHCl_3) ν_{max} : 2929, 2856, 1720, 1646, 1459, 1424, 1384, 1362 cm^{-1} .

RMN ^1H (700 MHz, CDCl_3) δ 7.29 (t, 2H, H-Ar3,5), 7.23 (m, 1H, H-Ar4), 7.12 (d, 2H, $J = 7.2$, H-Ar2, 6), 5.47 (dd, $J = 11.3, 4.3$ Hz, 1H, H-5''), 4.47 (dd, $J = 11.6, 4.9$ Hz, 1H, H-3), 3.35 (d, $J = 17.7, 11.6$ Hz, 1H, H-4'), 2.67 (d, $J = 17.7, 4.4$ Hz, 1H, H-4'), 2.74 (td, $J = 11.2, 6$ Hz, 1H, H-19), 2.29 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, H-2'), 2.32 (s, 3H, N-Ac-CH $_3$), 1.25 (s, 20H, H-4'-13'), 1.00 (s, 3H, H-26), 0.88 (s, 3H, H-16'), 0.85 (s, 3H, H-25), 0.83 (s, 6H, s, H-23, 24), 0.80 (s, 3H, s, H-28), 0.78 (s, 3H, s, H-27).

RMN ^{13}C (175 MHz, CDCl_3) δ 173.88 (C-1'), 168.48 (C-NOCOCH $_3$), 163.94 (C-3'), 142.03 (C-Ar1), 128.78 (C-Ar3, 5), 127.56 (C-Ar4), 125.45 (C-Ar2, 6), 80.67 (C-3), 59.11 (C-5'), 58.48 (C-5), 50.64 (18), 50.28 (C-9), 43.28 (C-17), 42.82 (C-14), 42.44 (C-4'),

40.93 (C-19), 40.92 (C-8), 39.89 (C-22), 38.40 (C-4), 37.97 (C-1), 37.49 (C-13), 37.17 (C-10), 35.34 (C-16), 35.02 (C-2'), 34.30 (C-7), 32.08 (C-14'), 29.85 (C-4'-13'), 28.18 (C-21), 28.10 (C-23), 27.30 (C-3'), 26.69 (C-15), 25.34 (C-12), 23.89 (C-2), 22.85 (C-15'), 22.04 (C-NOCOCH₃), 20.86 (C-11), 18.30 (C-6), 17.89 (C-28), 16.69 (C-24), 16.31 (C-25), 16.04 (C-26), 14.34 (C-27), 14.27 (C-16').

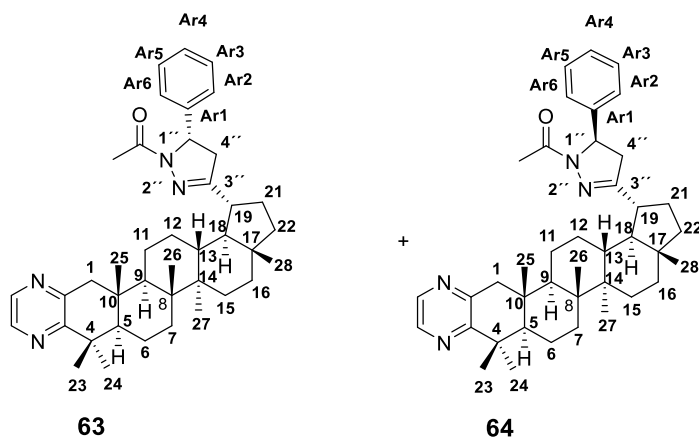
(5''*R*)-*N*-Acetil-5''-fenil-pirazolina de lupeol (**59**) + (5''*S*)-*N*-Acetil-5''-fenil-pirazolina de lupeol (**60**)



El crudo obtenido de la reacción, utilizando el procedimiento general, se redisolvió en CH₂Cl₂ y fue purificado mediante ccf preparativa con el sistema de elución *n*-Hex-AcOEt 5:5, dos veces. Se obtuvo la mezcla (11 mg, 0.019 mmol; 42 %).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.30 (m, 3H, H-Ar3-5), 7.13 (d, 2H, *J* = 7.2, H-Ar2, 6), 5.47 (m, 1H, H-5''), 3.35 (m, H-4''), 3.19 (m, 1H, H-3), 2.82 (m, 1H, H-19), 2.69 (m, 2H, H-19, 4''), 2.32 (s, 3H, N-Ac-CH₃), 1.02 (s, 3H, H-26), 0.98 (s, 3H, H-23), 0.96 (s, 3H, H-27), 0.85 (s, 3H, H-25), 0.80 (s, 3H, H-28), 0.75 (s, 3H, H-24).

(5''R)- [2,3-b]-Pirazina de (N-acetil-5''-fenil)-pirazolina de lupeol (**63**) y (5''S)- [2,3-b]-
Pirazina de (N-acetil-5''-fenil)-pirazolina de lupeol (**64**)



El crudo obtenido de la reacción fue obtenido utilizando el procedimiento general. Los datos del espectro de crudo se presentan a continuación:

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 8.42 (s, 1H, H-pz2), 8.31 (s, 1H, H-pz1), 7.33 (m, 3H, H-Ar3-5), 7.15 (d, 2H, $J = 7.2$, H-Ar2, 6), 5.47 (m, 1H, H-5''), 3.38 (m, 1H, H-4''), 3.03 (m, 1H, H-1b), 2.82 (m, 1H, H-19), 2.67 (m, 2H, H-19,4''), 2.45 (d, $J = 16.5$, 1H, H-1a), 2.32 (s, 3H, N-Ac- CH_3), 1.28 (s, 3H, H-24), 1.26 (s, 3H, H-23), 1.12 (s, 3H, H-26), 1.08 (s, 3H, H-27), 0.84 (s, 3H, H-25), 0.83 (s, 3H, H-28).

9. REFERENCIAS

- (1) World Health Organization https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1 (consultada Mar 5, 2021).
- (2) Inegi. Comunicado de prensa núm . 105 / 21 4 de febrero de 2021 estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/cancer2021_Nal.pdf (consultada Feb 18, 2021).
- (3) Chakraborty, C.; Sharma, A. R.; Sharma, G.; Lee, S. S. The Interplay among MiRNAs, Major Cytokines, and Cancer-Related Inflammation. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **2020**, *20* (June), 606–620. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2020.04.002>.
- (4) Klein-Júnior, L. C.; Corrêa, R.; Vander Heyden, Y.; Cechinel Filho, V. All That Glitters Is Not Gold: Panning Cytotoxic Natural Products and Derivatives with a Fused Tricyclic Backbone by the Estimation of Their Leadlikeness for Cancer Treatment. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *166* (2019), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.01.028>.
- (5) Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.* **2020**. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>.
- (6) Cragg, G. M. Paclitaxel (Taxol®): A Success Story with Valuable Lessons for Natural Product Drug Discovery and Development. *Med res rev* **1998**, *185*, 315–331.
- (7) Cragg Gordon, N. D. Plants as a Source of Anti-Cancer Agents. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *100* (1–2), 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.05.011>.
- (8) Gurib-Fakim, A. Medicinal Plants: Traditions of Yesterday and Drugs of Tomorrow. *Mol. Aspects Med.* **2006**, *27* (1), 1–93. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.07.008>.
- (9) Phillipson, J. D. Phytochemistry and Pharmacognosy. *Phytochemistry* **2007**, *68* (22–24), 2960–2972. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.06.028>.
- (10) Das, M. C.; Mahato, S. B. Triterpenoids. *Phytochemistry* **1983**, *22* (5), 1071–1095.
- (11) Thimmappa, R.; Geisler, K.; Louveau, T.; O’Maille, P.; Osbourn, A. Triterpene Biosynthesis in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2014**, *65* (1), 225–257. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120229>.
- (12) Muffler, K.; Leipold, D.; Scheller, M. C.; Haas, C.; Steingroewer, J.; Bley, T.; Neuhaus, H. E.; Mirata, M. A.; Schrader, J.; Ulber, R. Biotransformation of Triterpenes. *Process Biochem.* **2011**, *46* (1), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.07.015>.
- (13) Sandjo, L. P.; Kuete, V. *Triterpenes and Steroids from the Medicinal Plants of Africa*; Elsevier Inc., 2013. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405927-6.00004-7>.
- (14) Patočka, J. Biologically Active Pentacyclic Triterpenes and Their Current Medicine Signification. *J. Appl. Biomed.* **2012**, *10* (3), 7–12. <https://doi.org/10.32725/jab.2003.002>.
- (15) Volkman, J. K. Sterols and Other Triterpenoids: Source Specificity and Evolution of Biosynthetic Pathways. *Org. Geochem.* **2005**, *36* (2), 139–159. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2004.06.013>.
- (16) Borkova, L.; Gurska, S.; Dzubak, P.; Burianova, R.; Hajduch, M.; Sarek, J.; Popa, I.; Urban, M. Lupane and 18 α -Oleanane Derivatives Substituted in the Position 2, Their Cytotoxicity and Influence on Cancer Cells. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *121*, 120–131.

- <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.05.029>.
- (17) Dzubak, P.; Hajduch, M.; Vydra, D.; Hustova, A.; Kvasnica, M.; Biedermann, D.; Markova, L.; Urban, M.; Sarek, J. Pharmacological Activities of Natural Triterpenoids and Their Therapeutic Implications. *Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23* (3), 394–411. <https://doi.org/10.1039/b515312n>.
 - (18) Trumbull, E. R.; Bianchi, E.; Eckert, D. J.; Wiedhopf, R. M.; Cole, J. R. Tumor Inhibitory Agents from *Vauquelinia Corymbosa* (Rosaceae). *J. Pharm. Sci.* **1976**, *65* (9), 1407–1408. <https://doi.org/10.1002/jps.2600650938>.
 - (19) Zhang, D.-M.; Xu, H.-G.; Wang, L.; Ying-Jie, L. Betulinic Acid and Its Derivatives as Potential Antitumor Agents. *Med. Res. Rev.* **2015**, *35* (6), 1127–1155. <https://doi.org/10.1002/med>.
 - (20) Molnár, J.; Gyémánt, N.; Tanaka, M.; Hohmann, J.; Bergmann-Leitner, E.; Molnár, P.; Deli, J.; Didiziapetris, R.; Ferreira, M. J. U. Inhibition of Multidrug Resistance of Cancer Cells by Natural Diterpenes, Triterpenes and Carotenoids. *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12* (3), 287–311. <https://doi.org/10.2174/138161206775201893>.
 - (21) Li, J. Y.; Cao, H. Y.; Liu, P.; Cheng, G. H.; Sun, M. Y. Glycyrrhizic Acid in the Treatment of Liver Diseases: Literature Review. *Biomed Res. Int.* **2014**, *2014*, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2014/872139>.
 - (22) Yadav, V. R.; Prasad, S.; Sung, B.; Kannappan, R.; Aggarwal, B. B. Targeting Inflammatory Pathways by Triterpenoids for Prevention and Treatment of Cancer. *Toxins (Basel)*. **2010**, *2* (10), 2428–2466. <https://doi.org/10.3390/toxins2102428>.
 - (23) Dzubak, P.; Hajduch, M.; Vydra, D.; Hustova, A.; Kvasnica, M.; Biedermann, D.; Markova, L.; Urban, M.; Sarek, J. Pharmacological Activities of Natural Triterpenoids and Their Therapeutic Implications. *Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23* (3), 394–411. <https://doi.org/10.1039/b515312n>.
 - (24) Nazaruk, J.; Borzym-Kluczyk, M. The Role of Triterpenes in the Management of Diabetes Mellitus and Its Complications. *Phytochem. Rev.* **2015**, *14* (4), 675–690. <https://doi.org/10.1007/s11101-014-9369-x>.
 - (25) de Sales, P. M.; de Souza, P. M.; Simeoni, L. A.; Magalhães, P. de O.; Silveira, D. α -Amylase Inhibitors: A Review of Raw Material and Isolated Compounds from Plant Source. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2012**, *15* (1), 141–183. <https://doi.org/10.18433/j35s3k>.
 - (26) Saleem, M. Lupeol, a Novel Anti-Inflammatory and Anti-Cancer Dietary Triterpene. *Cancer Lett.* **2009**, *285* (2), 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.04.033>.
 - (27) Wal, P.; Wal, A.; Sharma, G. Biological Activities of Lupeol. *Syst. Rev. Pharm.* **2011**, *2* (2), 96–103. <https://doi.org/10.4103/0975-8453.86298>.
 - (28) Murtaza, I.; Saleem, M.; Adhami, V. M.; Hafeez, B. Bin; Mukhtar, H. Suppression of CFLIP by Lupeol, a Dietary Triterpene, Is Sufficient to Overcome Resistance to TRAIL-Mediated Apoptosis in Chemoresistant Human Pancreatic Cancer Cells. *Cancer Res.* **2009**, *69* (3), 1156–1165. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2917>.
 - (29) Saleem, M.; Afaq, F.; Adhami, V. M.; Mukhtar, H. Lupeol Modulates NF-KB and PI3K/Akt Pathways and Inhibits Skin Cancer in CD-1 Mice. *Oncogene* **2004**, *23* (30), 5203–5214. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207641>.
 - (30) Chaturvedi, P. K.; Bhui, K.; Shukla, Y. Lupeol: Connotations for Chemoprevention. *Cancer Lett.* **2008**, *263* (1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.01.047>.
 - (31) Geetha, T.; Varalakshmi, P. Anti-Inflammatory Activity of Lupeol and Lupeol

- Linoleate in Rats. *J. Ethnopharmacol.* **2001**, *76* (1), 77–80. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00175-1](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00175-1).
- (32) Fernández, M. a; de las Heras, B.; García, M. D.; Sáenz, M. T.; Villar, A. New Insights into the Mechanism of Action of the Anti-Inflammatory Triterpene Lupeol. *J. Pharm. Pharmacol.* **2001**, *53* (11), 1533–1539. <https://doi.org/10.1211/0022357011777909>.
- (33) Mena, F.; Badole, S. L.; Mena, B.; Mena, A.; Bodhankar, S. L. *Anti-Inflammatory Benefits of Pentacyclic Triterpenes*, 1st ed.; Elsevier Inc., 2013. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397156-2.00030-2>.
- (34) Siddique, H. R.; Saleem, M. Beneficial Health Effects of Lupeol Triterpene: A Review of Preclinical Studies. *Life Sci.* **2011**, *88* (7–8), 285–293. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.11.020>.
- (35) Moreno, L. M.; Quiroga, J.; Abonia, R.; Ramírez-Prada, J.; Insuasty, B. Synthesis of New 1,3,5-Triazine-Based 2-Pyrazolines as Potential Anticancer Agents. *Molecules* **2018**, *23* (8), 1–20. <https://doi.org/10.3390/molecules23081956>.
- (36) Ruiz-Rodríguez, M. A.; Vedani, A.; Flores-Mireles, A. L.; Cháirez-Ramírez, M. H.; Gallegos-Infante, J. A.; González-Laredo, R. F. In Silico Prediction of the Toxic Potential of Lupeol. *Chem. Res. Toxicol.* **2017**, *30* (8), 1562–1571. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.7b00070>.
- (37) Na, M.; Kim, B. Y.; Osada, H.; Ahn, J. S. Inhibition of Protein Tyrosine Phosphatase 1B by Lupeol and Lupenone Isolated from Sorbus Commixta. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2009**, *24* (4), 1056–1059. <https://doi.org/10.1080/14756360802693312>.
- (38) The plant list.
- (39) McVaugh, R. The Genus *Cnidoscopus*: Generic Limits and Intrageneric Groups. *Bull. Torrey Bot. Club* **1944**, *71* (5), 457–474. <https://doi.org/10.2307/2481239>.
- (40) Steinmann, V. W. Diversidad y Endemismo de La Familia Euphorbiaceae En México. *Acta Bot. Mex.* **2002**, *61*, 61–93. <https://doi.org/10.21829/abm61.2002.909>.
- (41) Martínez-Gordillo, M.; Ramírez-Jiménez, J.; Cruz-Durán, R.; Arriaga, E.; García, R.; Cervantes, A.; Hernández, R. Los Géneros de La Familia Euphorbiaceae En México. *An. Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. Méx.* **2002**, *73* (2), 155–281.
- (42) Awoyinka, O. A.; Balogun, I. O.; Ogunnowo, A. A. Phytochemical Screening and in Vitro Bioactivity of *Cnidoscopus Aconitifolius* (Euphorbiaceae). *J. Med. Plants Res.* **2007**, *1* (3), 63–65.
- (43) Oyagbemi, A. A.; Odetola, A. A. Hepatoprotective and Nephroprotective Effects of *Cnidoscopus Aconitifolius* in Protein Energy Malnutrition Induced Liver and Kidney Damage. *Pharmacognosy Res.* **2013**, *5* (4), 260. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.118817>.
- (44) García-Rodríguez, R. V.; Gutiérrez-Rebolledo, G. A.; Méndez-Bolaina, E.; Sánchez-Medina, A.; Maldonado-Saavedra, O.; Domínguez-Ortiz, M. Á.; Vázquez-Hernández, M.; Muñoz-Muñiz, O. D.; Cruz-Sánchez, J. S. *Cnidoscopus Chayamansa* Mc Vaugh, an Important Antioxidant, Anti-Inflammatory and Cardioprotective Plant Used in Mexico. *J. Ethnopharmacol.* **2014**, *151* (2), 937–943. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.12.004>.
- (45) Pérez-González, M. Z.; Gutiérrez-Rebolledo, G. A.; Yépez-Mulia, L.; Rojas-Tomé, I. S.; Luna-Herrera, J.; Jiménez-Arellanes, M. A. Antiprotozoal, Antimycobacterial, and Anti-Inflammatory Evaluation of *Cnidoscopus Chayamansa* (Mc Vaugh) Extract and the Isolated Compounds. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *89*, 89–97.

- <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.02.021>.
- (46) Miranda-Velasquez, L.; Oranday-Cardenas, A.; Lozano-Garza, H.; Rivas-Morales, C.; Chamorro-Cevallos, G.; Cruz-Vega, D. E. Hypocholesterolemic Activity from the Leaf Extracts of *Cnidoscolus Chayamansa*. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2010**, *65* (4), 392–395. <https://doi.org/10.1007/s11130-010-0202-4>.
- (47) De Araujo Gomes, L. M.; Dantas de Andrade, T. M.; Cabral, J.; Tolentino de Lima, Ju.; Quintans-JUnior, J.; Da silva Almedida, R. G. Phytochemical Screening and Anti-Inflammatory Activity of *Cnidoscolus Quercifolius* (Euphorbiaceae) in Mice. *Pharmacognosy Res.* **2014**, *6* (4), 345. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.138290>.
- (48) Delgado, G.; Hernández, J.; Ríos, M. Y.; Aguilar, M. I. Pentacyclic Triterpenes from *Cnidoscolus Multilobus*. *Planta Med.* **1994**, *60*, 389–390. <https://doi.org/10.1055/s-2006-959514>.
- (49) Moura, L. F. W. G.; da Silva Neto, J. X.; Lopes, T. D. P.; Benjamin, S. R.; Brito, F. C. R.; Magalhães, F. E. A.; Florean, E. O. P. T.; de Sousa, D. de O. B.; Guedes, M. I. F. Ethnobotanic, Phytochemical Uses and Ethnopharmacological Profile of Genus *Cnidoscolus* Spp. (Euphorbiaceae): A Comprehensive Overview. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *109* (October 2018), 1670–1679. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.015>.
- (50) Silva, A. M. da; Santiago, G. M. P.; Monte, F. J. Q.; Melo, K. M.; Lemos, T. L. G.; Militão, G. C. G.; Ferreira, D. A.; Braz-Filho, R.; Silva, P. B. N. da; Paula, A. C.; et al. Chemical Constituents and Cytotoxic Activity of *Cnidoscolus Phyllacanthus*. *Rev. Virtual Química* **2016**, *8* (1), 231–241. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20160015>.
- (51) De Lemos, T. L.; Silveira, E. R.; Oliveira, M. F.; Braz Filho, R.; Hufford, C. D. Terpenoids from *Cnidoscolus Phyllacanthus* Pax et Hoff. *J. Braz. Chem. Soc.* **1991**, *2* (3), 105–110. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.19910023>.
- (52) Yuan, W.; Li, S.; Ownby, S.; Zhang, Z.; Wang, P.; Zhang, W.; Beasley, R. S. Flavonoids, Coumarins and Triterpenes from the Aerial Parts of *Cnidoscolus Texanus*. *Planta Med.* **2007**, *73* (12), 1304–1308. <https://doi.org/10.1055/s-2007-990226>.
- (53) Brum, R. L.; Honda, N. K.; Hess, S. C.; Cavalheiro, A. J.; Delle Monache, F. Acyl Lupeols from *Cnidoscolus Vitifolius*. *Phytochemistry* **1998**, *49* (4), 1127–1128. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)00069-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00069-7).
- (54) Lundell, C. L. The Genus *Cnidoscolus* in Mexico : New Species and Critical Notes. *Bull. Torrey Bot. club* **1945**, *72* (3), 319–334. <https://doi.org/10.2307/2481291>.
- (55) Kolterman, D. A.; Breckon, G. J.; Kowal, R. R. Chemotaxonomic Studies in *Cnidoscolus* (Euphorbiaceae). II. Flavonoids of *C. Aconitifolius*, *C. Souzae*, and *C. Spinosus*. *Syst. Bot.* **1984**, *9* (1), 22–32. <https://doi.org/10.2307/2418403>.
- (56) Bolaños, O. B.; Sánchez-González, A.; De Nova Vázquez, J. A.; Hernández, N. P. P. Composición y Estructura Arbórea y Arbustiva de La Vegetación de La Zona Costera de Bahía de Banderas, Nayarit, México. *Bot. Sci.* **2016**, *94* (3), 603–623. <https://doi.org/10.17129/botsci.461>.
- (57) Bullock, S. H. Componentes Fenológicos Del Sistema de Cruzamiento Monoico de *Cnidoscolus Spinosus* (Euphorbiaceae) En Jalisco. *Bol. la Soc. botánica México* **1982**, *42*, 1–9. <https://doi.org/10.17129/botsci.1256>.
- (58) Al Muqarrabun, L. M. R.; Ahmat, N.; Aris, S. R. S. A Review of the Medicinal Uses, Phytochemistry and Pharmacology of the Genus *Sapium*. *J. Ethnopharmacol.* **2014**, *155* (1), 9–20. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.05.028>.

- (59) Taylor, S. E.; Gafur, M. A.; Choudhury, A. K.; Evans, F. J. Nitrogen-Containing Phorbol Derivatives of *Sapium Indicum*. *Phytochemistry* **1981**, *20* (12), 2749–2751. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(81\)85279-X](https://doi.org/10.1016/0031-9422(81)85279-X).
- (60) Devkota, H. P.; Basnet, P.; Yahara, S. A New Phenolic Compound, 4-Dehydrochebolic Acid-1,6-Dimethyl Ester from *Sapium Insigne* Leaves. *J. Nat. Med.* **2010**, *64* (2), 191–193. <https://doi.org/10.1007/s11418-009-0378-9>.
- (61) Siems, K.; Jakupovic, J.; Castro, V.; Poveda, L. Rigidol, an Unusual Diterpene from *Sapium Rigidifolium*. *Phytochemistry* **1993**, *33* (6), 1465–1468. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(93\)85112-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(93)85112-5).
- (62) Ahmed, Y.; Sohrab, M. H.; Al-Reza, S. M.; Tareq, F. S.; Hasan, C. M.; Sattar, M. A. Antimicrobial and Cytotoxic Constituents from Leaves of *Sapium Baccatum*. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48* (2), 549–552. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.11.030>.
- (63) Novillo, F. Búsqueda de Substancia Antiinflamatorias y Citotóxicas a Partir de Especies de Euphorbiaceae. Preparación y Bioevaluación de Análogos Semisintéticos., UNAM, 2017.
- (64) Khan, M. F.; Maurya, C. K.; Dev, K.; Arha, D.; Rai, A. K.; Tamrakar, A. K.; Maurya, R. Design and Synthesis of Lupeol Analogues and Their Glucose Uptake Stimulatory Effect in L6 Skeletal Muscle Cells. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2014**, *24* (12), 2674–2679. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.04.059>.
- (65) Jung, J. C.; Blake Watkins, E.; Avery, M. A. Synthesis and Cyclization Reaction of Pyrazolin-5-One Derivatives. *Heterocycles* **2005**, *65* (1), 77–94. <https://doi.org/10.3987/COM-04-10216>.
- (66) Alex, J. M.; Kumar, R. 4, 5-Dihydro-1 H -Pyrazole : An Indispensable Scaffold 4 , 5-Dihydro-1 H -Pyrazole : An Indispensable Scaffold. **2014**, *29* (3), 427–442. <https://doi.org/10.3109/14756366.2013.795956>.
- (67) Lévai, A. Synthesis of 2-Pyrazolines by the Reactions of α , β -Unsaturated Aldehydes , Ketones , and Esters With. *J. Heterocycl. Chem.* **2002**, *39* (1), 1–13. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570390101>.
- (68) Altıntop, M. D.; Ödemir, A.; Turan-Zitouni, G.; Ilgin, S.; Atli, Ö.; Demirel, R.; Kaplancikli, Z. A. A Novel Series of Thiazolyl-Pyrazoline Derivatives: Synthesis and Evaluation of Antifungal Activity, Cytotoxicity and Genotoxicity. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *92*, 342–352. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.12.055>.
- (69) Bano, S.; Alam, M. S.; Javed, K.; Dudeja, M.; Das, A. K.; Dhulap, A. Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Docking of Some Substituted Pyrazolines and Isoxazolines as Potential Antimicrobial Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *95*, 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.03.031>.
- (70) Kostopoulou, I.; Diassakou, A.; Kavetsou, E.; Kritsi, E.; Zoumpoulakis, P.; Pontiki, E.; Hadjipavlou-Litina, D.; Detsi, A. Novel Quinolinone–Pyrazoline Hybrids: Synthesis and Evaluation of Antioxidant and Lipoxigenase Inhibitory Activity. *Mol. Divers.* **2020**. <https://doi.org/10.1007/s11030-020-10045-x>.
- (71) Havrylyuk, D.; Kovach, N.; Zimenkovsky, B.; Vasylenko, O. Synthesis and Anticancer Activity of Isatin-Based Pyrazolines and Thiazolidines Conjugates. **2011**, 514–522. <https://doi.org/10.1002/ardp.201100055>.
- (72) Fioravanti, R.; Bolasco, A.; Manna, F.; Rossi, F.; Orallo, F.; Ortuso, F.; Alcaro, S.; Cirilli, R. Synthesis and Biological Evaluation of N-Substituted-3,5-Diphenyl-2-Pyrazoline Derivatives as Cyclooxygenase (COX-2) Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.*

- 2010**, *45* (12), 6135–6138. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.10.005>.
- (73) Amir, M.; Kumar, H.; Khan, S. A. Synthesis and Pharmacological Evaluation of Pyrazoline Derivatives as New Anti-Inflammatory and Analgesic Agents. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2008**, *18* (3), 918–922. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.12.043>.
- (74) R. Nagireddy, J.; Raheem, M.-A.; Haner, J.; Tam, W. Methods of Cleavage of 2-Isoxazolines. *Curr. Org. Synth.* **2011**, *8* (5), 659–700. <https://doi.org/10.2174/157017911796957348>.
- (75) Kalaria, P. N.; Sataasia, S. P.; Raval, D. K. Synthesis, Identification and in Vitro Biological Evaluation of Some Novel 5-Imidazopyrazole Incorporated Pyrazoline and Isoxazoline Derivatives. *New J. Chem.* **2014**, *38* (7), 2902–2910. <https://doi.org/10.1039/c4nj00244j>.
- (76) Zhao, S.; Wang, H.; Sun, S.; Guo, H.; Chen, Z.; Wang, J.; Wang, L.; Liang, S.; Wang, G. An Efficient Synthesis of 2-Isoxazolines from α -Haloketone Oximes and Dimethyl Sulfonium Salts. *Tetrahedron Lett.* **2019**, *60* (4), 382–385. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2018.12.062>.
- (77) Taghipour, F.; Mirzaei, M. A Survey of Interactions in Crystal Structures of Pyrazine-Based Compounds. *Acta Crystallogr. Sect. C Struct. Chem.* **2019**, *75*, 231–247. <https://doi.org/10.1107/S2053229619002225>.
- (78) Joule, J. A.; Mills, K. *Heterocyclic Chemistry*; Wiley, Ed.; 2010.
- (79) Tantawy, E. S.; Amer, A. M.; Mohamed, E. K.; Abd Alla, M. M.; Nafie, M. S. Synthesis, Characterization of Some Pyrazine Derivatives as Anti-Cancer Agents: In Vitro and in Silico Approaches. *J. Mol. Struct.* **2020**, *1210*. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.128013>.
- (80) Andrews, P. D. Aurora Kinases: Shining Lights on the Therapeutic Horizon? *Oncogene* **2005**, *24* (32), 5005–5015. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208752>.
- (81) Davies, H.; Bignell, G. R.; Cox, C.; Stephens, P.; Edkins, S.; Clegg, S.; Teague, J.; Woffendin, H.; Garnett, M. J.; Bottomley, W.; et al. Mutations of the BRAF Gene in Human Cancer. *Nature* **2002**, *417* (6892), 949–954. <https://doi.org/10.1038/nature00766>.
- (82) Jhanwar-Uniyal, M.; Wainwright, J. V.; Mohan, A. L.; Tobias, M. E.; Murali, R.; Gandhi, C. D.; Schmidt, M. H. Diverse Signaling Mechanisms of MTOR Complexes: MTORC1 and MTORC2 in Forming a Formidable Relationship. *Adv. Biol. Regul.* **2019**, *72* (February), 51–62. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2019.03.003>.
- (83) Devarajan, E.; Sahin, A. A.; Chen, J. S.; Krishnamurthy, R. R.; Aggarwal, N.; Brun, A. M.; Sapino, A.; Zhang, F.; Sharma, D.; Yang, X. H.; et al. Down-Regulation of Caspase 3 in Breast Cancer: A Possible Mechanism for Chemoresistance. *Oncogene* **2002**, *21* (57), 8843–8851. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206044>.
- (84) Moser, B. R. Review of Cytotoxic Cephalostatins and Ritterazines: Isolation and Synthesis. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71* (3), 487–491. <https://doi.org/10.1021/np070536z>.
- (85) Rudy, A.; López-Antón, N.; Dirsch, V. M.; Vollmar, A. M. The Cephalostatin Way of Apoptosis. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71* (3), 482–486. <https://doi.org/10.1021/np070534e>.
- (86) Pettit, G. R.; Inoue, M.; Kamano, Y.; Herald, D. L.; Arm, C.; Dufresne, C.; Christie, N. D.; Schmidt, J. M.; Doubek, D. L.; Krupa, T. S. Isolation and Structure of the Power Cell Growth Inhibitor Cephalostatin. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, No. 110, 2006–2007.
- (87) LaCour, T. G.; Guo, C.; Bhandaru, S.; Boyd, M. R.; Fuchs, P. L. Interphylal Product Splicing: The First Total Syntheses of Cephalostatin 1, the North Hemisphere of

- Ritterazine G, and the Highly Active Hybrid Analogue, Ritterostatin G(N)1(N)1. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (4), 692–707. <https://doi.org/10.1021/ja972160p>.
- (88) Pettit, G. R.; Tan, R.; Xu, J. P.; Ichihara, Y.; Williams, M. D.; Boyd, M. R. Antineoplastic Agents. 398. Isolation and Structure Elucidation of Cephalostatins 18 and 19. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61* (7), 955–958. <https://doi.org/10.1021/np9800405>.
- (89) Dirsch, V. M.; Müller, I. M.; Eichhorst, S. T.; Pettit, G. R.; Kamano, Y.; Inoue, M.; Xu, J. P.; Ichihara, Y.; Wanner, G.; Vollmar, A. M. Cephalostatin 1 Selectively Triggers the Release of Smac/DIABLO and Subsequent Apoptosis That Is Characterized by an Increased Density of the Mitochondrial Matrix. *Cancer Res.* **2003**, *63* (24), 8869–8876.
- (90) Pettit, G. R.; Moser, B. R.; Mendonça, R. F.; Knight, J. C.; Hogan, F. The Cephalostatins. 22. Synthesis of Bis-Steroidal Pyrazine Pyrones. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75* (6), 1063–1069. <https://doi.org/10.1021/np300069z>.
- (91) Pettit, G. R.; Inoue, M.; Kamano, Y.; Herald, D. L.; Arm, C.; Dufresne, C.; Christie, N. D.; Schmidt, J. M.; Doubek, D. L.; Krupa, T. S. Isolation and Structure of the Powerful Cell Growth Inhibitor Cephalostatin 1. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *110* (0), 2006–2007. <https://doi.org/10.1021/ja00214a078>.
- (92) LaCour, T. G.; Guo, C.; Bhandaru, S.; Boyd, M. R.; Fuchs, P. L. Interphylal Product Splicing: The First Total Syntheses of Cephalostatin 1, the North Hemisphere of Ritterazine G, and the Highly Active Hybrid Analogue, Ritterostatin G(N)1(N)1. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (4), 692–707. <https://doi.org/10.1021/ja972160p>.
- (93) Fortner, K. C.; Kato, D.; Tanaka, Y.; Shair, M. D. Enantioselective Synthesis of (+) -Cephalostatin 1. **2010**, 275–280. <https://doi.org/10.1021/ja906996c>.
- (94) Betancor, C.; Freire, R.; Pérez-Martín, I.; Prangé, T.; Suárez, E. A Convenient Synthesis of C-22 and C-25 Stereoisomers of Cephalostatin North 1 Side Chain from Spirostan Sapogenins. *Org. Lett.* **2002**, *4* (8), 1295–1297. <https://doi.org/10.1021/ol025580e>.
- (95) Pettit, G. R.; Moser, B. R.; Herald, D. L.; Knight, J. C.; Chapuis, J. C.; Zheng, X. The Cephalostatins. 23. Conversion of Hecogenin to a Steroidal 1,6-Dioxaspiro[5.5]Nonane Analogue for Cephalostatin 11. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78* (5), 1067–1072. <https://doi.org/10.1021/np501033u>.
- (96) Pettit, G. R.; Melody, N.; Hempenstall, F.; Chapuis, J. C.; Groy, T. L.; Williams, L. Antineoplastic Agents. 595. Structural Modifications of Betulin and the X-Ray Crystal Structure of an Unusual Betulin Amine Dimer. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77* (4), 863–872. <https://doi.org/10.1021/np400947d>.
- (97) Kvasnica, M.; Urban, M.; Dickinson, J.; Sarek, J. Containing Heterocycles : Synthesis and Medicinal Significance. **2015**, 1303–1330. <https://doi.org/10.1039/c5np00015g>.
- (98) Urban, M.; Sarek, J.; Kvasnica, M.; Tislerova, I.; Hajduch, M. Triterpenoid Pyrazines and Benzopyrazines with Cytotoxic Activity. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70* (4), 526–532. <https://doi.org/10.1021/np060436d>.
- (99) Zhang, H.; Wang, Y.; Zhu, P.; Liu, J.; Xu, S.; Yao, H.; Jiang, J.; Ye, W.; Wu, X.; Xu, J. Design, Synthesis and Antitumor Activity of Triterpenoid Pyrazine Derivatives from 23-Hydroxybetulinic Acid. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *97*, 235–244. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.057>.
- (100) Yang, Y.; Guan, D.; Lei, L.; Lu, J.; Liu, J. Q.; Yang, G.; Yan, C.; Zhai, R.; Tian, J.; Bi, Y.; et al. H6, a Novel Hederagenin Derivative, Reverses Multidrug Resistance in

- Vitro and in Vivo. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2018**, *341* (February), 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.01.015>.
- (101) López Huerta, F. A. Estudios de Semisíntesis y Evaluación Preliminar de La Actividad Antiinflamatoria y Citotóxica de Análogos Monoméricos de Cefalostatina a Partir de Triterpenos Aislados de Las Especies Vegetales de La Familia Euphorbiaceae., UNAM, 2016.
- (102) Wang, K. W. A New Fatty Acid Ester of Triterpenoid from *Celastrus Rosthornianus* with Anti-Tumor Activities. *Nat. Prod. Res.* **2007**, *21* (7), 669–674. <https://doi.org/10.1080/14786410701371447>.
- (103) Flamini, G.; Antognoli, E.; Morelli, I. Two Flavonoids and Other Compounds from the Aerial Parts of *Centaurea Bracteata* from Italy. *Phytochemistry* **2001**, *57* (4), 559–564. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00066-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00066-8).
- (104) Zhang, X.; Geoffroy, P.; Miesch, M.; Julien-David, D.; Raul, F.; Aoudé-Werner, D.; Marchioni, E. Gram-Scale Chromatographic Purification of β -Sitosterol: Synthesis and Characterization of β -Sitosterol Oxides. *Steroids* **2005**, *70* (13), 886–895. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2005.06.003>.
- (105) Rubinstein, I.; Goad, L. J.; Clague, A. D. H.; Mulheirn, L. J. The 220 MHz NMR Spectra of Phytosterols. *Phytochemistry* **1976**, *15* (1), 195–200. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89083-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89083-4).
- (106) Bhattacharyya, J.; Barros, C. B. Triterpenoids of *Cnidoscopus Urens*. *Phytochemistry* **1986**, *25* (1), 274–276. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)94550-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)94550-3).
- (107) Santos, K. A.; Filho, O. P. A.; Aguiar, C. M.; Milinsk, M. C.; Sampaio, S. C.; Palú, F.; da Silva, E. A. Chemical Composition, Antioxidant Activity and Thermal Analysis of Oil Extracted from Favela (*Cnidoscopus Quercifolius*) Seeds. *Ind. Crops Prod.* **2017**, *97*, 368–373. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.12.045>.
- (108) 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 *Cnidoscopus Spinosus* and Their Bioactivities. *Bioorg. Chem.* **2020**, *100* (December 2019), 103919. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103919>.
- (109) Starratt, A. . Isolation of Hopenone-B from *Euphorbia Cyparissias*. *Phytochemistry* **1969**, *8*, 1831–1832. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)85979-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)85979-8).
- (110) Matsunaga, S.; Morita, R. Hopenol-b, a Triterpene Alcohol from *Euphorbia Supina*. *Phytochemistry* **1983**, *22* (2), 605–606. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(83\)83063-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(83)83063-5).
- (111) Kleinpeter, E.; Seidl, P. R. The γ - and the δ -Effects in ^{13}C NMR Spectroscopy in Terms of Nuclear Chemical Shielding (NCS) Analysis. *J. Phys. Org. Chem.* **2004**, *17* (8), 680–685. <https://doi.org/10.1002/poc.746>.
- (112) Pattamadilok, D.; Suttisri, R. Seco-Terpenoids and Other Constituents from *Elateriospermum Tapos*. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71* (2), 292–294. <https://doi.org/10.1021/np070629g>.
- (113) Prokopowicz, Z.; Marcinkiewicz, J.; Katz, D. R.; Chain, B. M. Neutrophil Myeloperoxidase: Soldier and Statesman. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* **2012**, *60* (1), 43–54. <https://doi.org/10.1007/s00005-011-0156-8>.
- (114) Khan, A.; Alsahli, M.; Rahmani, A. Myeloperoxidase as an Active Disease Biomarker: Recent Biochemical and Pathological Perspectives. *Med. Sci.* **2018**, *6* (2),

33. <https://doi.org/10.3390/medsci6020033>.
- (115) Strzepa, A.; Pritchard, K. A.; Dittel, B. N. Myeloperoxidase: A New Player in Autoimmunity. *Cell. Immunol.* **2017**, *317* (January), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.05.002>.
- (116) Heineckes, J. W.; Li, W.; Daehnke, H. L.; Goldstein, J. A. Dityrosine, a Specific Marker of Oxidation, Is Synthesized by the Myeloperoxidase-Hydrogen Peroxide System of Human Neutrophils and Macrophages. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 4069–4077.
- (117) Galijasevic, S. The Development of Myeloperoxidase Inhibitors. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2019**, *29* (1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.11.031>.
- (118) Wang, X.; Li, Y.-L.; Wu, H.; Liu, J.-Z.; Hu, J.-X.; Liao, N.; Peng, J.; Cao, P.-P.; Liang, X.; Hai, C.-X. Antidiabetic Effect of Oleanolic Acid: A Promising Use of a Traditional Pharmacological Agent. *Phyther. Res.* **2011**, *25* (7), 1031–1040. <https://doi.org/10.1002/ptr.3385>.
- (119) Castro, A. J.; Cazarolli, L. H.; Carvalho, Francieli Kanumfre Da Luz, G.; Altenhofen, D.; Dos Santos, A. R.; Pizzolatti, M. G.; Silva, F. R. M. B. Acute Effect of 3 β -Hidroxihop-22(29)Ene on Insulin Secretion Is Mediated by GLP-1, Potassium and Calcium Channels for the Glucose Homeostasis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2015**, *150*, 112–122. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.03.011>.
- (120) Hakamata, W.; Kurihara, M.; Okuda, H.; Nishio, T.; Oku, T. Design and Screening Strategies for Alpha-Glucosidase Inhibitors Based on Enzymological Information. *Curr. Top. Med. Chem.* **2009**, *9* (1), 3–12. <https://doi.org/10.2174/156802609787354306>.
- (121) Chiba, S. Molecular Mechanism in α -Glucosidase and Glucoamylase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1997**, *61* (8), 1233–1239. <https://doi.org/10.1271/bbb.61.1233>.
- (122) Kimura, A.; Lee, J. H.; Lee, I. S.; Lee, H. S.; Park, K. H.; Chiba, S.; Kim, D. Two Potent Competitive Inhibitors Discriminating α -Glucosidase Family I from Family II. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339* (6), 1035–1040. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2003.10.035>.
- (123) Shai, L. J.; Magano, S. R.; Lebelo, S. L.; Mogale, A. M. Inhibitory Effects of Five Medicinal Plants on Rat Alpha-Glucosidase: Comparison with Their Effects on Yeast Alpha-Glucosidase. *J. Med. Plants Res.* **2011**, *5* (13), 2863–2867.
- (124) Zhang, L.; Hogan, S.; Li, J.; Sun, S.; Canning, C.; Zheng, S. J.; Zhou, K. Grape Skin Extract Inhibits Mammalian Intestinal α -Glucosidase Activity and Suppresses Postprandial Glycemic Response in Streptozocin-Treated Mice. *Food Chem.* **2011**, *126* (2), 466–471. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.016>.
- (125) Guo, Y.; Hou, E.; Ma, N.; Liu, Z.; Fan, J.; Yang, R. Discovery, Biological Evaluation and Docking Studies of Novel N-Acyl-2-Aminothiazoles Fused (+)-Nootkatone from Citrus Paradisi Macf. as Potential α -Glucosidase Inhibitors. *Bioorg. Chem.* **2020**, *104* (100), 104294. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104294>.
- (126) Ferrer, E.; García, H.; Bolivar, A.; Cañizales, I.; Guerrero, R.; Herrera, L. First Molecular Detection of Trypanosoma Cruzi, T. Rangeli and Leishmania Spp. in Capybaras. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports* **2021**, *23* (December 2020). <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100516>.
- (127) Isah, M. B.; Ibrahim, M. A.; Mohammed, A.; Aliyu, A. B.; Masola, B.; Coetzer, T. H. T. A Systematic Review of Pentacyclic Triterpenes and Their Derivatives as

- Chemotherapeutic Agents against Tropical Parasitic Diseases. *Parasitology* **2016**, *143* (10), 1219–1231. <https://doi.org/10.1017/S0031182016000718>.
- (128) Sousa, P. L.; Souza, R. O. da S.; Tessarolo, L. D.; de Menezes, R. R. P. P. B.; Sampaio, T. L.; Canuto, J. A.; Martins, A. M. C. Betulinic Acid Induces Cell Death by Necrosis in *Trypanosoma Cruzi*. *Acta Trop.* **2017**, *174* (November 2016), 72–75. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.07.003>.
- (129) Rodríguez-Hernández, D.; Barbosa, L. C. A.; Demuner, A. J.; de Almeida, R. M.; Fujiwara, R. T.; Ferreira, S. R. Highly Potent Anti-Leishmanial Derivatives of Hederagenin, a Triperpenoid from *Sapindus Saponaria* L. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *124*, 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.08.030>.
- (130) OMS. La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana) [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-tripanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-tripanosomiasis)) (consultada Mar 23, 2021).
- (131) CENAPRECE. Manual de Procedimientos Para La Enfermedad de Chagas En México. *Secr. Salud* **2019**, 1–109.
- (132) Prevention, C. for D. C. and. Trypanosomosis americana <https://www.mcdinternational.org/trainings/malaria/spanish/dpdx/HTML/TrypanosomosisAmericana> (consultada Mar 22, 2021).
- (133) Sales, P. A.; Molina, I.; Murta, S. M. F.; Sánchez-Montalvá, A.; Salvador, F.; Corrêa-Oliveira, R.; Carneiro, C. M. Experimental and Clinical Treatment of Chagas Disease: A Review. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2017**, *97* (5), 1289–1303. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0761>.
- (134) Vallejo, G. A.; Suárez, J.; Olaya, J. L.; Gutierrez, S. A.; Carranza, J. C. *Trypanosoma Rangeli*: Un Protozoo Infeccioso y No Patógeno Para El Humano Que Contribuye Al Entendimiento de La Transmisión Vectorial y La Infección Por *Trypanosoma Cruzi*, Agente Causal de La Enfermedad de Chagas. *Rev. la Acad. Colomb. Ciencias Exactas, Físicas y Nat.* **2015**, *39* (150), 111. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.143>.
- (135) Sosa Ávila, E. J.; Caro Lozano, J.; Zúñiga Carrasco, I. R. Perfil Epidemiológico de La Leishmaniasis: Una Enfermedad Olvidada En México. *Enfermedades Infecc. y Microbiol.* **2014**, *34* (1), 31–36.
- (136) SALUD, S. D. P. Y. P. D. LA. Centro Nacional De Vigilancia Epidemiologica Y Control De Enfermedades Vector Manual Para El Diagnostico , Tratamiento. **2015**, 1–38.
- (137) Prevention, C. for D. C. and. Leishmaniosis <https://www.mcdinternational.org/trainings/malaria/spanish/dpdx/HTML/Leishmaniosis> (consultada Mar 23, 2021).
- (138) Bekhit, A. A.; El-Agroudy, E.; Helmy, A.; Ibrahim, T. M.; Shavandi, A.; Bekhit, A. E. D. A. Leishmania Treatment and Prevention: Natural and Synthesized Drugs. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *160*, 229–244. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.10.022>.
- (139) Warpehoski, M. a.; Chabaud, B.; Sharpless, K. B. Selenium Dioxide Oxidation of Endocyclic Olefins. Evidence for a Dissociation-Recombination Pathway. *J. Org. Chem.* **1982**, *47* (15), 2897–2900. <https://doi.org/10.1021/jo00136a017>.
- (140) Priebbenow, D. L.; Bolm, C. Recent Advances in the Willgerodt–Kindler Reaction. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (19), 7870. <https://doi.org/10.1039/c3cs60154d>.
- (141) Brown, E. V. The Willgerodt Reaction. *Synthesis (Stuttg.)* **1975**, 358. <https://doi.org/10.1055/s-1975-23756>.

- (142) Sejbal, J. Klinot, J. P. and A. V. Reactions of Triterpenoid Ketones with Sulfur and Morpholine under Conditions of Willgerodt–Kindler Reaction. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1986**, *51*, 118–127.
- (143) Zavarzin, I. V.; Chertkova, V. V.; Levina, I. S.; Chernoburova, E. I. Steroids Fused to Heterocycles at Positions 16, 17 of the D-Ring. *Russ. Chem. Rev.* **2011**, *80* (7), 661–682. <https://doi.org/10.1070/rc2011v080n07abeh004169>.
- (144) Mótyán, G.; Kovács, F.; Wölfling, J.; Gyovai, A.; Zupkó, I.; Frank, É. Microwave-Assisted Stereoselective Approach to Novel Steroidal Ring D-Fused 2-Pyrazolines and an Evaluation of Their Cell-Growth Inhibitory Effects in Vitro. *Steroids* **2016**, *112*, 36–46. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2016.04.014>.
- (145) Amr, A. E. G. E.; Abdel-Latif, N. A.; Abdalla, M. M. Synthesis and Antiandrogenic Activity of Some New 3-Substituted Androstano[17,16-c]-5'-Aryl-Pyrazoline and Their Derivatives. *Bioorganic Med. Chem.* **2006**, *14* (2), 935. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.08.024>.
- (146) Abdel-Sayed, M. A.; Bayomi, S. M.; El-Sherbeny, M. A.; Abdel-Aziz, N. I.; Eltahir, K. E. H.; Shehatou, G. S. G.; Abdel-Aziz, A. A. M. Synthesis, Anti-Inflammatory, Analgesic, COX-1/2 Inhibition Activities and Molecular Docking Study of Pyrazoline Derivatives. *Bioorganic Med. Chem.* **2016**, *24* (9), 2032–2042. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.03.032>.
- (147) Özdemir, A.; Turan-Zitouni, G.; Kaplancikli, Z. A. Novel Analogues of 2-Pyrazoline: Synthesis, Characterization, and Antimycobacterial Evaluation. *Turkish J. Chem.* **2008**, *32* (5), 529–538.
- (148) Levai, A. Synthesis of 2-Pyrazolines by the Reactions of α,β -Unsaturated Aldehydes, Ketones, and Esters with Pdf. *J. Heterocycl. Chem.* **2002**. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570390101>.
- (149) Shaaban, M. R.; Mayhoub, A. S.; Farag, A. M. Recent Advances in the Therapeutic Applications of Pyrazolines. **2012**, 253–291. <https://doi.org/10.1517/13543776.2012.667403>.
- (150) Volkov, S. V.; Kutyakov, S. V.; Levov, A. N.; Polyakova, E. I.; An, L. T.; Soldatova, S. A.; Terentiev, P. B.; Soldatenkov, A. T. Conversion of 3-Benzoyl-1-Methyl-4-Phenyl- γ -Piperidol by Arylamines and Arylhydrazines. Synthesis of 3-Arylamino-1-Oxo-1-Phenylpropanes and 1,3-Diarylpyrazoles and Their Fragmentation under Electron Impact. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2007**, *43* (10), 1260–1268. <https://doi.org/10.1007/s10593-007-0192-9>.
- (151) Hepworth, J. D.; Wainwright, M. Five-Membered Heterocyclic Compounds with Two Different Hetero-Atoms in the Ring. *Suppl. to 2nd Ed. Rodd's Chem. Carbon Compd.* **2009**, *4–4* (i), 95–257. <https://doi.org/10.1016/b978-044453346-3.50158-x>.
- (152) Al-Bogami, A. S.; Alkathlan, H. Z.; Saleh, T. S. Microwave Enhanced Green Synthesis of 2-Pyrazolines, Isoxazolines and Cyclohexenones. *Asian J. Chem.* **2013**, *25* (11), 6427–6433. <https://doi.org/10.14233/ajchem.2013.15070>.
- (153) Mótyán G, Zupkó I, M. R. Lewis Acid-Induced Intramolecular Access to Novel Steroidal Ring D-Condensed Arylpyrazolines Exerting in Vitro Cell-Growth-Inhibitory Effects. *Mol. Divers.* **2015**. <https://doi.org/10.1007/s11030-015-9593-3>.
- (154) Frank, É.; Mucsi, Z.; Szécsi, M.; Zupkó, I.; Wölfling, J.; Schneider, G. Intramolecular Approach to Some New D-Ring-Fused Steroidal Isoxazolidines by 1,3-Dipolar Cycloaddition: Synthesis, Theoretical and in Vitro Pharmacological Studies. *New J.*

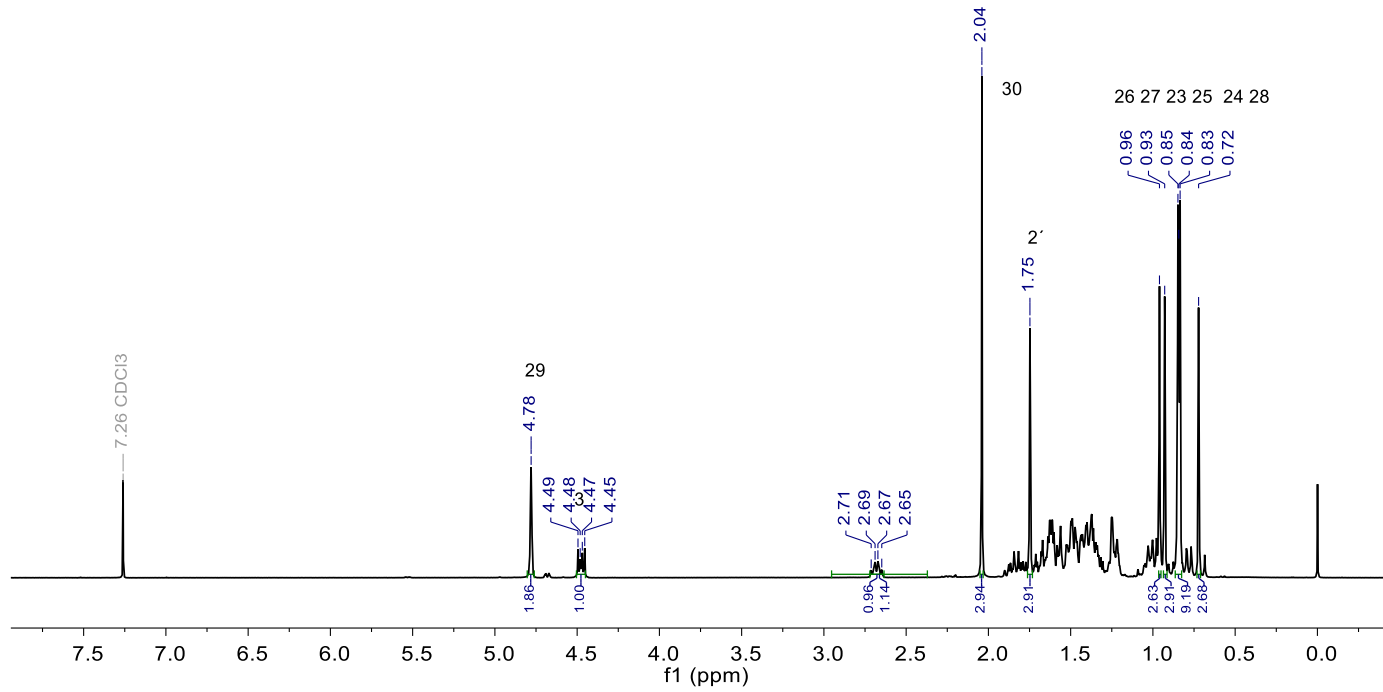
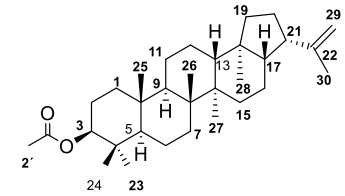
- Chem.* **2010**, *34* (11), 2671–2681. <https://doi.org/10.1039/c0nj00150c>.
- (155) Frank, É.; Wölfling, J.; Aukszi, B.; König, V.; Schneider, T. R.; Schneider, G. Stereoselective Synthesis of Some Novel Heterocyclic Estrone Derivatives by Intramolecular 1,3-Dipolar Cycloaddition. *Tetrahedron* **2002**, *58* (34), 6843–6849. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(02\)00741-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(02)00741-X).
- (156) Marx, J. N. A Simple and Convenient Synthesis of B-Haloketones. *Tetrahedron* **1983**, *39* (9), 1529–1531. <https://doi.org/10.1080/00397910600978499>.
- (157) Clayden, N. G. and S. W. Organic Chemistry; 2012; p 433.
- (158) May, F. R.; Walling, C. The Peroxide Effect in the Addition of Reagents to Unsaturated Compounds and in Rearrangement Reactions. *Chem. Rev.* **1940**, *27* (2), 351–412. <https://doi.org/10.1021/cr60087a003>.
- (159) Sherrill, L.; Mayer, E.; Walter, F.; Mayer, K. E.; Walter, F. Addition of Hydrogen Bromide to Pentene-1 and Heptene-1. **1930**, *48* (2). <https://doi.org/10.1021/ja01319a048>.
- (160) Galli, M.; Fletcher, C. J.; Del Pozo, M.; Goldup, S. M. Scalable Anti-Markovnikov Hydrobromination of Aliphatic and Aromatic Olefins. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14* (24), 5622–5626. <https://doi.org/10.1039/c6ob00692b>.
- (161) Christensen, J. B.; Schluter, A. An Economical Preparation of 2-(2-Bromoethyl)-1, 3-Dioxane. *Org. Prep. Proced. Int.* **1994**, *26* (3), 355–357. <https://doi.org/10.1080/00304949409458436>.
- (162) Sergeev, G. B.; Stepanov, N. F.; Leensov, I. A.; Smirnov, V. V.; Pupyshev, V. I.; Tyurina, L. A.; Mashyanov, M. N. Molecular Mechanism of Hydrogen Bromide Addition to Olefins. *Tetrahedron* **1982**, *38* (16), 2585–2589. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(82\)85095-3](https://doi.org/10.1016/0040-4020(82)85095-3).
- (163) Banday, A. H.; Mir, B. P.; Lone, I. H.; Suri, K. A.; Kumar, H. M. S. Studies on Novel D-Ring Substituted Steroidal Pyrazolines as Potential Anticancer Agents. *Steroids* **2010**, *75* (12), 805–809. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2010.02.014>.
- (164) Iványi, Z.; Szabó, N.; Huber, J.; Wölfling, J.; Zupkó, I.; Szécsi, M.; Wittmann, T.; Schneider, G. Synthesis of D-Ring-Substituted (5'R)- and (5'S)-17 β -Pyrazolinylandrosterone Epimers and Comparison of Their Potential Anticancer Activities. *Steroids* **2012**, *77* (5), 566–574. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2012.02.001>.
- (165) Pappo, R.; Allen, D. S.; Lemieux, R. U.; Jonhson, W. Osmium Tetroxide-Catalyzed Periodate Oxidation of Olefinic Bonds. *J. organi* **1956**, *21* (4), 478–479. <https://doi.org/10.1021/jo01110a606>.
- (166) Nicolet, B.; Shinn, L. The Action of Periodic Acid on α -Amino Alcohols. *J. Am. Chem. Soc.* **1939**, *61* (6), 1939. <https://doi.org/10.1021/ja01875a521>.
- (167) Kim, J. Y.; Koo, H. M.; Kim, D. S. H. L. Development of C-20 Modified Betulinic Acid Derivatives as Antitumor Agents. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2001**, *11* (17), 2405–2408. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(01\)00460-7](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(01)00460-7).
- (168) Barton, D. H. R.; HEAD, A. J.; May, P. . Long-Range Effects in Alicyclic Systems. Part II.* The Rates of Condensation of Some Triterpenoid Ketones with Benzaldehyde. *J. Chem. Soc.* **1957**, 935–943. <https://doi.org/10.1039/JR9570000935>.
- (169) Fan, N. J.; Tang, J. J.; Li, H.; Li, X. J.; Luo, B.; Gao, J. M. Synthesis and Cytotoxic Activity of Some Novel Steroidal C-17 Pyrazolinyl Derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *69*, 182–190. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.08.016>.

- (170) Romero-López, A.; Montiel-Smith, S.; Meza-Reyes, S.; Merino-Montiel, P.; Vega-Baez, J. L. Synthesis of Steroidal Derivatives Containing Substituted, Fused and Spiro Pyrazolines. *Steroids* **2014**, *87*, 86–92. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.05.013>.
- (171) Özdemir, A.; Altıntop, M. D.; Kaplancıklı, Z. A.; Özdemir, A.; Altıntop, M. D.; Kaplancıklı, Z. A.; Turan-zitouni, G. Pyrazoline Derivatives and Evaluation of Their Anticancer Activity Derivatives and Evaluation of Their Anticancer Activity. **2013**, 6366. <https://doi.org/10.3109/14756366.2012.724682>.
- (172) Lévai, A.; Jeko, J. Synthesis of 1-Substituted 3,5-Diaryl-2-Pyrazolines by the Reaction of α,β -Unsaturated Ketones with Hydrazines. *J. Heterocycl. Chem.* **2006**, *43* (1), 111–115. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570430117>.
- (173) Baldwin, B. J. E. Rules for Ring Closure. *J.C.S. Chem. Comm.* **1976**, No. 734, 734–736. <https://doi.org/10.1039/C39760000734>.
- (174) Shivarama Holla, B.; Akberali, P. M.; Shivananda, M. K. Studies on Arylfuran Derivatives Part X. Synthesis and Antibacterial Properties of Arylfuryl- Δ 2-Pyrazolines. *Farmaco* **2000**, *55* (4), 256–263. [https://doi.org/10.1016/S0014-827X\(00\)00030-6](https://doi.org/10.1016/S0014-827X(00)00030-6).
- (175) Viveka, S.; Dinesha; Shama, P.; Nagaraja, G. K.; Ballav, S.; Kerkar, S. Design and Synthesis of Some New Pyrazolyl-Pyrazolines as Potential Anti-Inflammatory, Analgesic and Antibacterial Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *101*, 442–451. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.07.002>.
- (176) Shanmugavelan, P.; Sathishkumar, M.; Nagarajan, S.; Ponnuswamy, A. An Efficient and Facile Synthesis of Novel 1,2,3-Triazolyl-N-Acylpyrazoline Hybrids. *Chinese Chem. Lett.* **2014**, *25* (1), 146–148. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2013.10.015>.
- (177) Martins, D. C. da S.; Silva, F. C.; Meireles, A. M.; Soares, É. A. R.; Silva, G. D. F.; Vieira-Filho, S. A.; Duarte, L. P.; Rebouças, J. S.; Idemori, Y. M. Selective Oxidation of Lupeol by Iodosylbenzene Catalyzed by Manganese Porphyrins. *Catal. Commun.* **2016**, *86*, 104–107. <https://doi.org/10.1016/j.catcom.2016.08.014>.
- (178) Kim, J. N.; Ryu, E. K. An Convenient Synthesis of Nitrile Oxides from Aldoximes by 1-Chlorobenzotriazole. *Synth. Commun.* **1990**, *20* (9), 1373–1377. <https://doi.org/10.1080/00397919008052851>.
- (179) Ma, B.; Hottiger, M. O. Crosstalk between Wnt/ β -Catenin and NF-KB Signaling Pathway during Inflammation. *Front. Immunol.* **2016**, *7* (SEP). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00378>.
- (180) PASS Online - Way2Drug <http://www.pharmaexpert.ru/passonline> (consultada Oct 15, 2020).
- (181) Lagunin, A.; Stepanchikova, A.; Filimonov, D.; Poroikov, V. PASS: Prediction of Activity Spectra for Biologically Active Substances. *Bioinformatics* **2000**, *16* (8), 747–748. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/16.8.747>.
- (182) Huang, Q.; Li, F.; Liu, X.; Li, W.; Shi, W.; Liu, F. F.; O’Sullivan, B.; He, Z.; Peng, Y.; Tan, A. C.; et al. Caspase 3-Mediated Stimulation of Tumor Cell Repopulation during Cancer Radiotherapy. *Nat. Med.* **2011**, *17* (7), 860–866. <https://doi.org/10.1038/nm.2385>.
- (183) Pikarsky, E.; Porat, R. M.; Stein, I.; Abramovitch, R.; Amit, S.; Kasem, S.; Gutkovich-Pyest, E.; Uriell-Shoval, S.; Galun, E.; Ben-Neriah, Y. NF-KB Functions as a Tumour Promoter in Inflammation-Associated Cancer. *Nature* **2004**, *431* (7007), 461–466. <https://doi.org/10.1038/nature02924>.

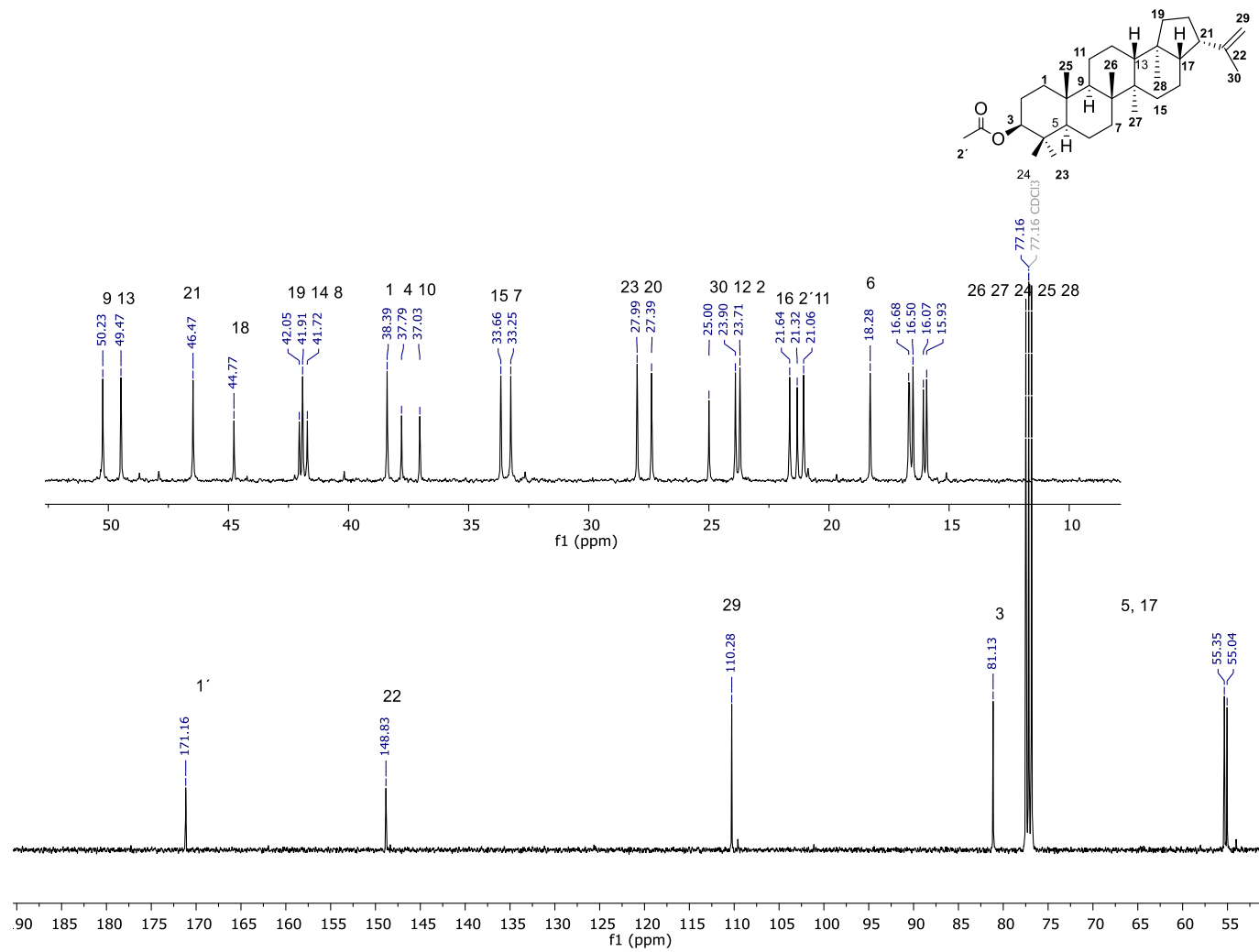
- (184) Taniguchi, K.; Karin, M. NF- κ B, Inflammation, Immunity and Cancer: Coming of Age. *Nat. Rev. Immunol.* **2018**, *18* (5), 309–324. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.142>.
- (185) Panne, D.; Maniatis, T.; Harrison, S. C. An Atomic Model of the Interferon- β Enhanceosome. *Cell* **2007**, *129* (6), 1111–1123. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.019>.
- (186) Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. AutoDock4 and AutoDock Tools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30* (16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc>.
- (187) Trott, O.; Olson, A. J. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31* (2), 455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334.AutoDock>.
- (188) Huang, R. Z.; Jin, L.; Wang, C. G.; Xu, X. J.; Du, Y.; Liao, N.; Ji, M.; Liao, Z. X.; Wang, H. S. A Pentacyclic Triterpene Derivative Possessing Polyhydroxyl Ring A Suppresses Growth of HeLa Cells by Reactive Oxygen Species-Dependent NF- κ B Pathway. *Eur. J. Pharmacol.* **2018**, *838* (February), 157–169. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.08.032>.
- (189) Suthar, S. K.; Boon, H. L.; Sharma, M. Novel Lung Adenocarcinoma and Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) Inhibitors: Synthesis and Evaluation of Lantadene Congeners. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *74*, 135–144. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.12.052>.
- (190) Eiró, N. Inflammation and Cancer. *World J. Gastrointest. Surg.* **2012**, *4* (3), 62. <https://doi.org/10.4240/wjgs.v4.i3.62>.
- (191) Baeuerle, P. A.; Henkel, T. Function and Activation of NF- κ B in the Immune System. *Annu. Rev. Med. Rev. Immunol* **1994**, *12*, 121–179. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.12.040194.001041>.
- (192) Recio, C.; Giner, R. M.; Máñez, S.; Rios, J. L. Structural Requirements for the Anti-Inflammatory Activity of Natural Triterpenoids. *Planta Med.* **1995**, *61*, 182–185. <https://doi.org/10.1055/s-2006-958045>.
- (193) Kim, S. J.; Kim, M. C.; Lee, B. J.; Park, D. H.; Hong, S. H.; Um, J. Y. Anti-Inflammatory Activity of Chrysophanol through the Suppression of NF- κ B/Caspase-1 Activation in Vitro and in Vivo. *Molecules* **2010**, *15* (9), 6436–6451. <https://doi.org/10.3390/molecules15096436>.
- (194) Loza-Mejía, M. A.; Salazar, J. R. Sterols and Triterpenoids as Potential Anti-Inflammatories: Molecular Docking Studies for Binding to Some Enzymes Involved in Inflammatory Pathways. *J. Mol. Graph. Model.* **2015**, *62*, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2015.08.010>.
- (195) Murakami, A.; Ohigashi, H. Targeting NOX, INOS and COX-2 in Inflammatory Cells: Chemoprevention Using Food Phytochemicals. *Int. J. Cancer* **2007**, *121* (11), 2357–2363. <https://doi.org/10.1002/ijc.23161>.
- (196) Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. UCSF Chimera - A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25* (13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>.
- (197) Genheden, S.; Ryde, U. A Comparison of Different Initialization Protocols to Obtain Statistically Independent Molecular Dynamics Simulations. *J. Comput. Chem.* **2010**,

- 32 (2), 187–195. <https://doi.org/10.1002/jcc.21546>.
- (198) Carlson, R. P.; Lynn, O. D.; Chang, J.; Lewis, A. J. Modulation of Mouse Ear Edema by Cyclooxygenase and Lipoxygenase Inhibitors and Other Pharmacologic Agents. *Agents Actions* **1985**, *17* (2), 197–204. <https://doi.org/10.1007/BF01966592>.
- (199) Suzuki, K.; Ota, H.; Sasagawa, S.; Sakatani, T.; Fujikura, T. Assay Method for Myeloperoxidase in Human Polymorphonuclear Leukocytes. *Anal. Biochem.* **1983**, *132* (2), 345–352. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(83\)90019-2](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(83)90019-2).
- (200) L Mescher, A. *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas*, 13th ed.; Mg Graw Hill Lange, 2013.
- (201) Kulmacz, R. J.; Lands, W. E. Requirements for Hydroperoxide by the Cyclooxygenase and Peroxidase Activities of Prostaglandin H Synthase. *Prostaglandins* **1983**, *25* (4), 531–540. [https://doi.org/10.1016/0090-6980\(83\)90025-4](https://doi.org/10.1016/0090-6980(83)90025-4).
- (202) Ye, X. P.; Song, C. Q.; Yuan, P.; Mao, R. G. α -Glucosidase and α -Amylase Inhibitory Activity of Common Constituents from Traditional Chinese Medicine Used for Diabetes Mellitus. *Chin. J. Nat. Med.* **2010**, *8* (5), 349–352. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(10\)60041-6](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(10)60041-6).
- (203) Jo, S. H.; Lee, H. S.; Apostolidis, E.; Jang, H. D.; Kwon, Y. . Comparison of Antioxidant Potential and Rat Intestinal α -Glucosidase Inhibitory Activities of Quercetin, Rutin, and Isoquercetin. *Int. J. Appl. Res. Nat. Prod.* **2009**, *2* (4), 52–60.
- (204) Barker, M. K.; Rose, D. R. Specificity of Processing α -Glucosidase I Is Guided by the Substrate Conformation: Crystallographic and in Silico Studies. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288* (19), 13563–13574. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.460436>.
- (205) Barrios, E. V. Estudio Químico de Sapium Nitidum En Búsqueda de Substancias Bioactivas (Citotóxicas y Anti-Inflamatorias)., 2014.
- (206) Burns, D.; Reynolds, W. F.; Buchanan, G.; Reese, P. B.; Enriquez, R. G. Assignment of ^1H and ^{13}C Spectra and Investigation of Hindered Side-Chain Rotation in Lupeol Derivatives. *Magn. Reson. Chem.* **2000**, *38* (7), 488–493. [https://doi.org/10.1002/1097-458x\(200007\)38:7<488::aid-mrc704>3.0.co;2-g](https://doi.org/10.1002/1097-458x(200007)38:7<488::aid-mrc704>3.0.co;2-g).

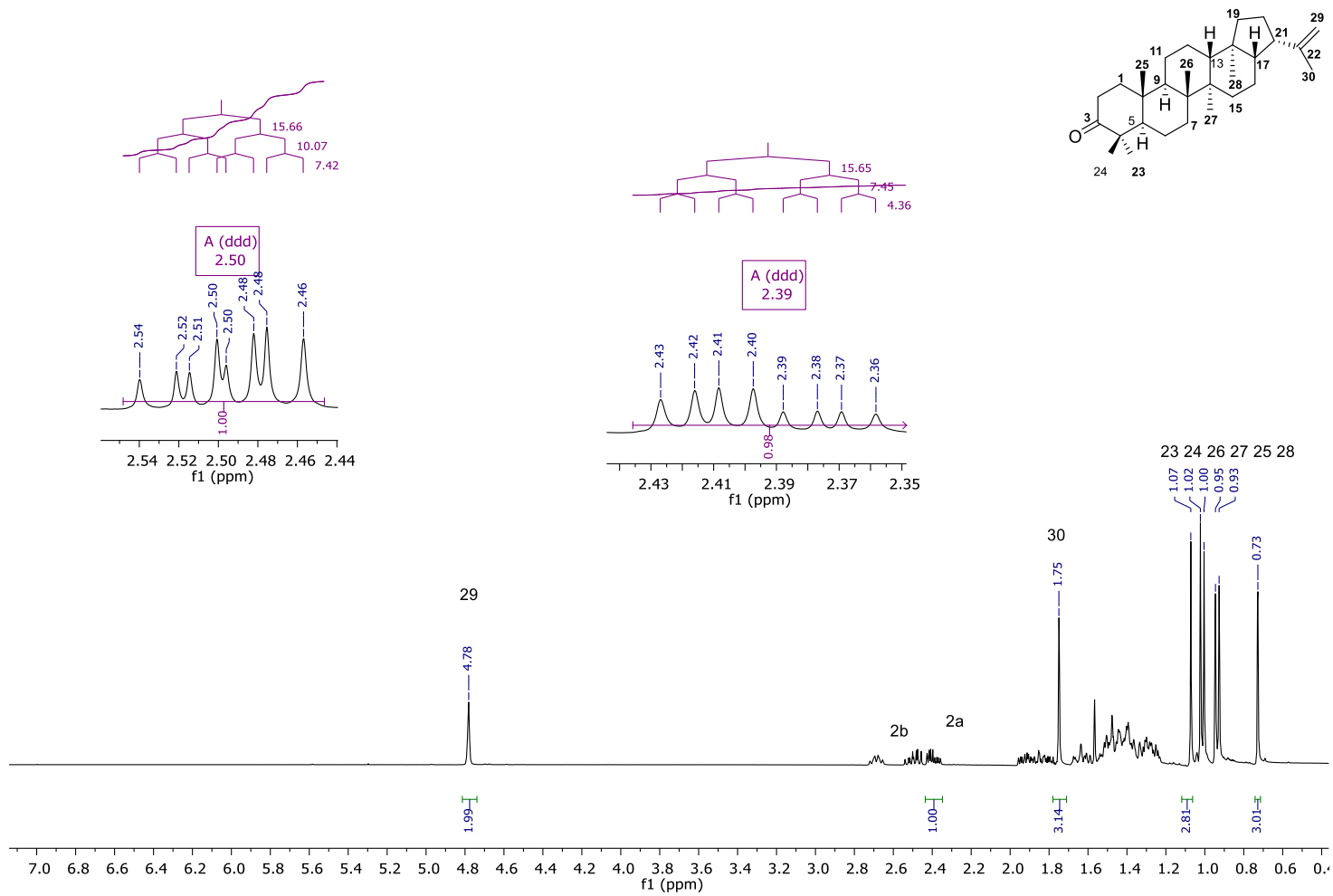
10. ANEXO



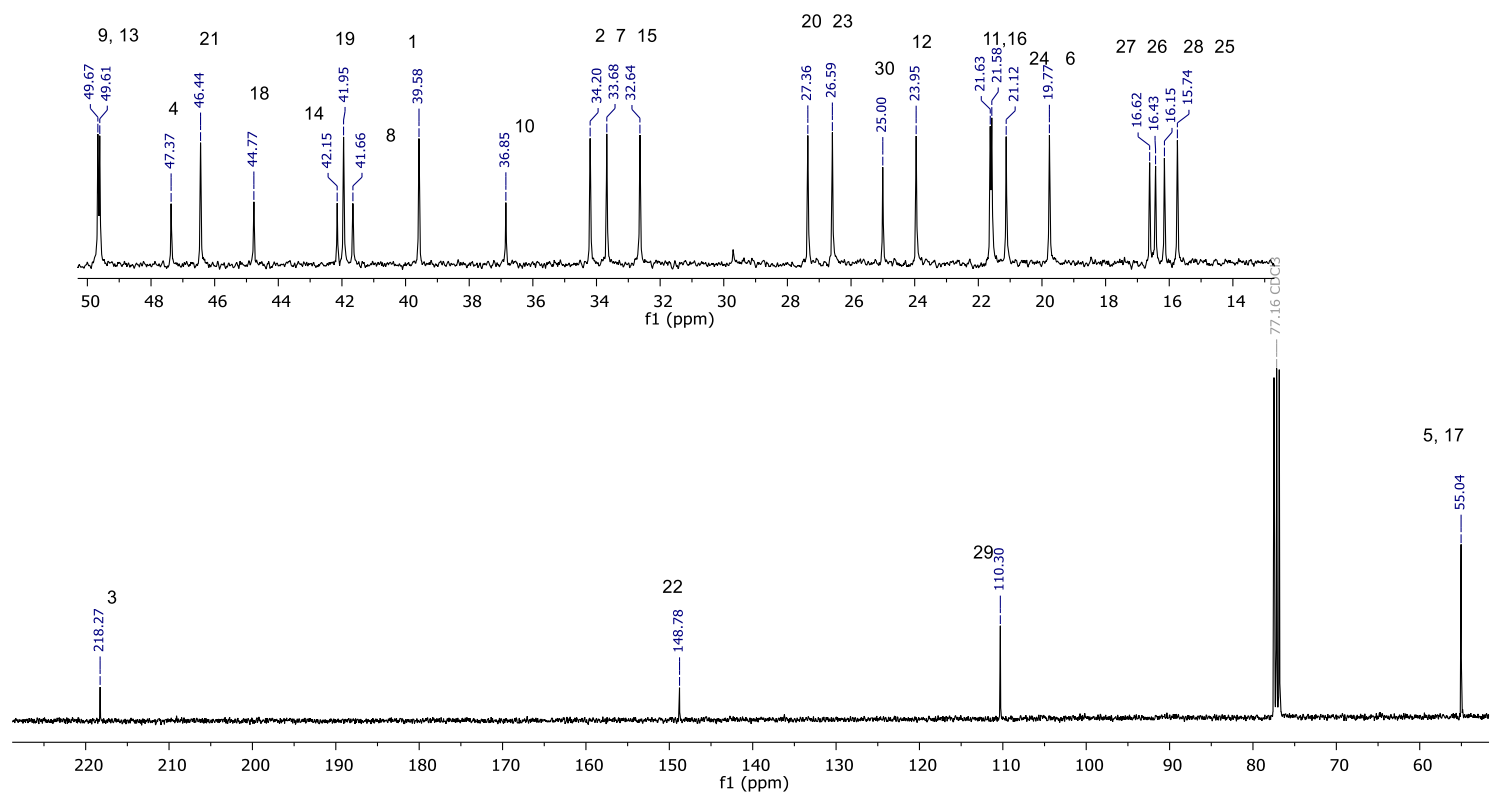
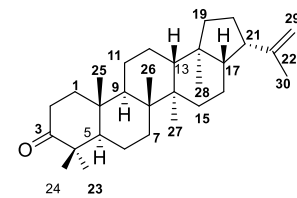
Espectro 1. RMN ¹H (700 MHz, CDCl₃) de acetato de hopenilo (**33**)



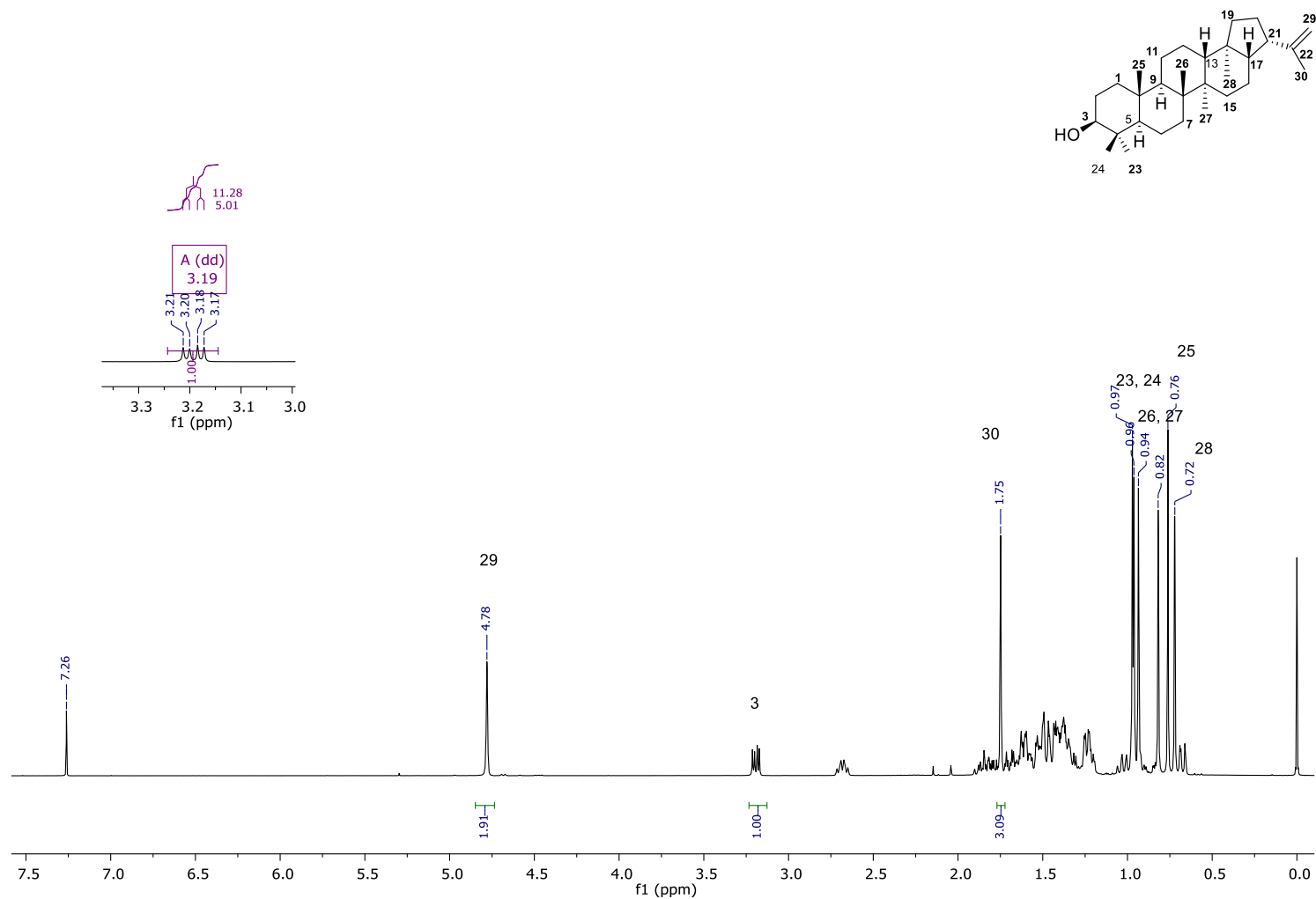
Espectro 2. RMN ^{13}C (175 MHz, CDCl_3) de acetato de hopenilo (**33**)



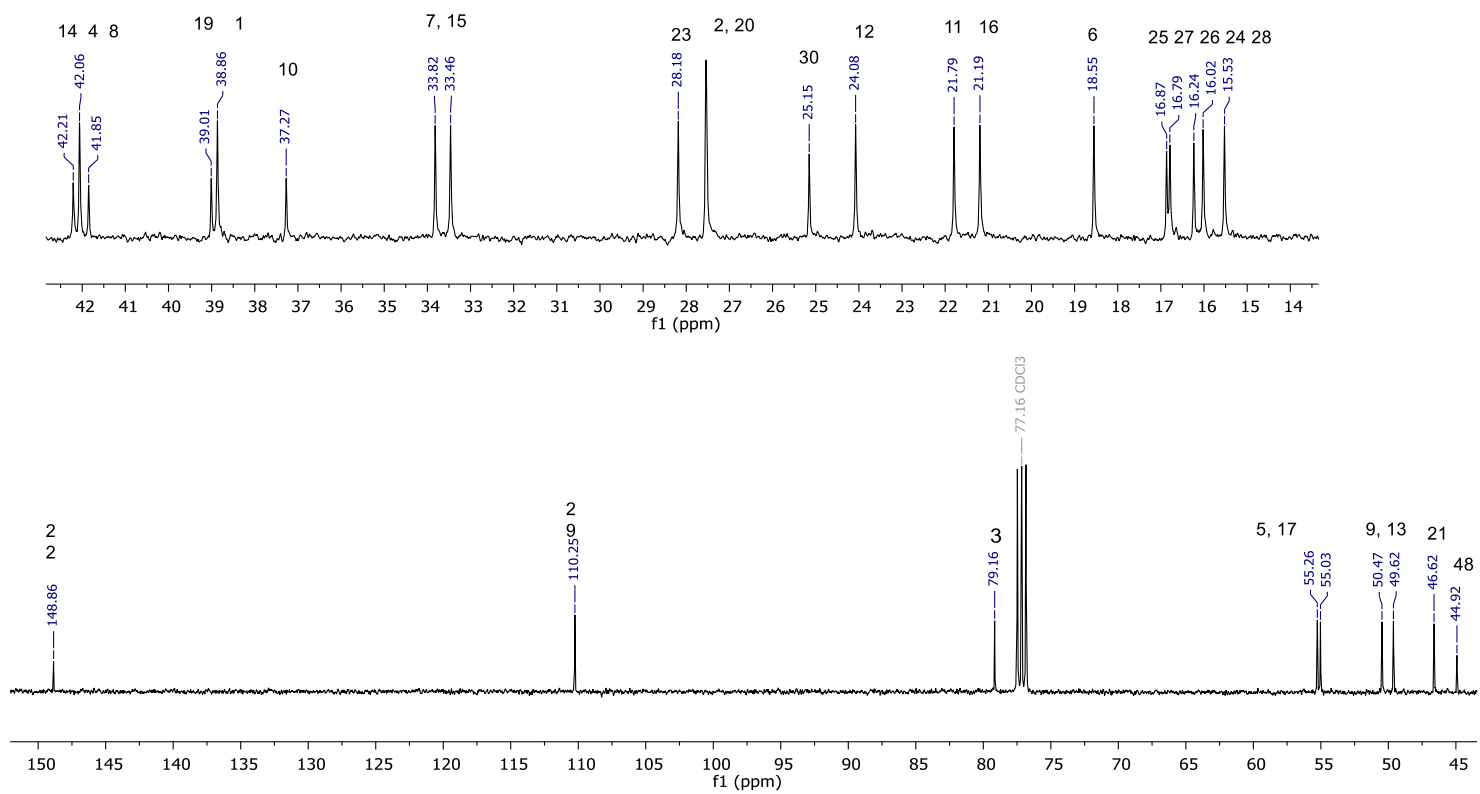
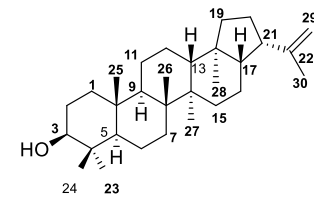
Espectro 3. RMN ^1H (700 MHz, CDCl_3) de hopenona (**34**)



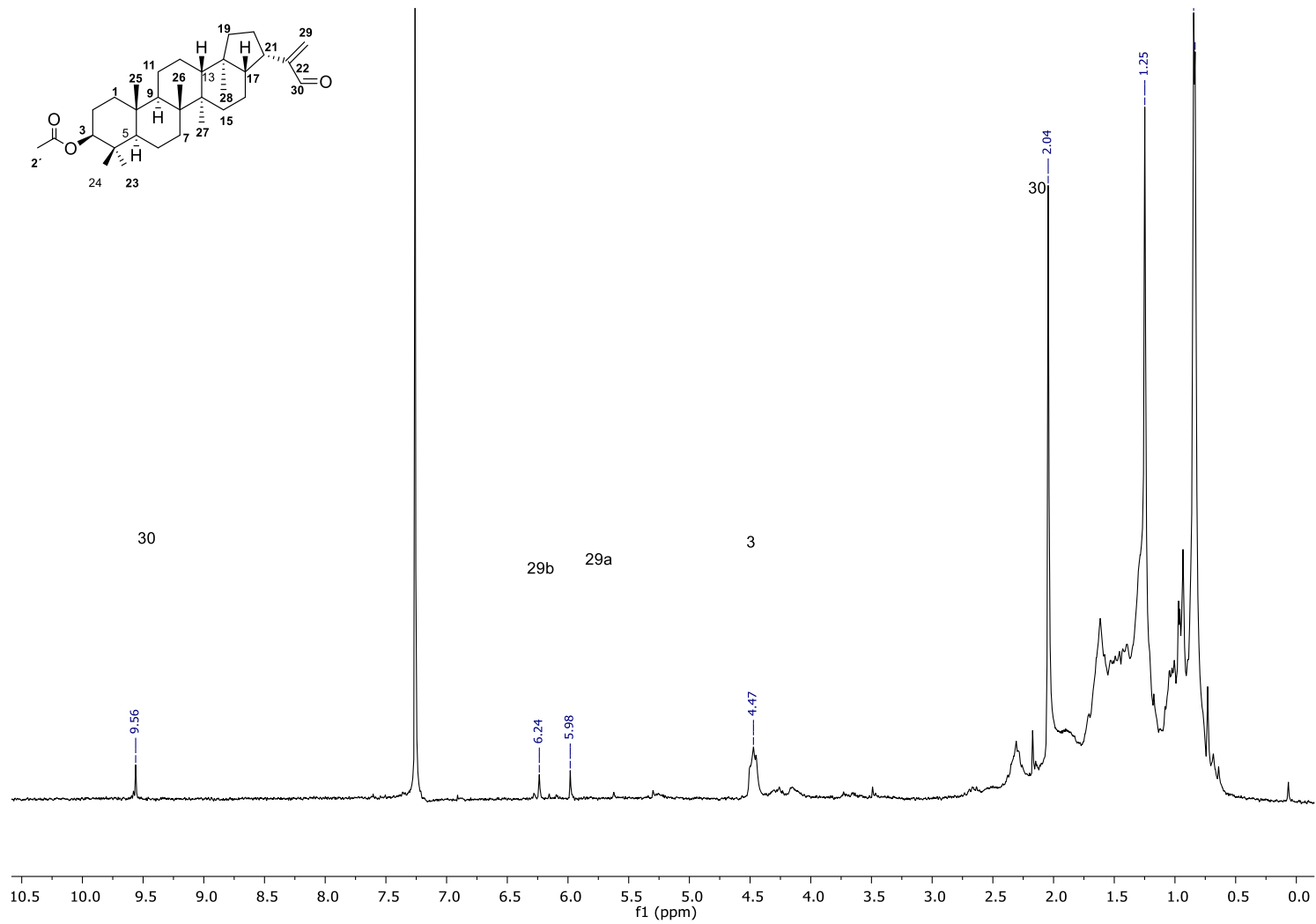
Espectro 4. RMN ¹³C (175 MHz, CDCl₃) de hopenona (**34**)



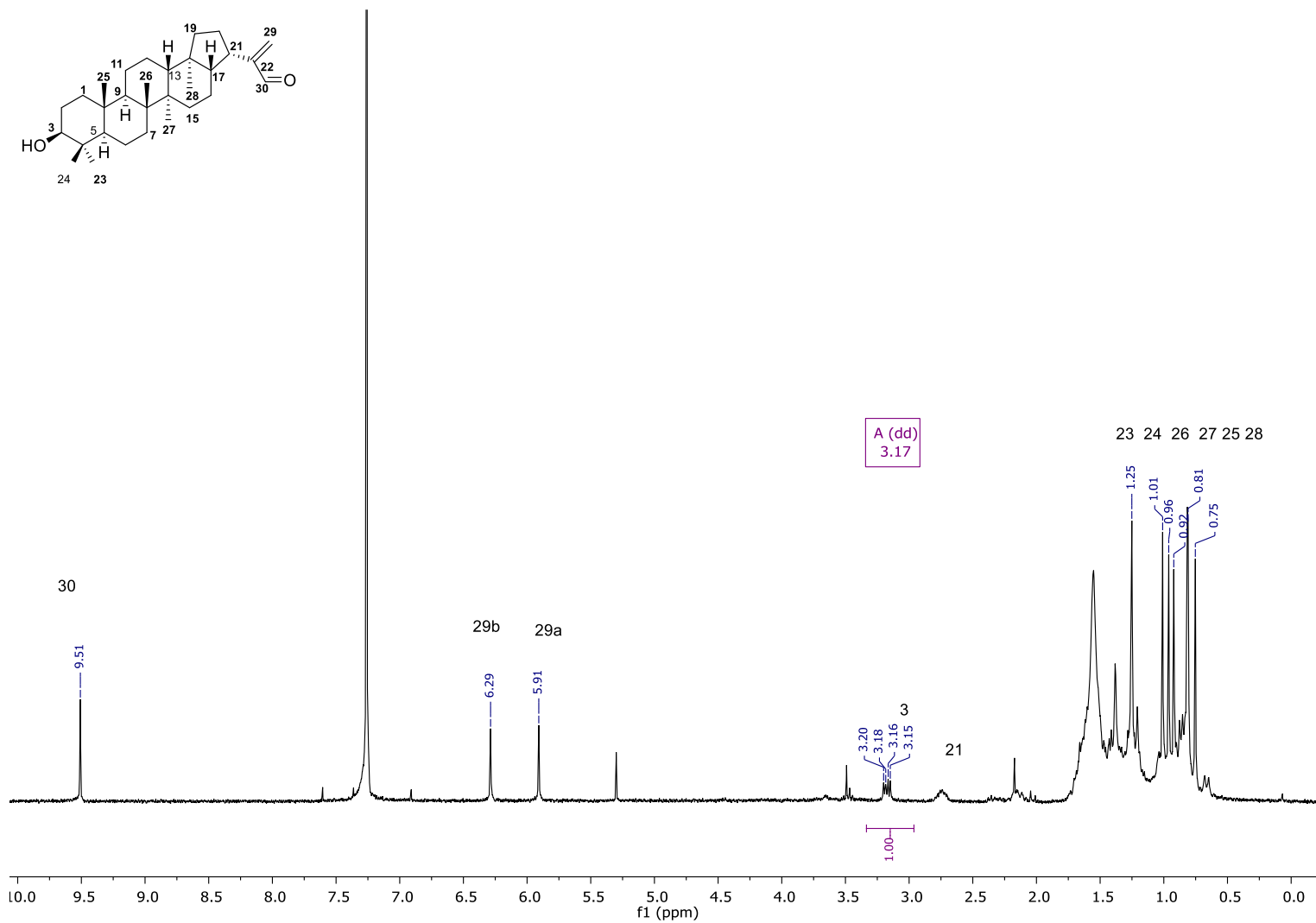
Espectro 5. RMN ¹H (700 MHz, CDCl₃) de hopenol (**35**)



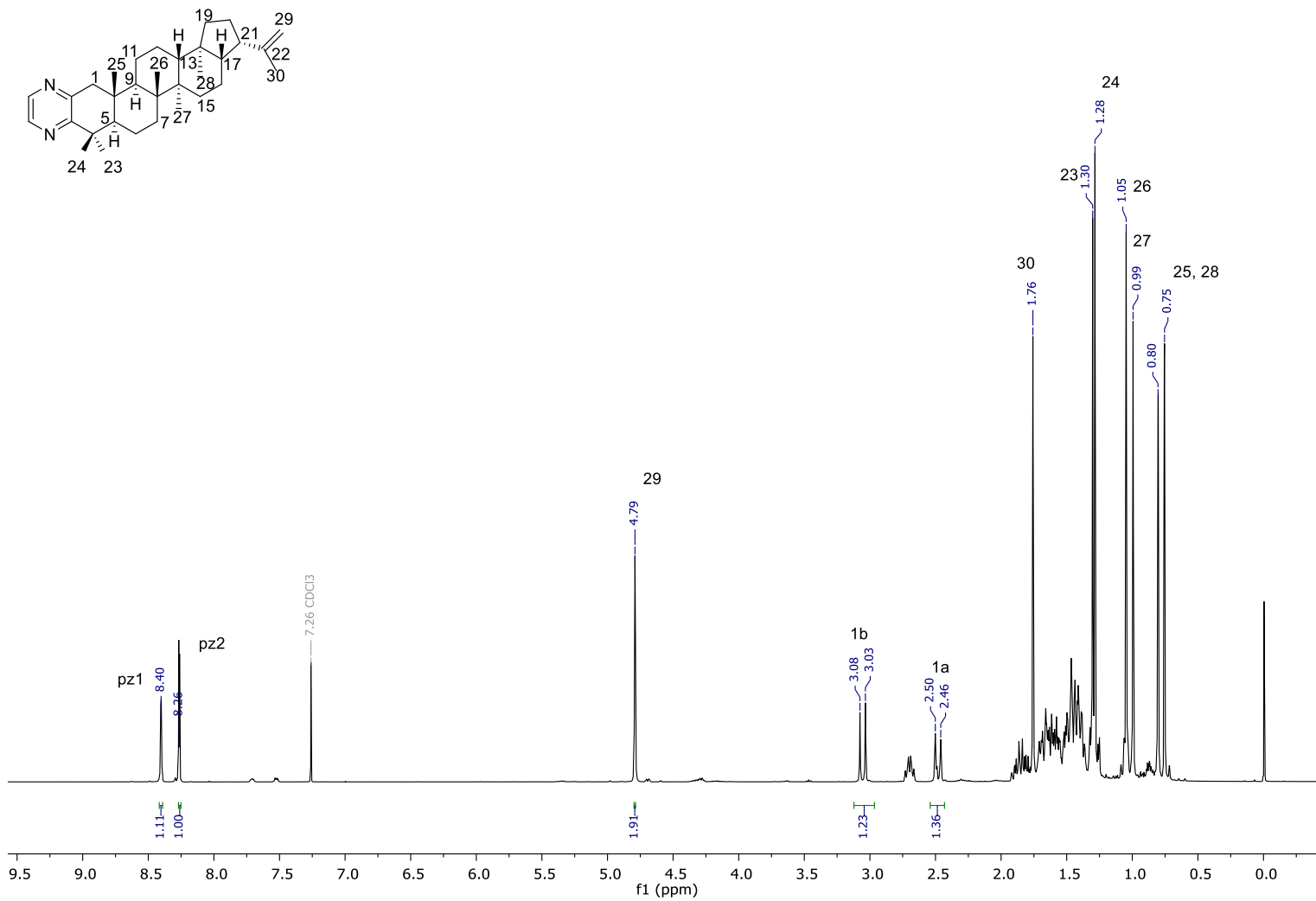
Espectro 6. RMN ¹³C (175 MHz, CDCl₃) de hopenol (35)



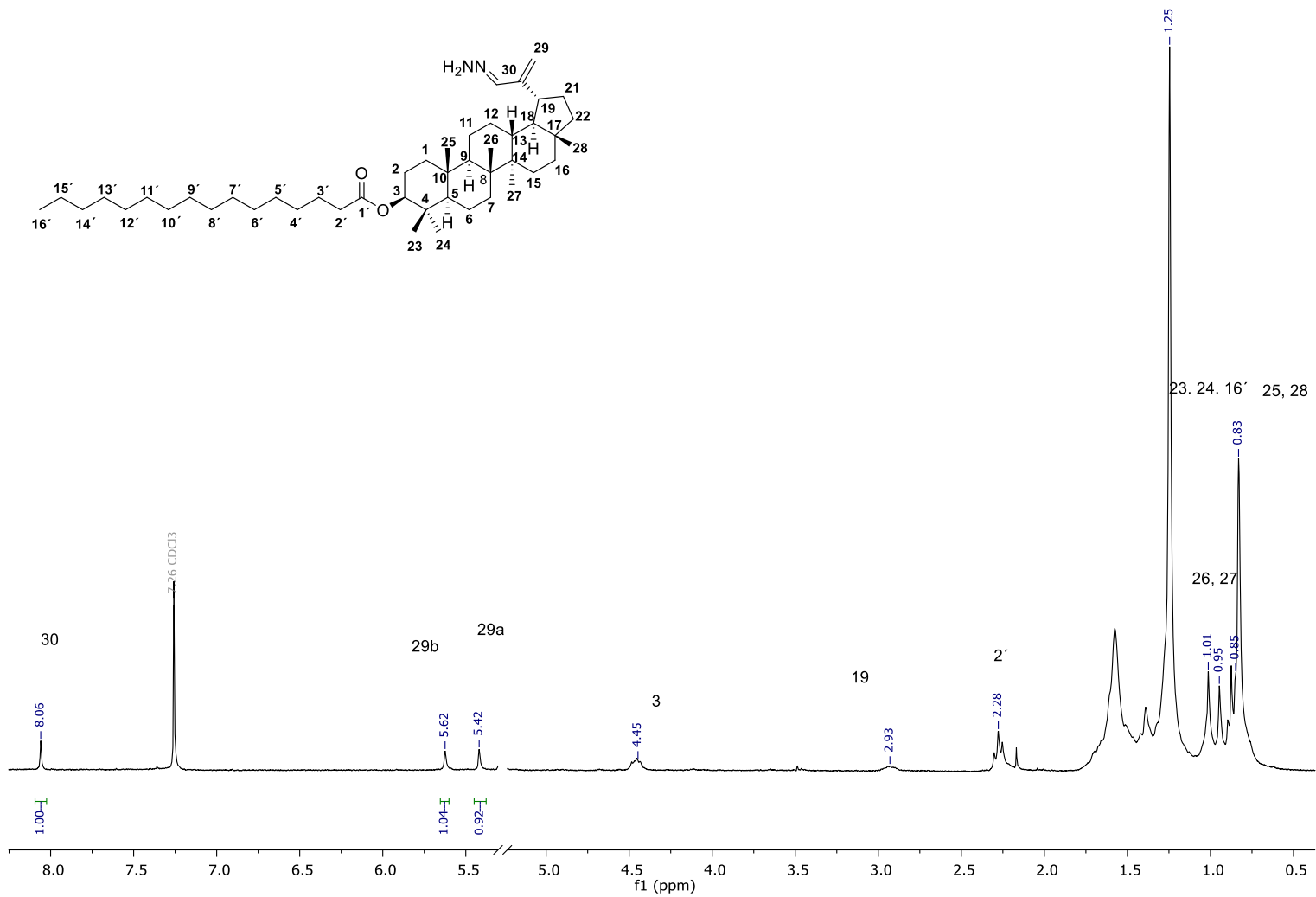
Espectro 7. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) de 30-oxo-acetato de hopenilo (**38**)



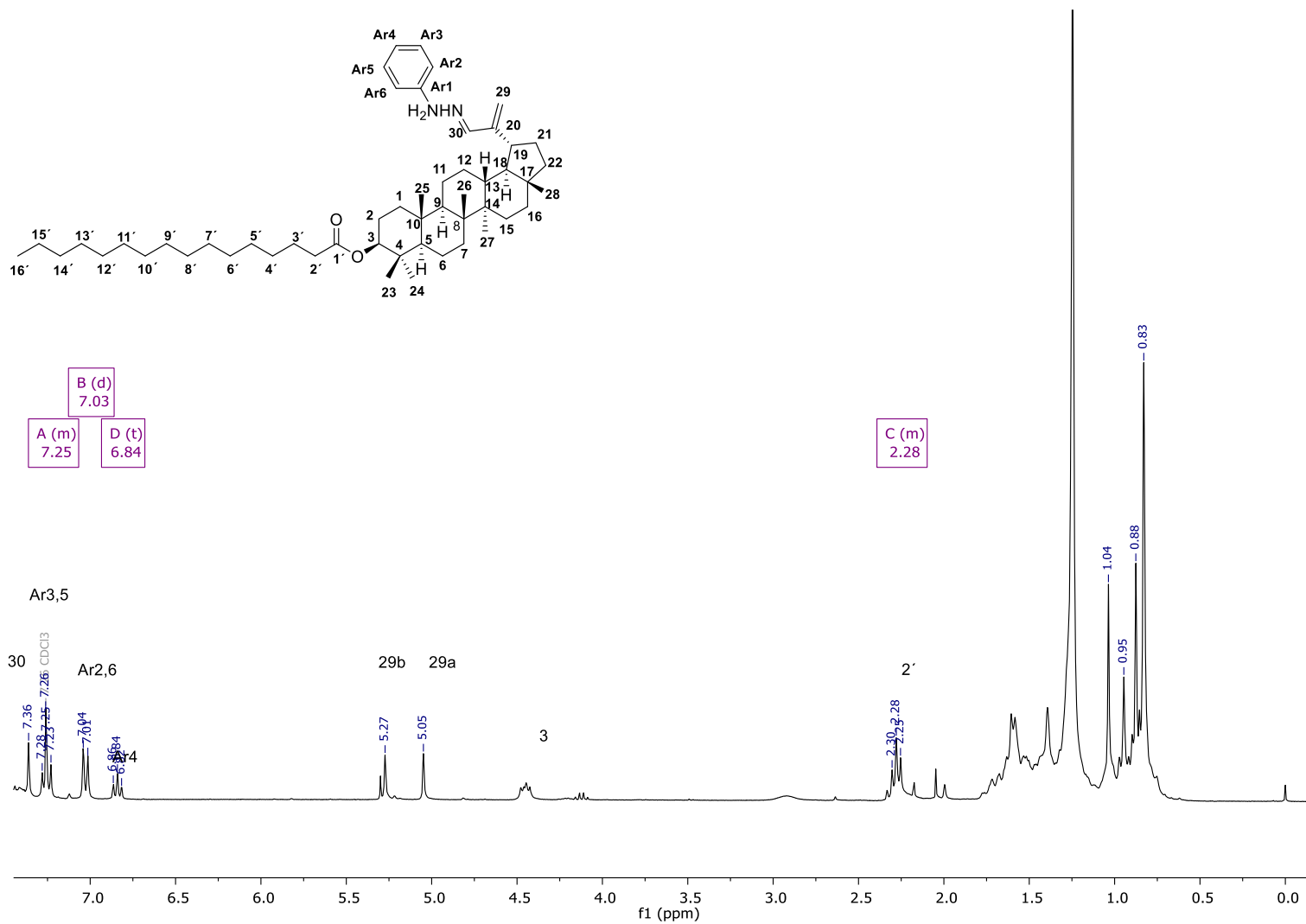
Espectro 8. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) de 30-oxo-hopanol (**39**)



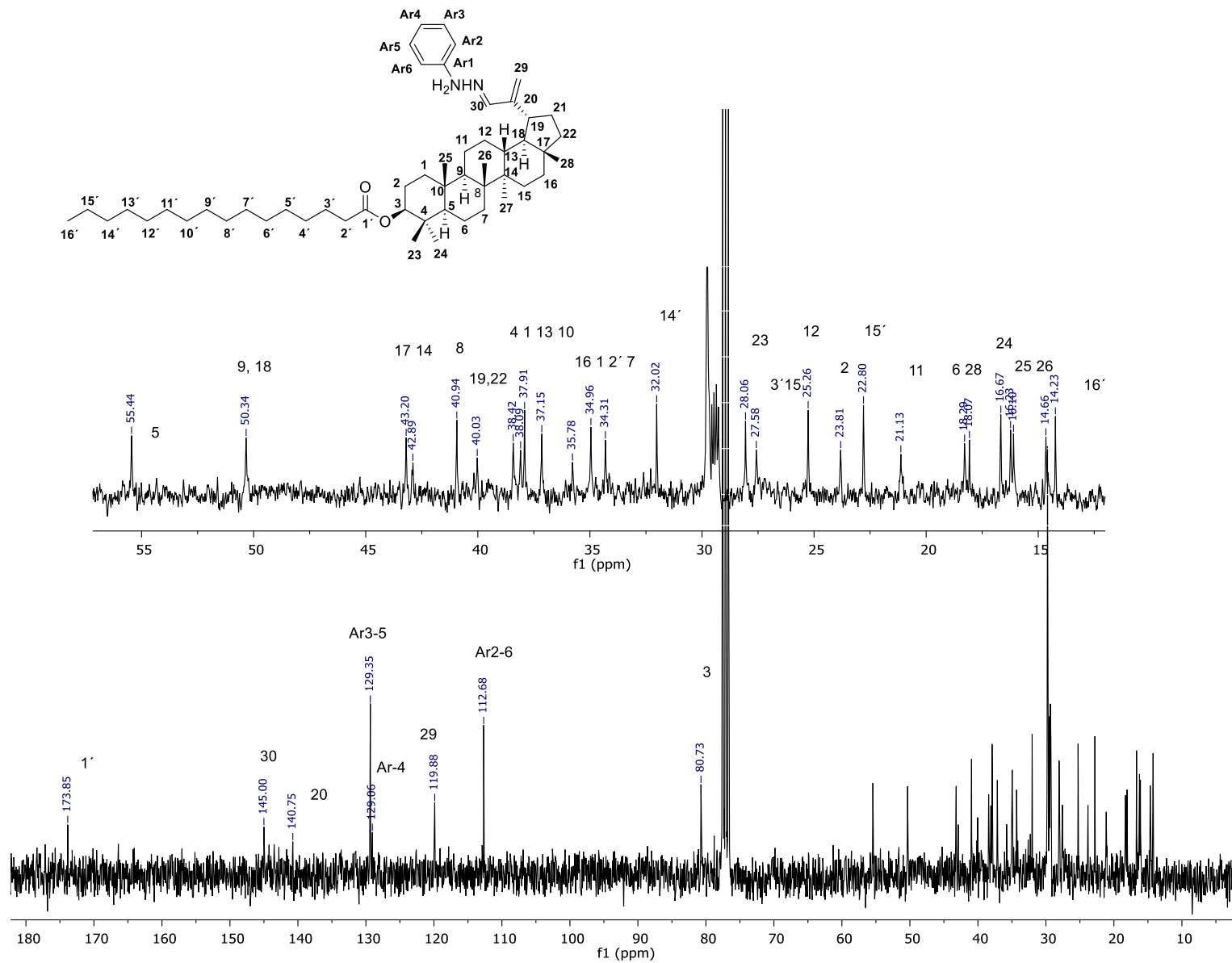
Espectro 9. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) de [2,3-*b*]-pirazina de hopenol (**40**)



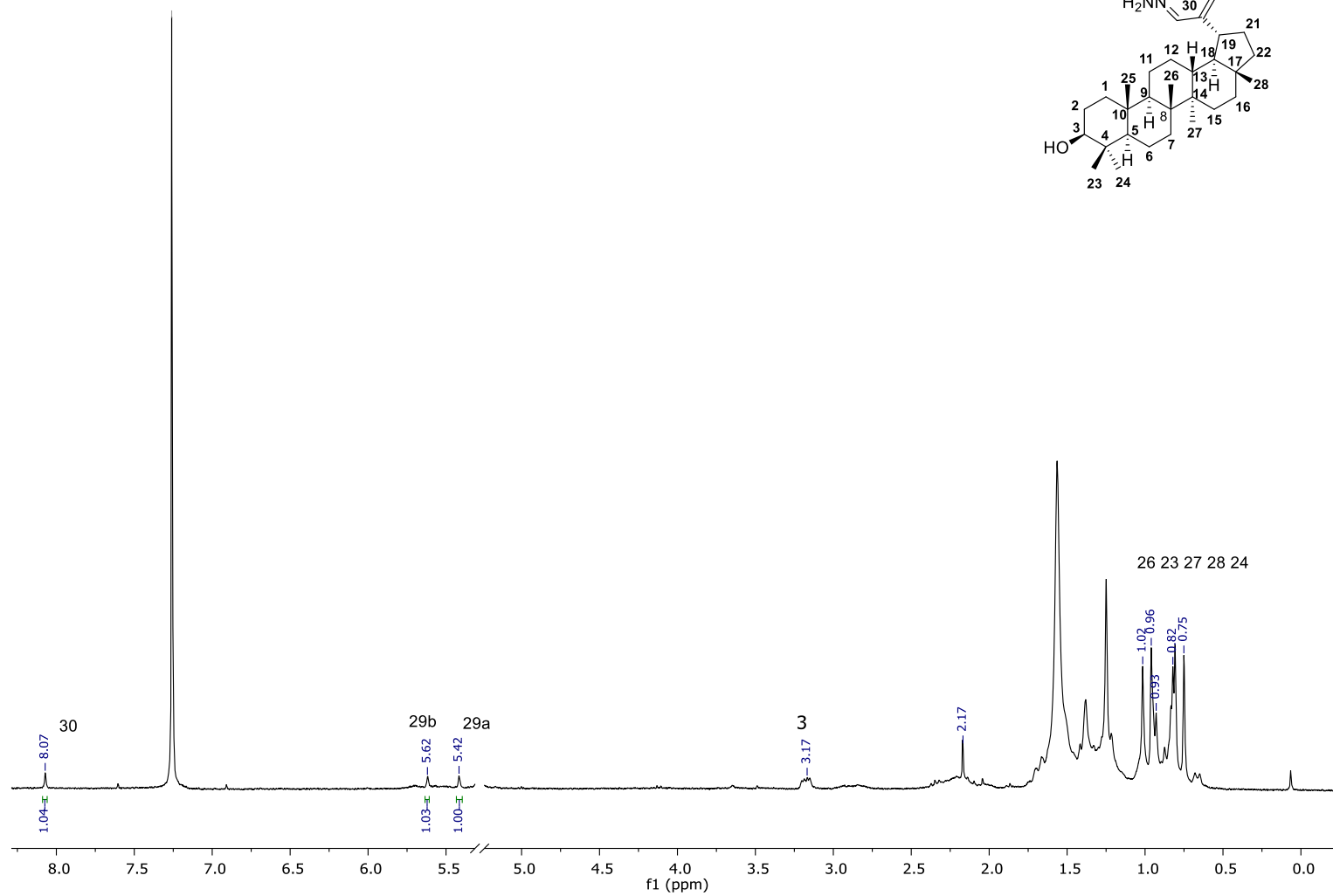
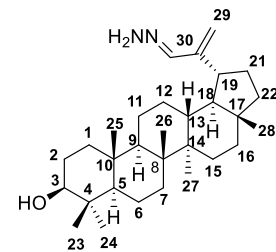
Espectro 10. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de hidrazona de 30-oxo-palmitato de lupeól (42)



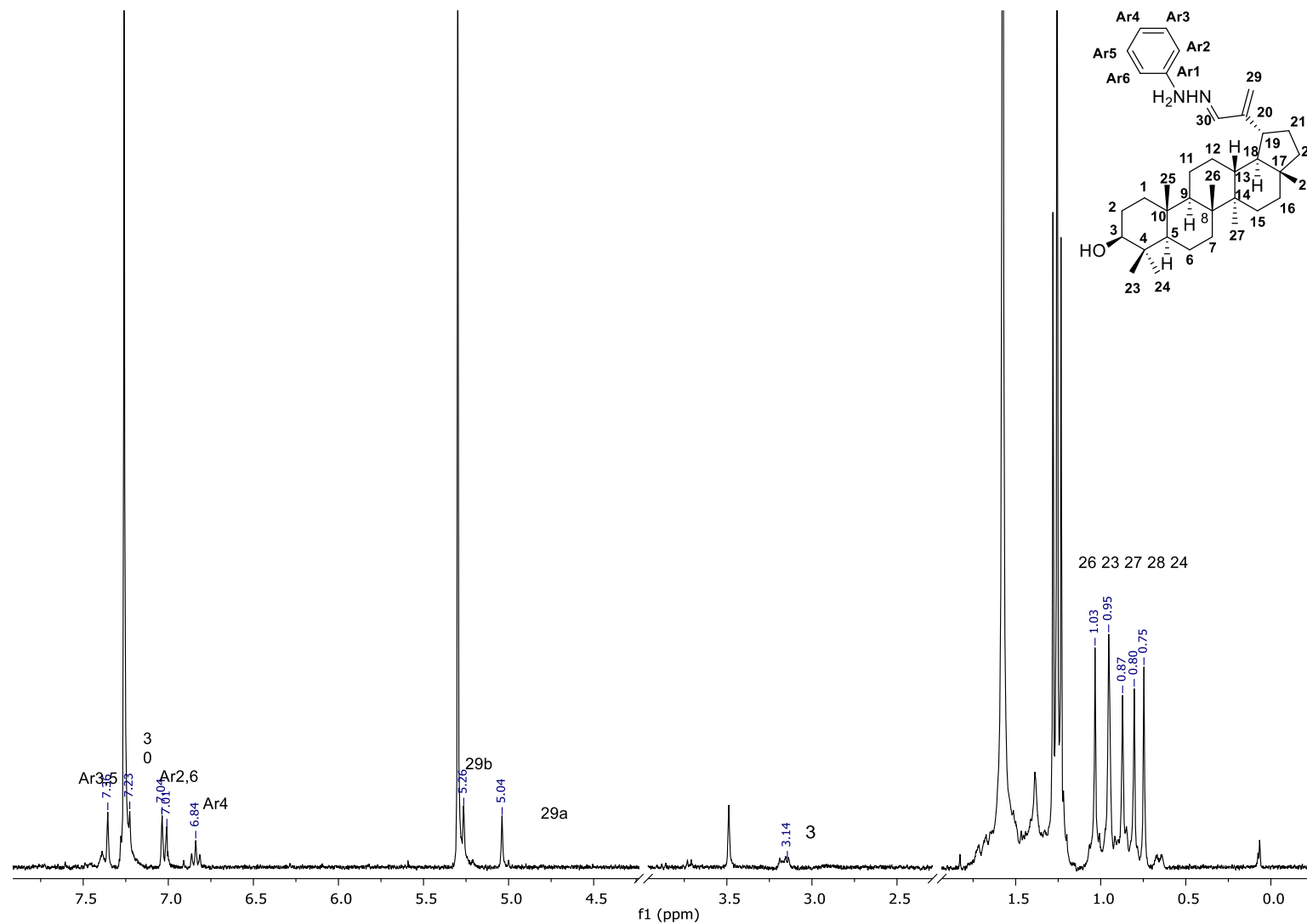
Espectro 11. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) fenilhidrazona de 30-oxo-palmitato de lupeño (**44**)



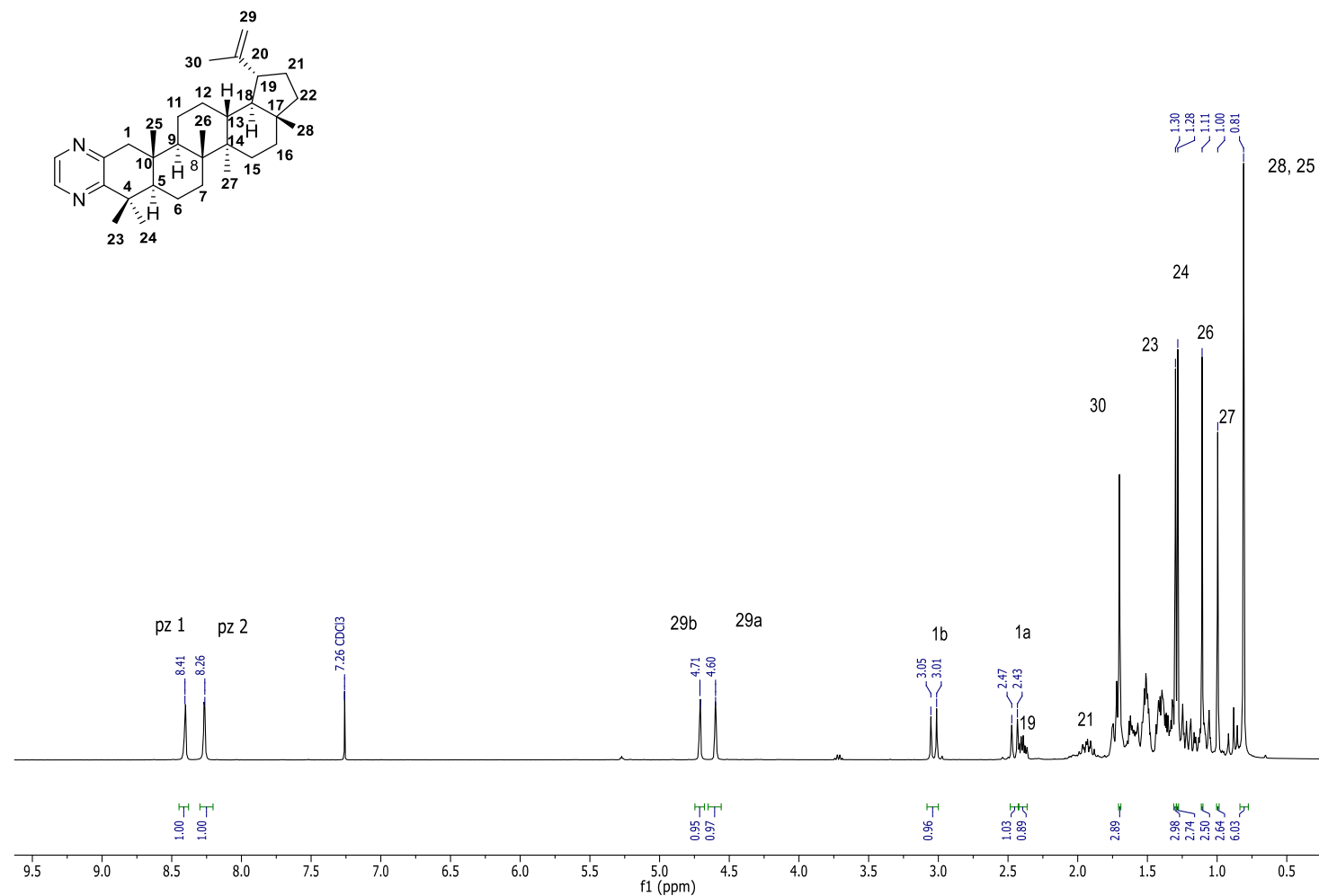
Espectro 12. RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) fenilhidrazona de 30-oxo-palmitato de lupeño (**44**)



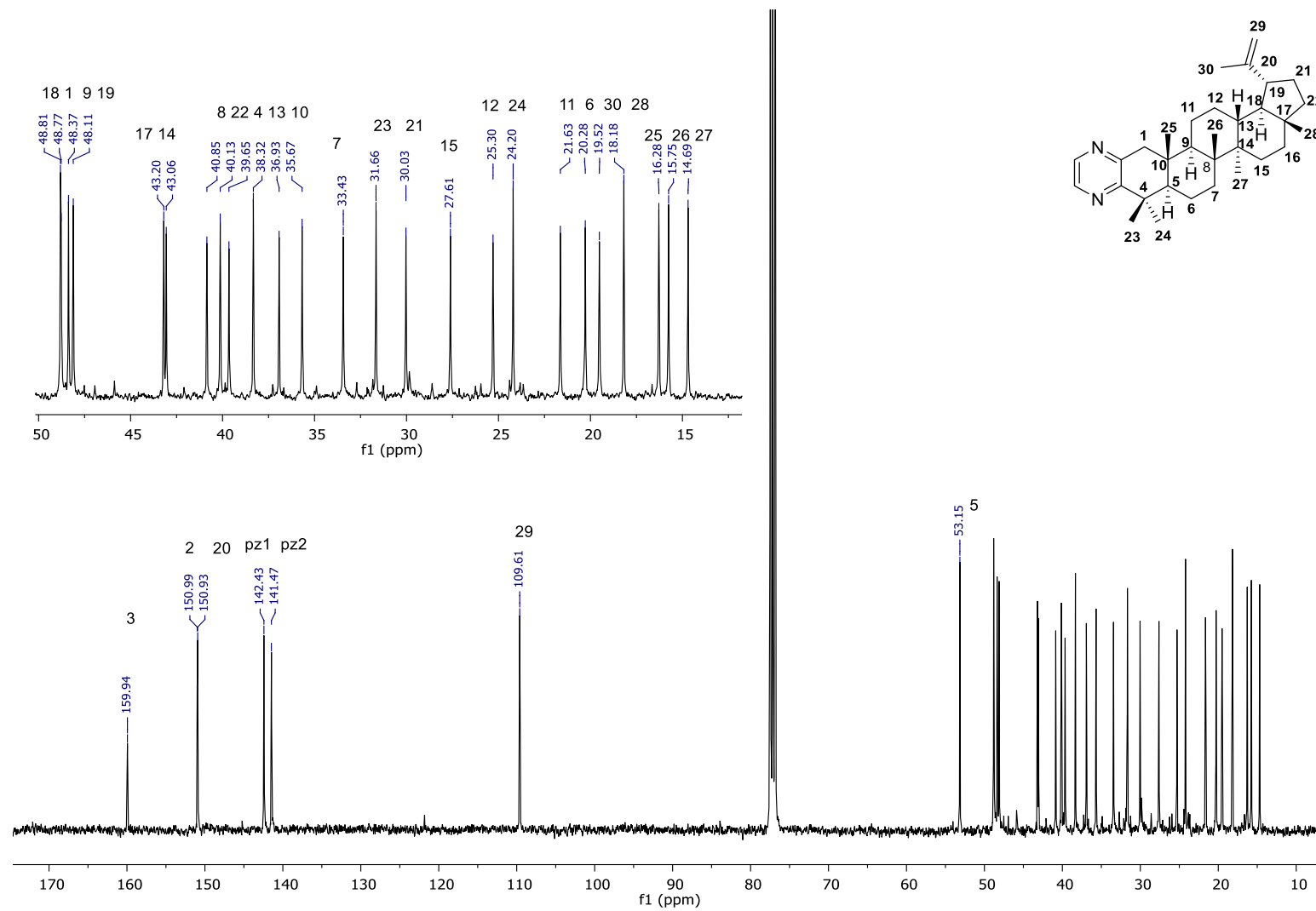
Espectro 13. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de hidrazona de 30-oxo-lupeol (**47**)



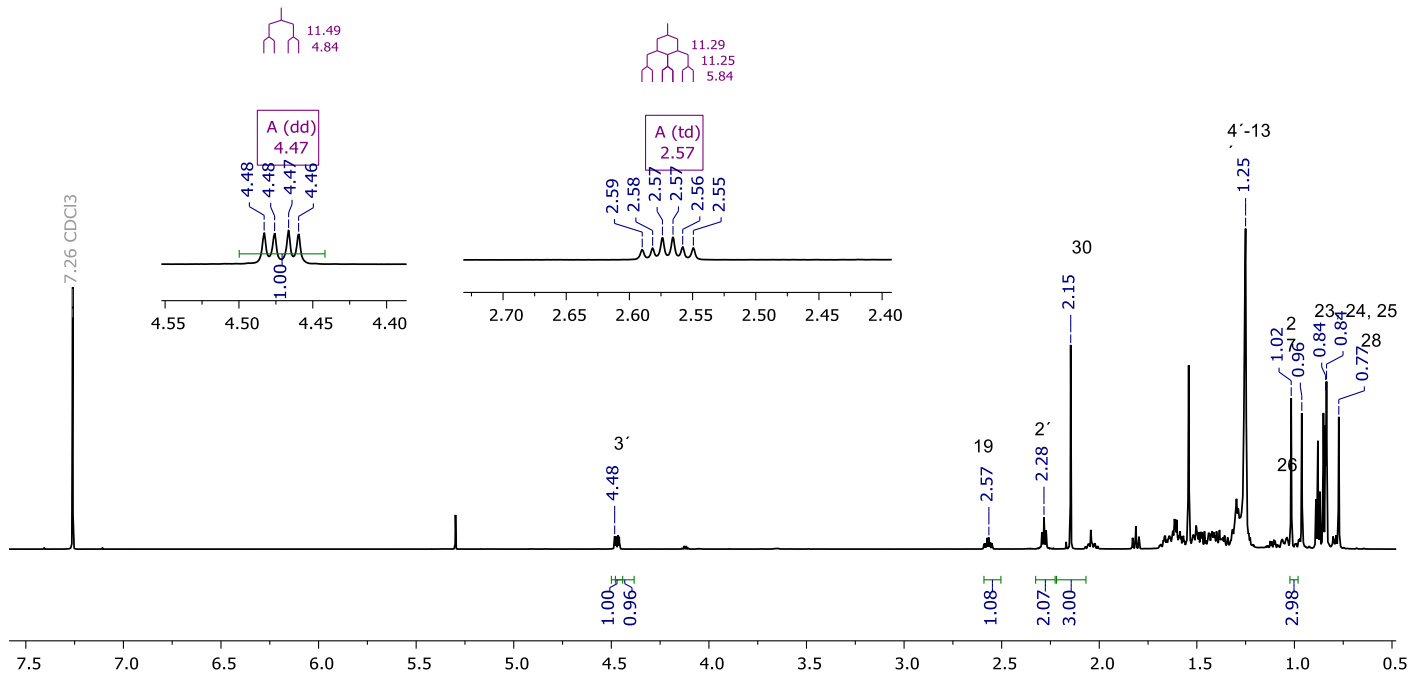
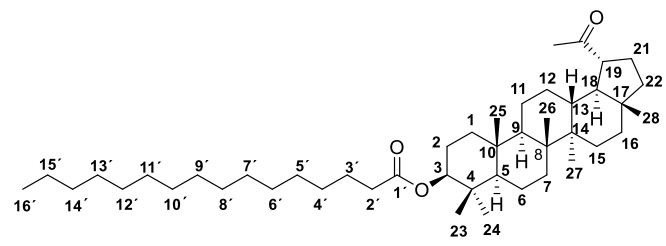
Espectro 14. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de fenilhidrazona de 30-oxo-lupeol (**48**)



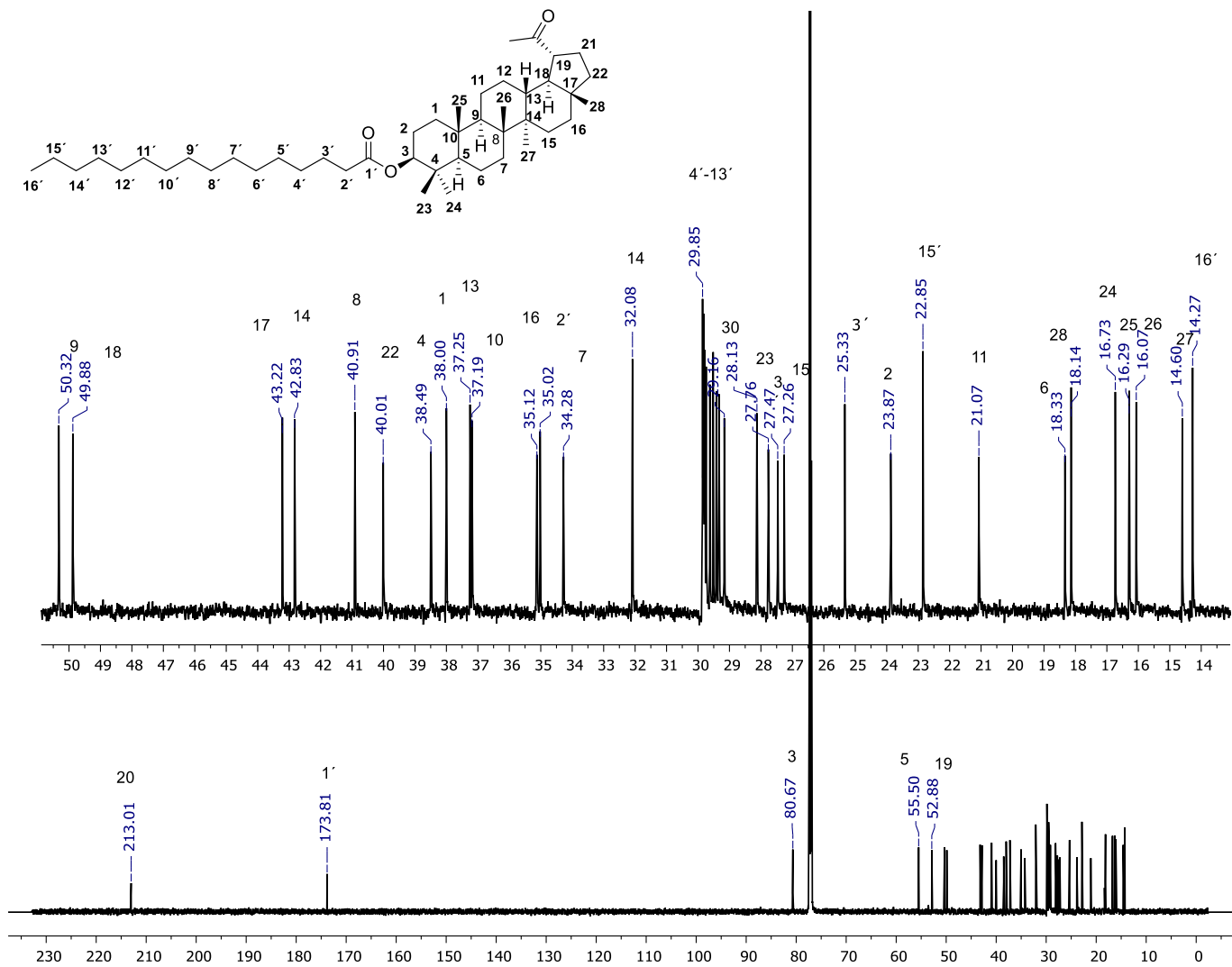
Espectro 15. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de [2,3-*b*]-pirazina de lupeol (**30**)



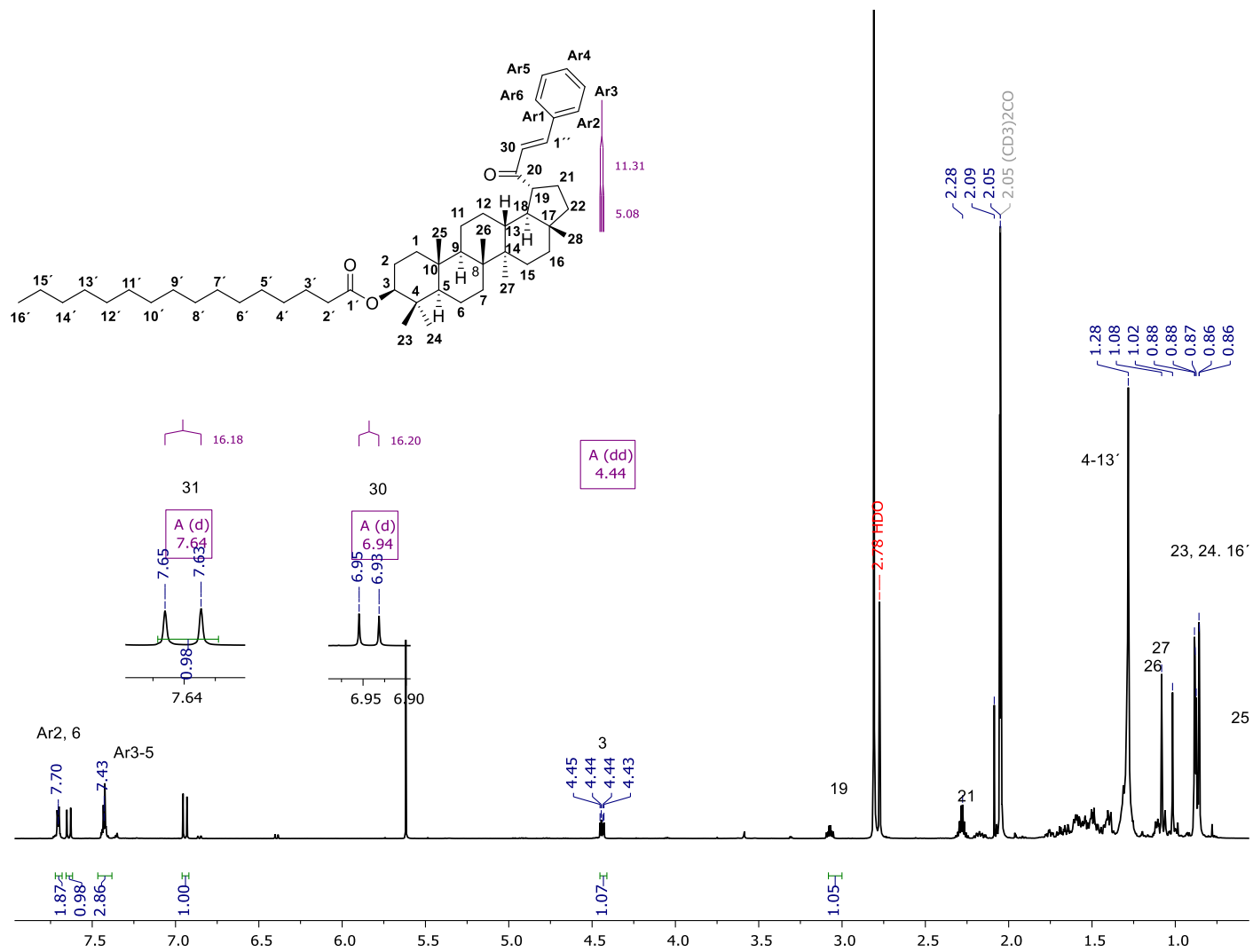
Espectro 16. RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) de [2,3-*b*]-pirazina de lupeol (**30**)



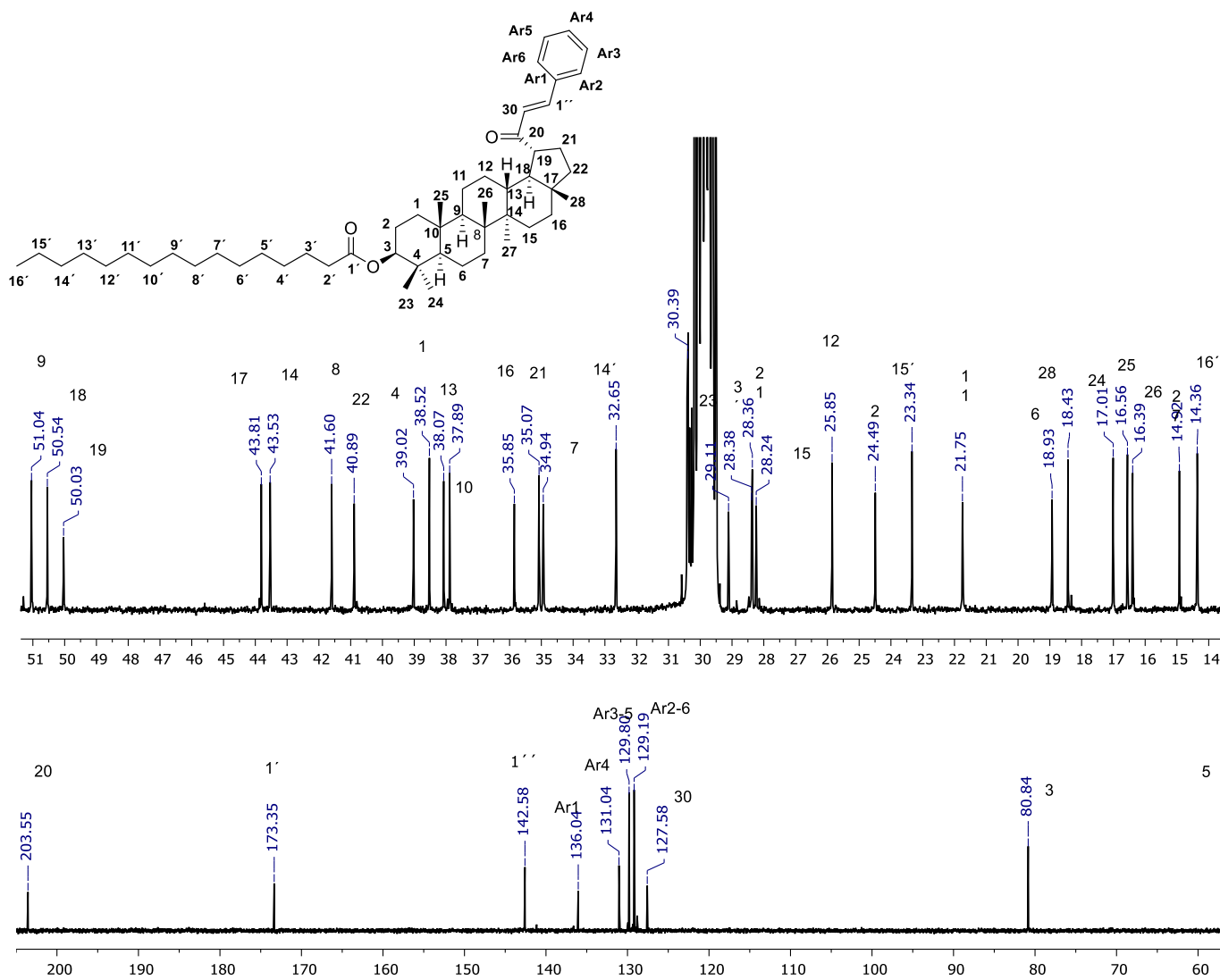
Espectro 17. RMN ¹H (700 MHz, CDCl₃) de palmitato de 29-nor-20-oxolupéilo (**53**)



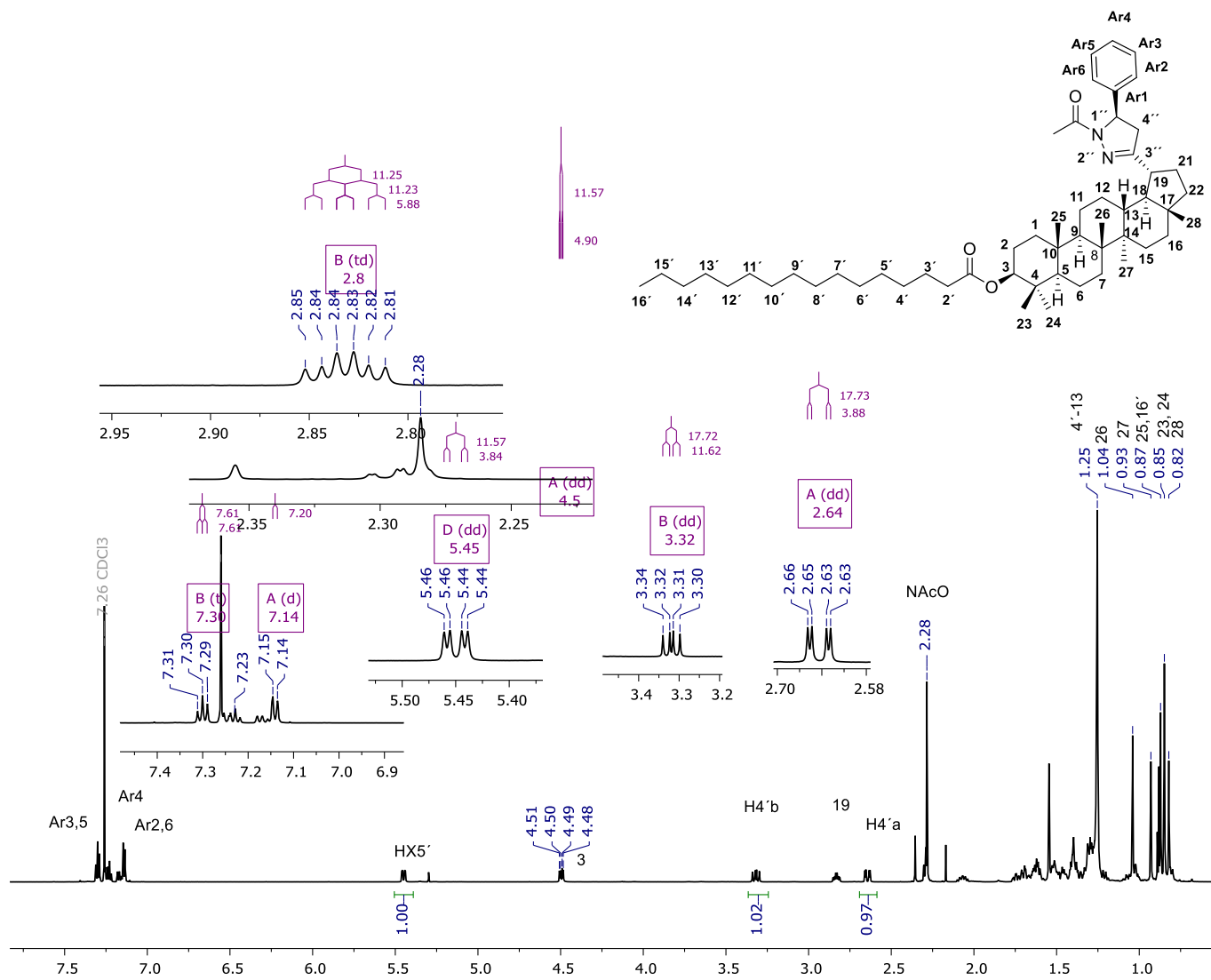
Espectro 18. RMN ^{13}C (175 MHz, CDCl_3) de palmitato de 29-nor-20-oxolupeño (53)



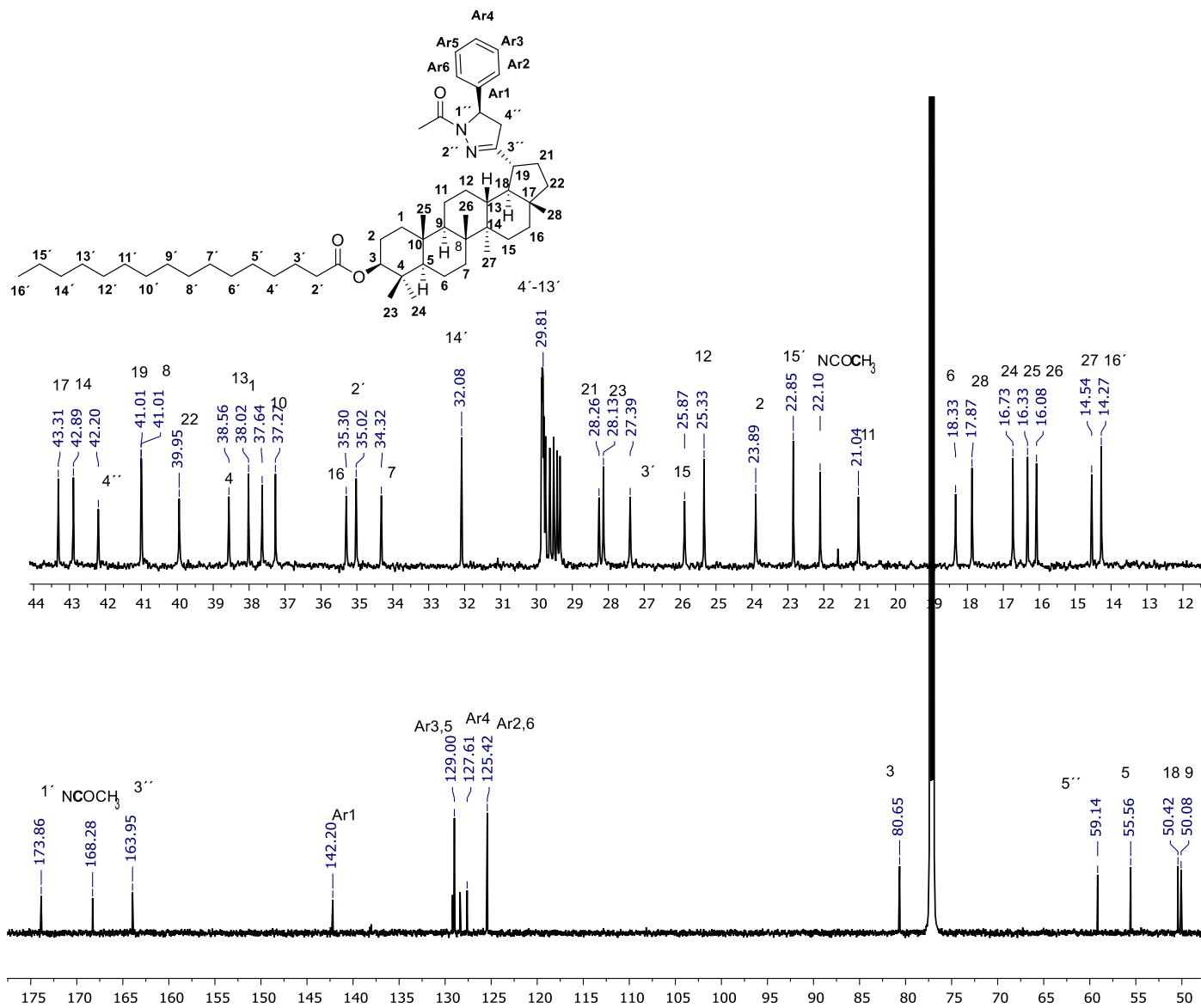
Espectro 19. RMN ¹H (700 MHz, acetona d₆) de palmitato de 29-nor-20-bencilidenlupeilo (**54**)



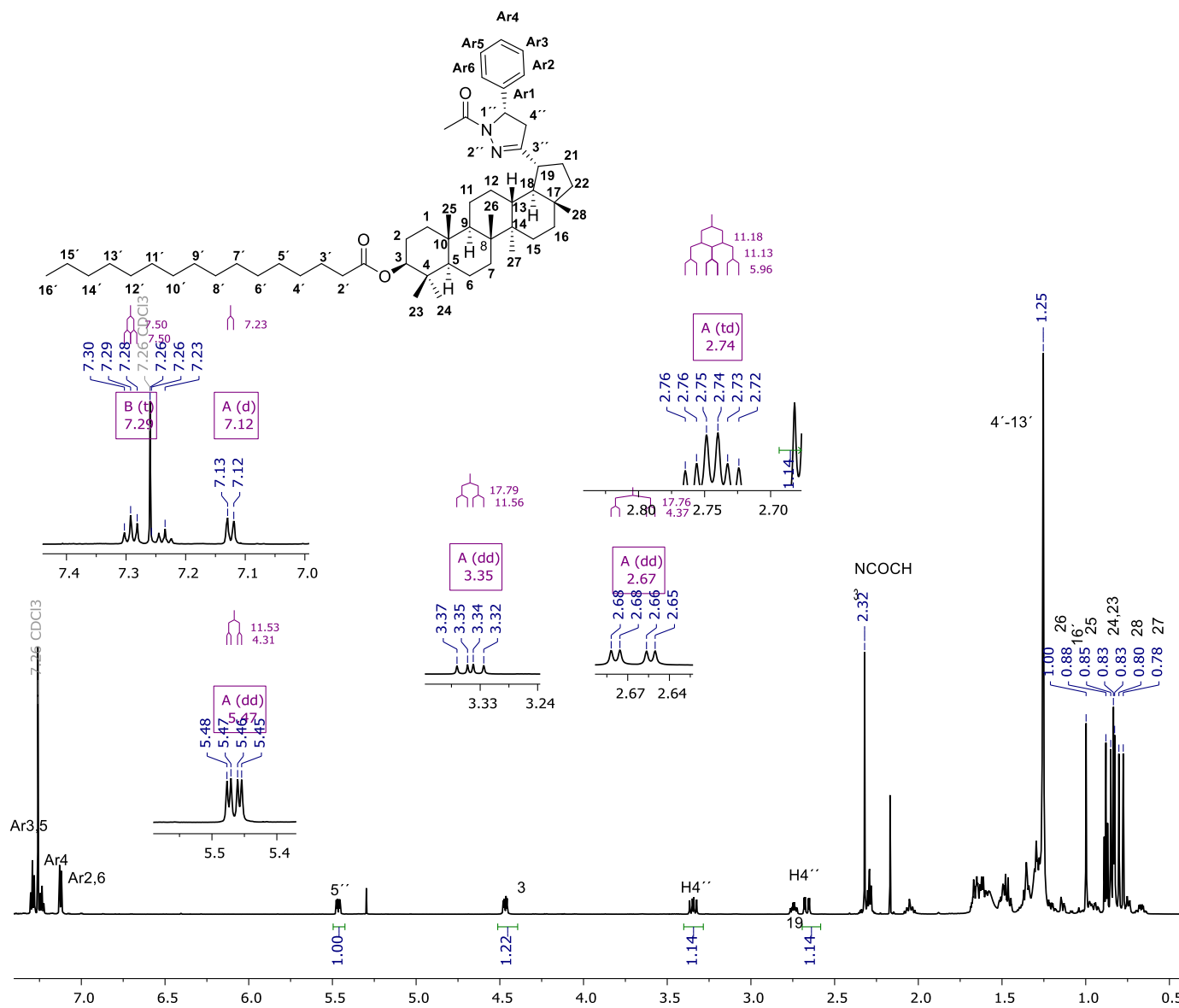
Espectro 20. RMN ^{13}C (175 MHz, acetona d_6) de palmitato de 29-nor-30-bencilidenlupeolo (**54**)



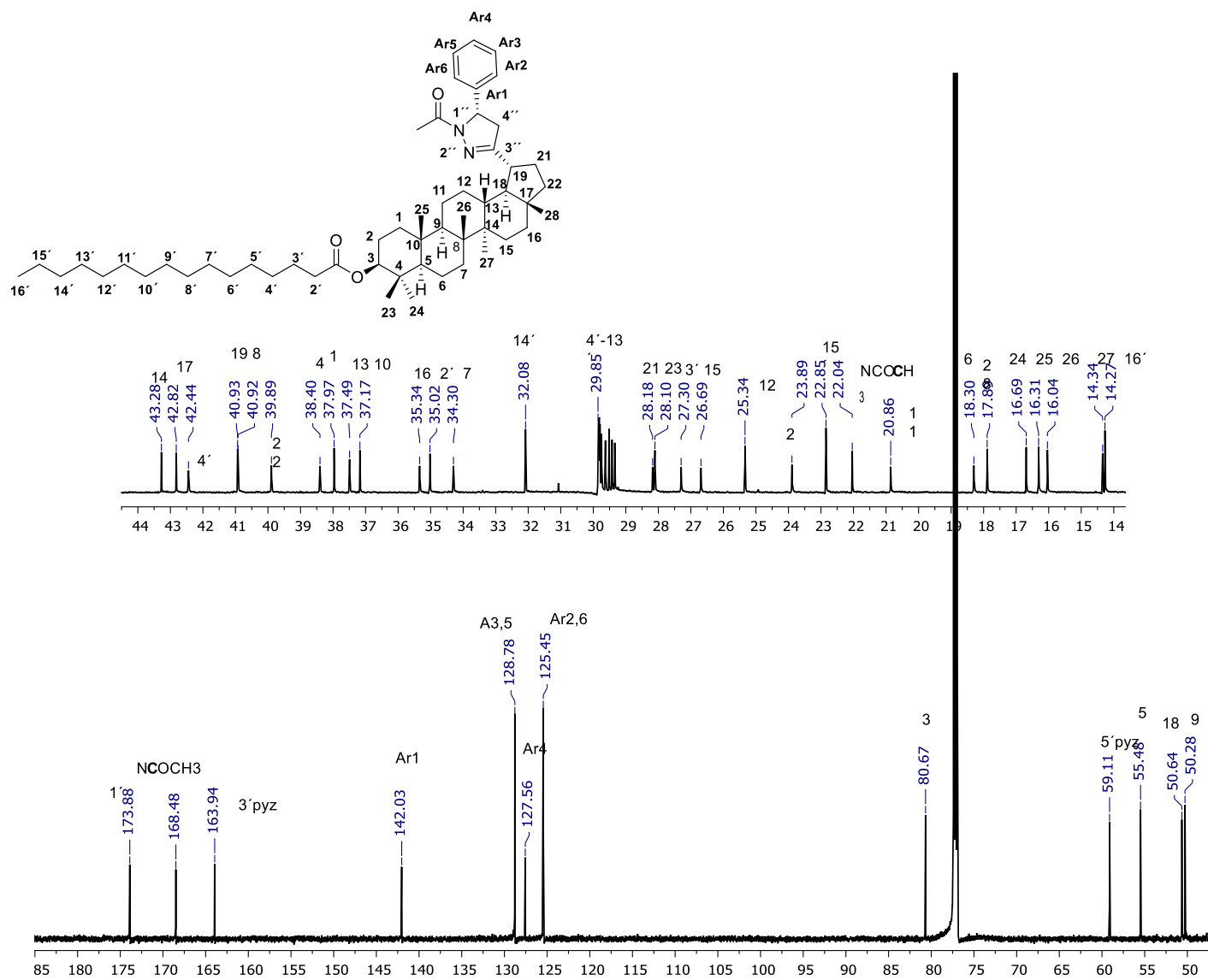
Espectro 21. RMN ^1H (700 MHz, CDCl_3) de (5''*R*)-*N*-acetil-5''-fenil-pirazolina derivada de palmitato de lupeño (**55**)



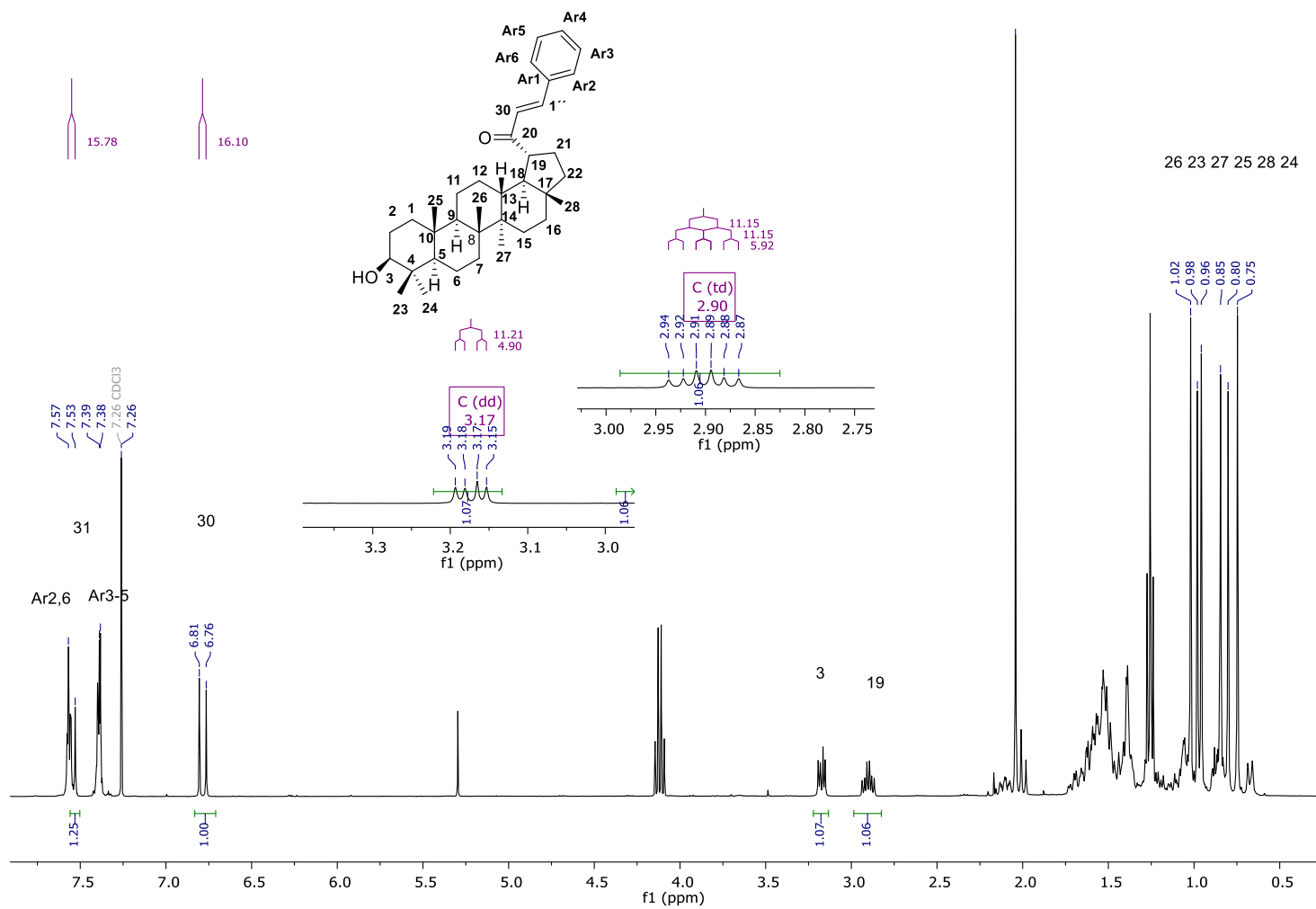
Espectro 22. RMN ^{13}C (175 MHz, CDCl_3) de (5''R)-N-acetil-5''-fenil-pirazolina derivada de palmitato de lupeño (**55**)



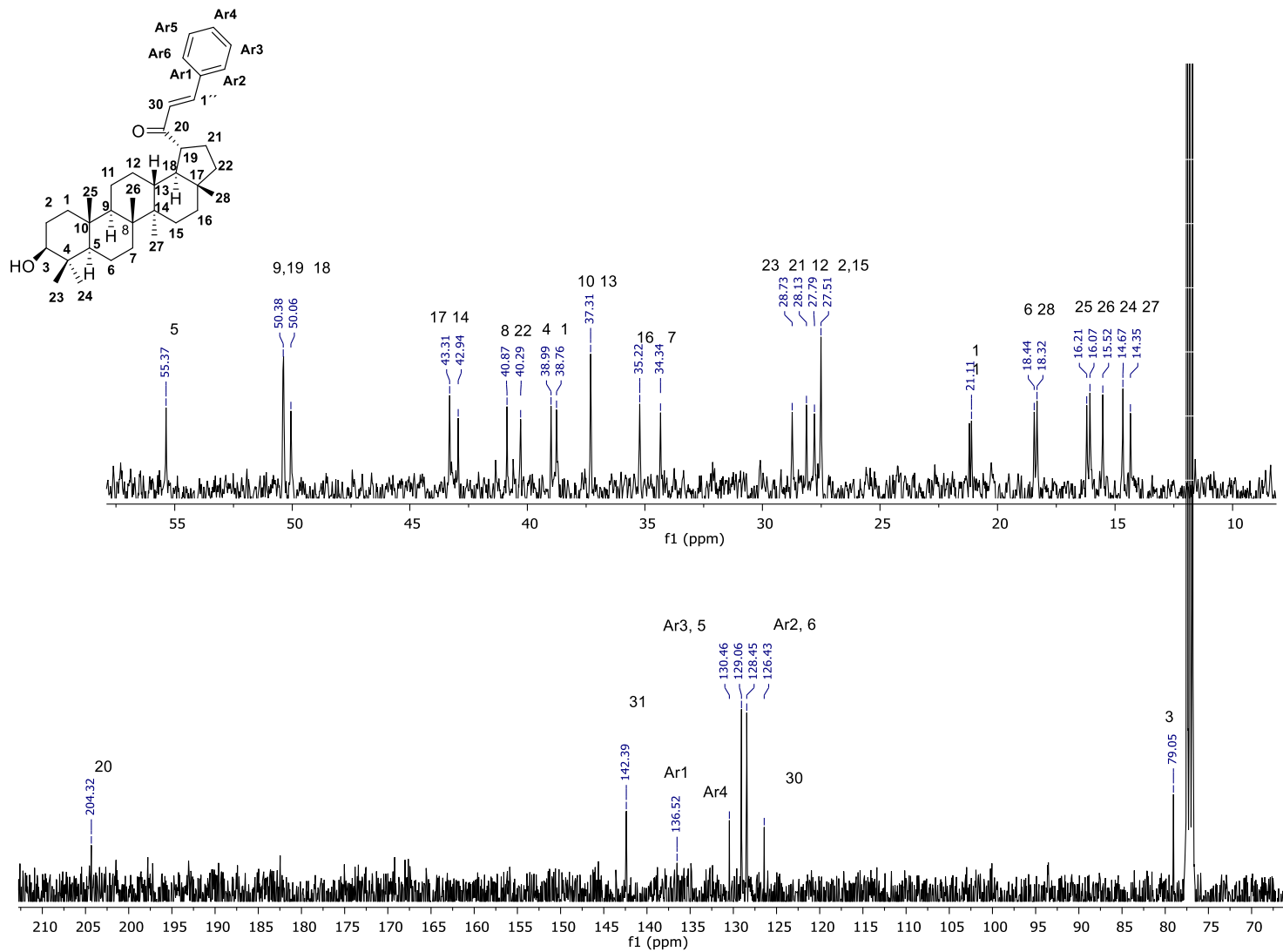
Espectro 23. RMN ¹H (700 MHz, CDCl₃) de (5''S)-N-acetil- 5''-fenil-pirazolina derivada de palmitato de lupeño (**56**)



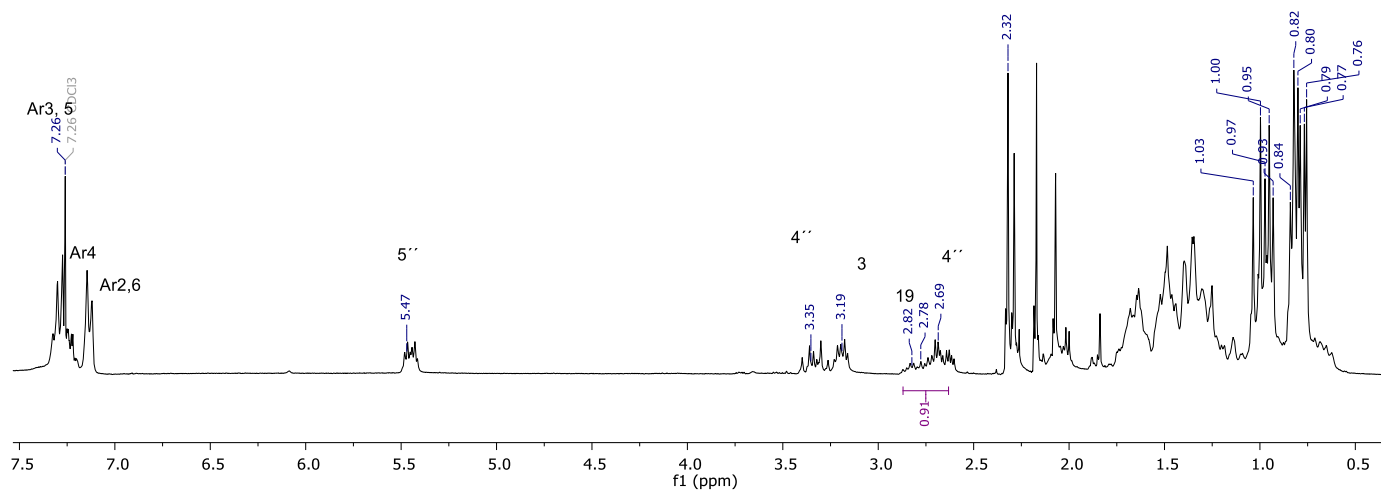
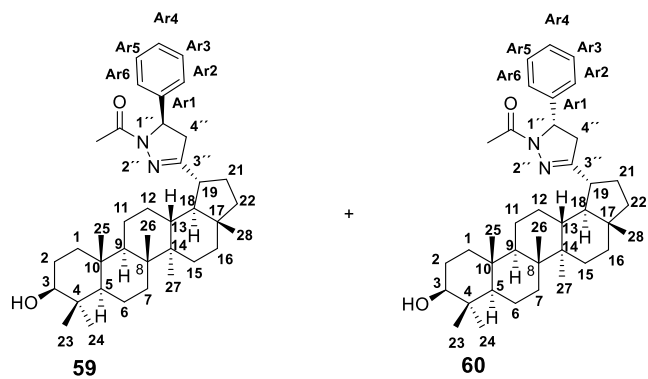
Espectro 24. RMN ¹³C (175 MHz, CDCl₃) de (5''S)-N-acetil- 5''-fenil-pirazolina derivada de palmitato de lupeño (**56**)



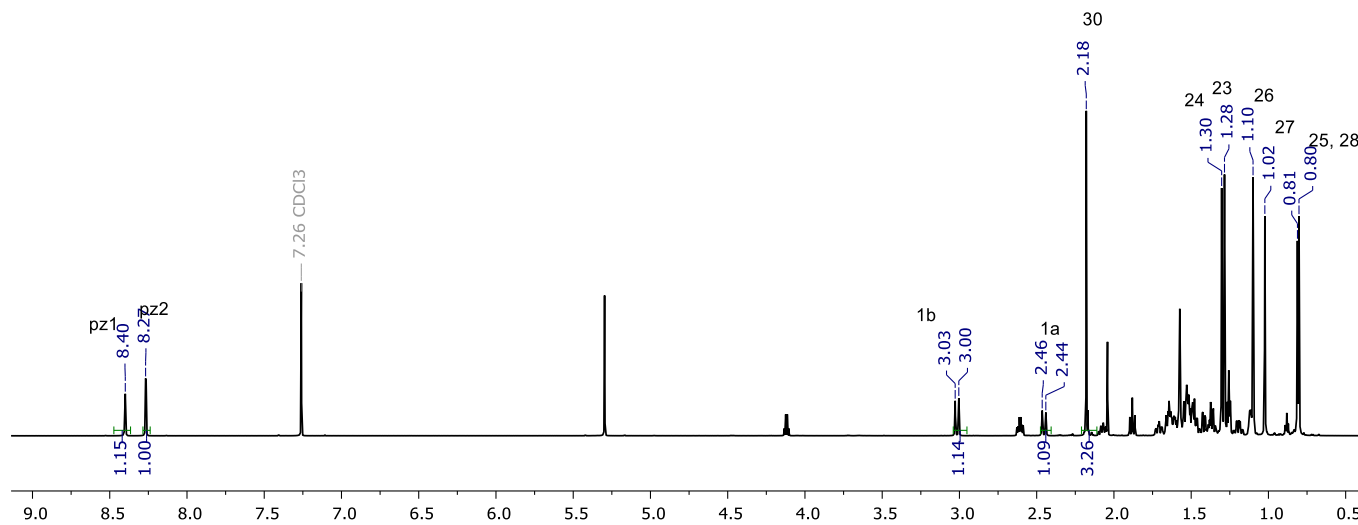
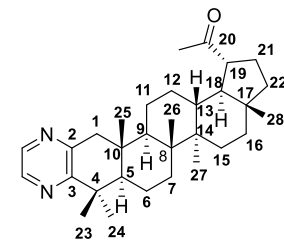
Espectro 25. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) de 29-nor-20-bencilidenlupeol (**58**)



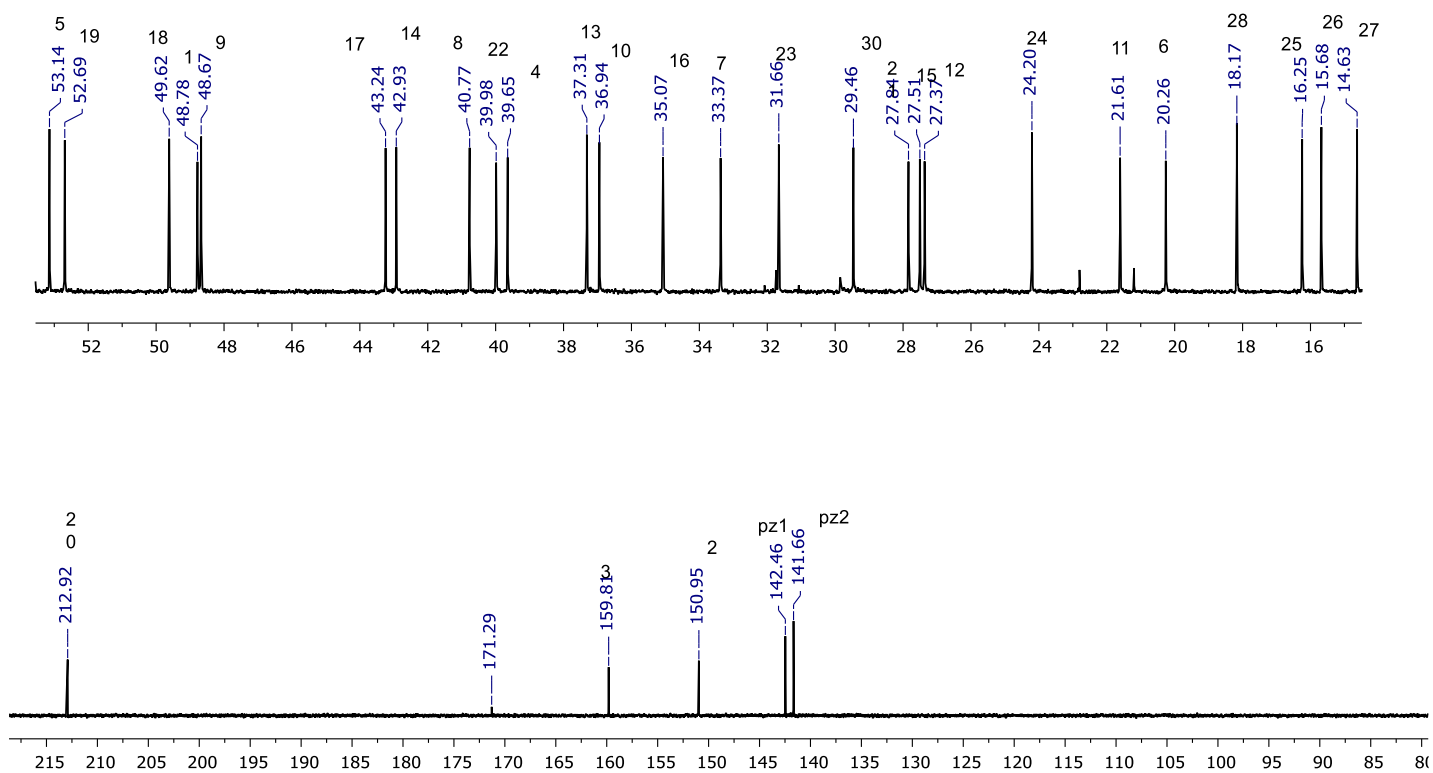
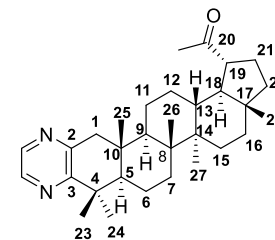
Espectro 26. RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) de 29-nor-20-bencilidenupeol (**58**)



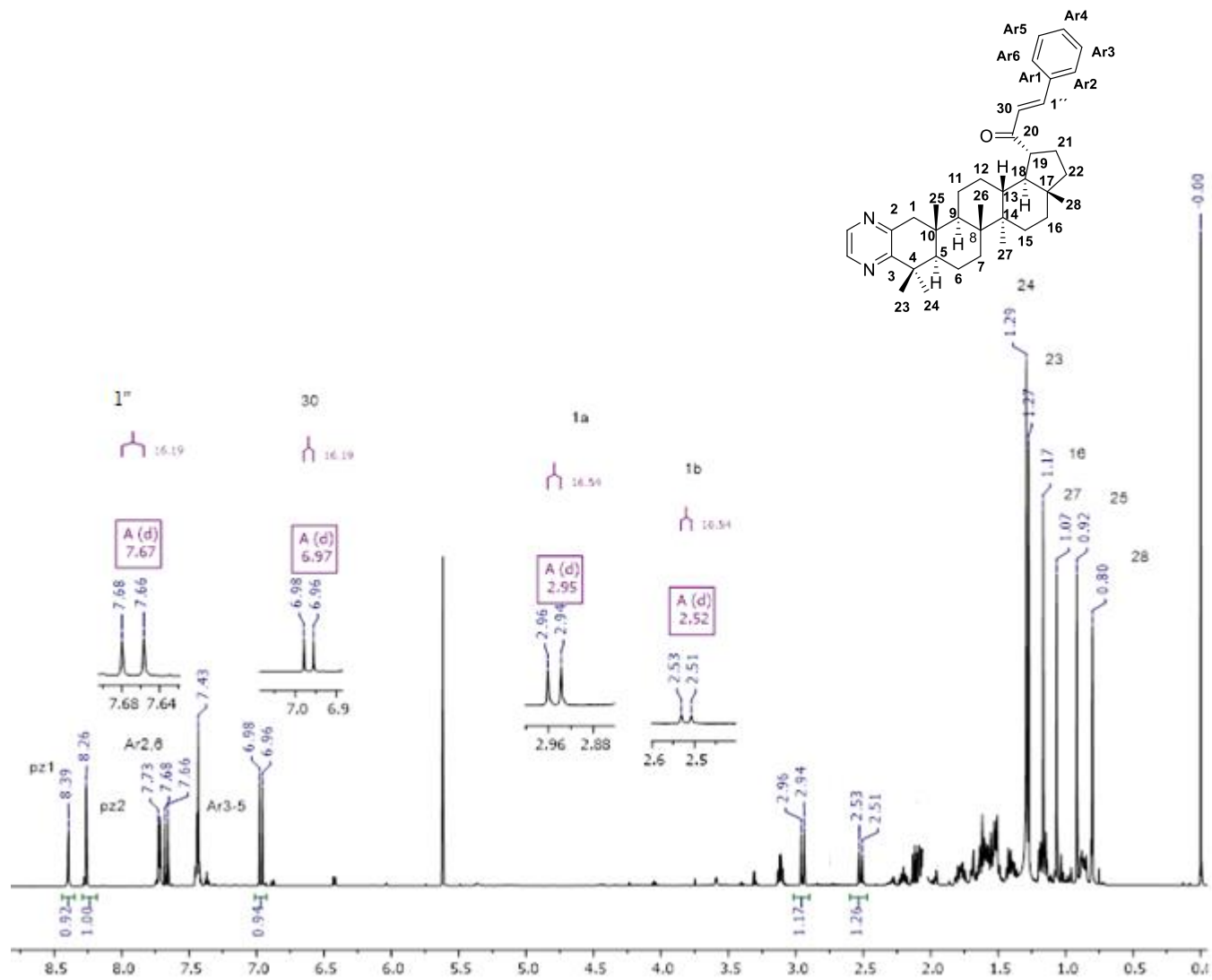
Espetro 27. RMN ¹H (300 MHz, CDC₃) del crudo de (5''*R*)-*N*-acetil-5''-fenil-pirazolina de lupeol (**59**) +(5''*S*)-*N*-acetil-5''-fenil-pirazolina de lupeol (**60**)



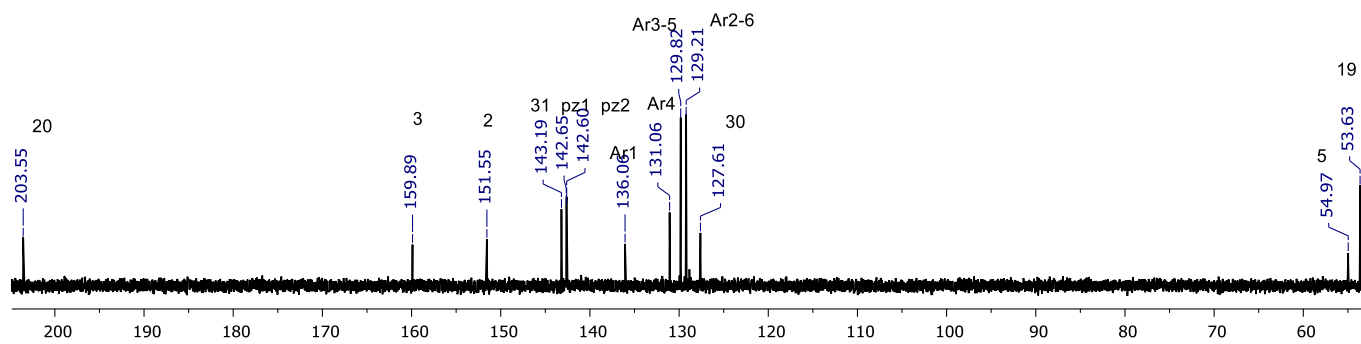
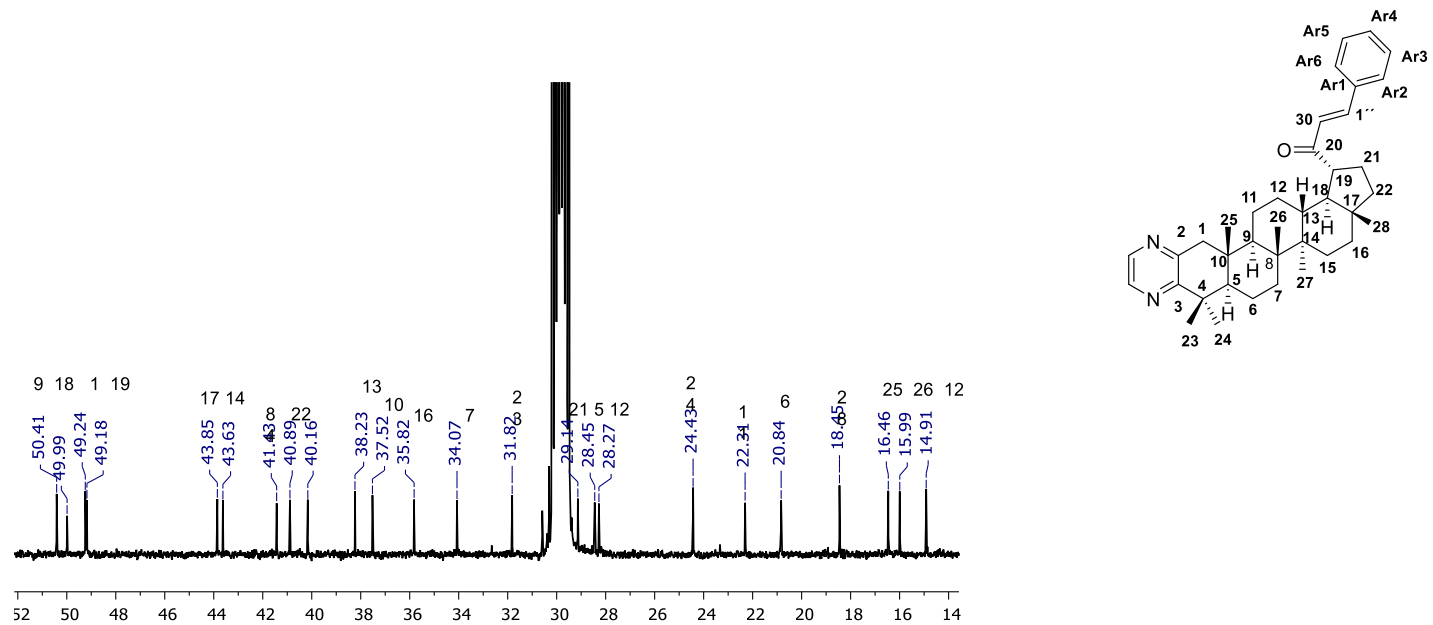
Espectro 28. RMN ^1H (700 MHz, CDCl_3) de [2,3-*b*]-pirazina de 29-nor-20-oxolupeol (**61**)



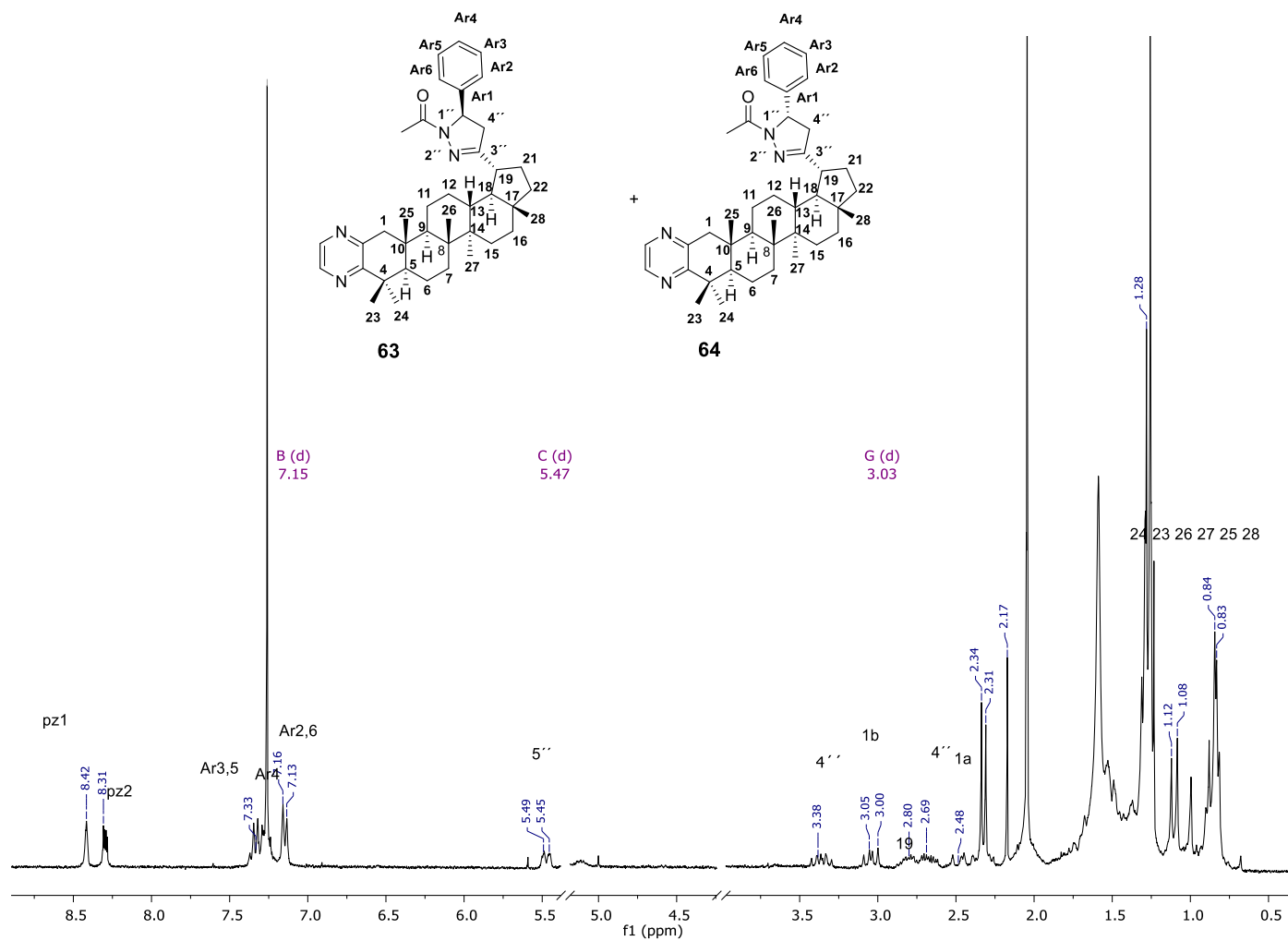
Espectro 29. RMN ^{13}C (175 MHz, CDCl_3) de [2,3-*b*]-pirazina de 29-nor-20-oxolupeol (**61**)



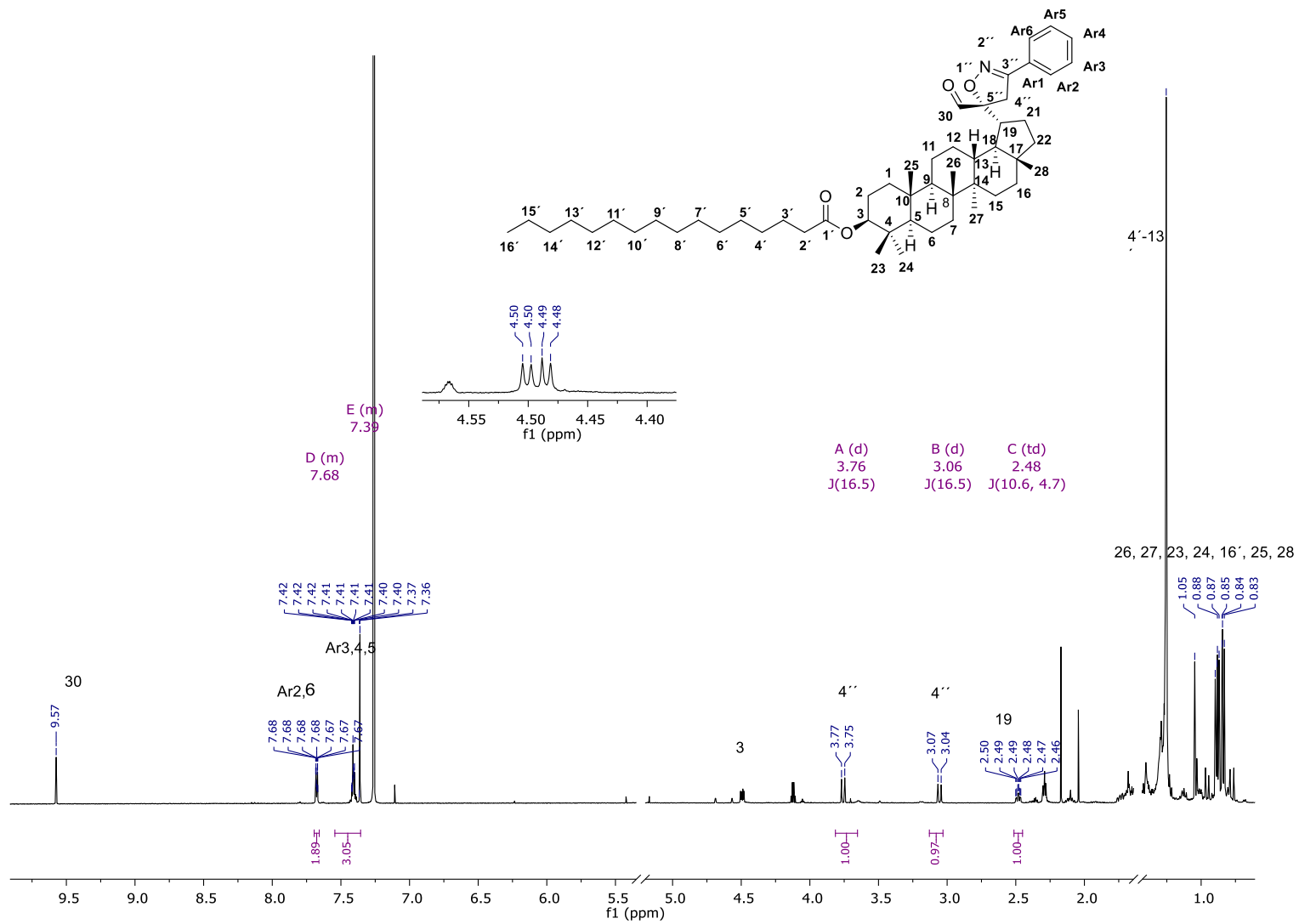
Espectro 30. RMN ^1H (700 MHz, acetona d_6) de [2,3-*b*]-pirazina de 29-nor-20-bencilidenlupeol (**62**)



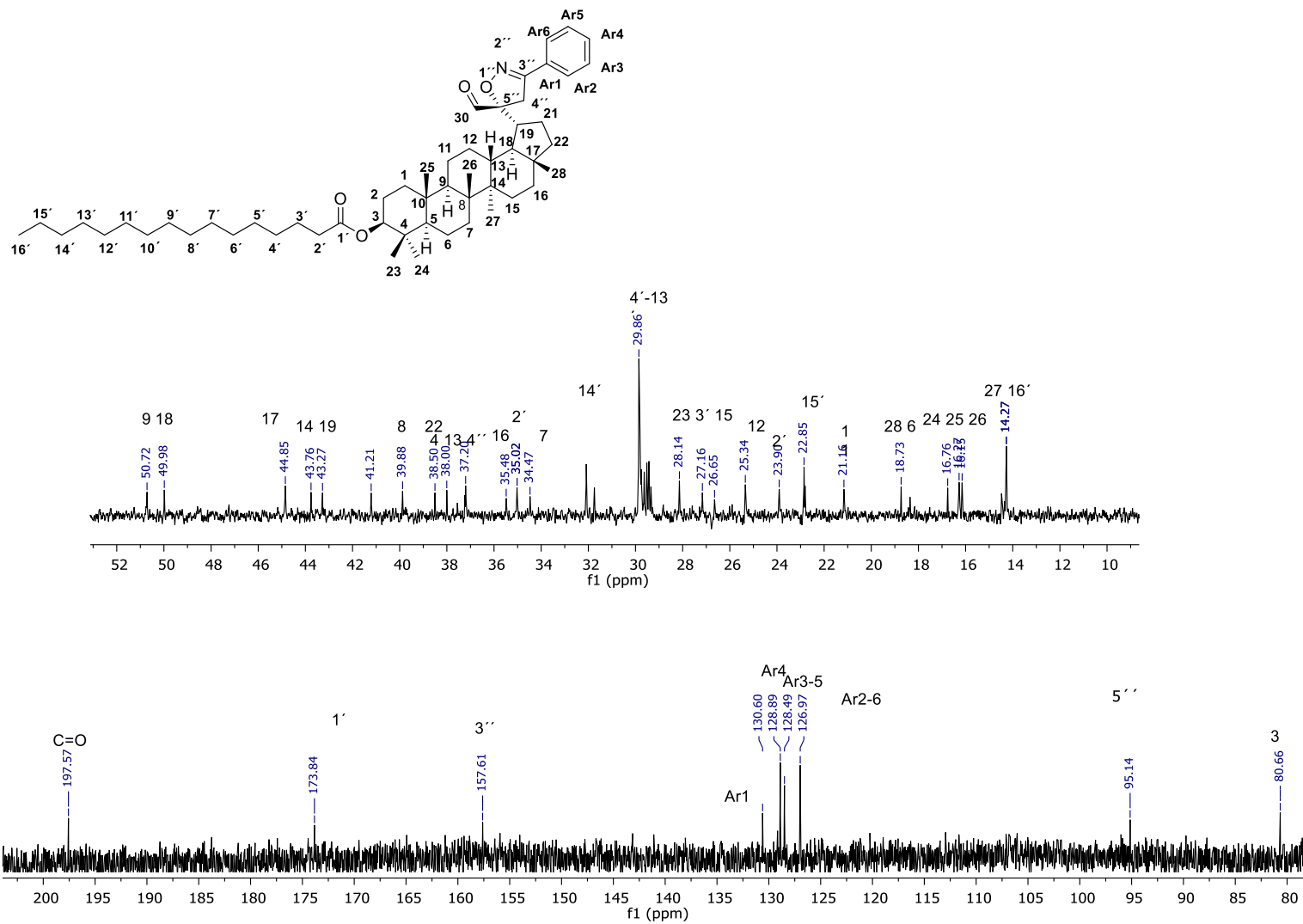
Espectro 31. RMN ^{13}C (175 MHz, acetona d_6) de [2,3-*b*] pirazina de 29-nor-20-bencilidenupeol (**62**)



Espectro 32. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) del crudo de (5''*R*)- [2,3-*b*]-pirazina de (*N*-acetil-5''-fenil)-pirazolona de lupeol (**63**) y (5''*S*)- [2,3-*b*]-pirazina de (*N*-acetil-5''-fenil)-pirazolona de lupeol (**64**)



Espectro 33. RMN ¹H (700 MHz, CDCl₃) de 19-isoxazolina derivada del 30-oxo-palmitato de lupeólo (**65**)



Espectro 34. RMN ^{13}C (175 MHz, CDCl₃) de 19-isoxazolina derivada del 30-oxo-palmitato de lupeolo (65)



Hopane-type triterpenes from *Cnidoscopus spinosus* and their bioactivities

Fabiola A. López-Huerta^a, Antonio Nieto-Camacho^a, Félix Morales-Flores^a,
Simón Hernández-Ortega^a, María Isabel Chávez^a, Carlos A. Méndez Cuesta^b, Ignacio Martínez^c,
Bertha Espinoza^c, Francisco J. Espinosa-García^d, Guillermo Delgado^{a,*}

^a Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, Ciudad de México, Mexico

^b Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Ciudad de México 04960, Mexico

^c Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán 04510, Ciudad de México, Mexico

^d Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, Universidad Nacional Autónoma de México, Ex Hacienda de San José de la Huerta 58190, Morelia, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Cnidoscopus spinosus
Triterpenes
Hopanes
Anti-inflammation
3 β -acetoxy-hop-22(29)-ene

ABSTRACT

Chemical investigation of the aerial parts of *Cnidoscopus spinosus* resulted in the isolation of relatively infrequent hopane-type triterpenes, 3 β -acetoxy-hop-22(29)-ene (**1**), first reported here as natural product, together with 3-oxo-hop-22(29)-ene (**2**), and 3 β -hydroxy-hop-22(29)-ene (**3**). β -Amyrin palmitate and three phytosterols were also characterized. The structures of the compounds were established using spectroscopic methods, and those of **1** and **2** were confirmed by crystallographic analysis. Selected biological activities for the isolated hopane-type triterpenes were tested through a series of assays for determining the cytotoxic, anti-inflammatory, α -glucosidase inhibition and antiparasitic activities. Compounds **1**–**3** did not show cytotoxic activity, compound **1** displayed an important inhibitory effect in the mouse ear induced inflammation assay, and significantly inhibited the yeast α -glucosidase activity in vitro and in silico. Additionally, compounds **2** and **3** showed marginal activities against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*. Therefore, the bioactivities of hopane-type triterpenes deserve further investigation, particularly their anti-inflammatory properties.

1. Introduction

The genus *Cnidoscopus* belongs to the Euphorbiaceae family and is endemic to the American continent. Plants of this genus are herbs, shrubs or small trees characterized by the presence of urticating trichomes throughout the plant [1]. The Plant List data base includes ca. 90 accepted names for *Cnidoscopus* species [2], and a significant number of these are endemic of Mexico, distributed in tropical and subtropical regions, mainly in low deciduous forest and xerophilous scrub [3,4]. Preparations using the aerial parts of some species such as *C. aconitifolius* [5,6], *C. chayamansa* [7–9], *C. quercifolius* [10] and *C. multilobus* [11] have been reported in traditional medicine for the treatment of diabetes, flu, anti-inflammatory related diseases, stomach infections, and rheumatism [12]. Previous chemical investigations on this genus established the presence of flavonoids [13], triterpenes [14], diterpenes [15], coumarins [16] and steroids [5]. *C. spinosus* [17] is an endemic species to Mexico and is mainly found in the Pacific coast in the states of Nayarit, Jalisco, Colima and Guerrero [18,19]. This plant is abundant in places with strong environmental disturbance [20], and up to date, there is no record of its use in traditional medicine. Aiming to expand

the chemical and biological knowledge of this genus and considering that only the presence of flavonoids has been reported from *C. spinosus* [17], the aerial parts of this plant were investigated. Herein, we report the isolation and structural determination of four pentacyclic triterpenes, including one new hopane (whose skeleton is not frequent in plants), and three phytosterols. Cytotoxic, anti-inflammatory, inhibitory activity toward α -glucosidase (from yeast and rat), and anti-parasitic (against strains of *Trypanosoma cruzi*, *T. rangeli* and *Leishmania mexicana*) properties of the isolated hopanes have been evaluated.

2. Materials and methods

2.1. General experimental procedures

Melting points were determined on a Fisher Johns apparatus and are uncorrected. Optical rotations were measured using a Perkin Elmer 343 polarimeter (hexane, *c* in g/100 mL). UV spectra were taken on a Shimadzu UV–visible recording spectrophotometer. IR spectra were recorded on a FT-IR Bruker Tensor 750. NMR spectra were recorded in either a Bruker Avance III or a Bruker Ascend 700 spectrometer, using

* Corresponding author.

E-mail address: delgado@unam.mx (G. Delgado).

CDCl_3 (Sigma Aldrich) solvent signal as internal reference. Mass spectra were recorded on a Jeol JMS-T100LC spectrometer. Analytical TLC was carried out on silica gel 60 F₂₅₄ aluminium foils (Merck). Column chromatography (CC) was performed using silica gel 230–400 (Merck). All solvents were dried and distilled before use.

2.2. Plant collection and extract preparation

Aerial parts (leaves) of *C. spinosus* Lundell were collected in the biosphere reserve Chamela-Cuixmala, Jalisco, in August 2013 and identified by Dra. Graciela García Guzmán. A voucher specimen (LAPJ1778) is deposited at the National Herbarium of Mexico (MEXU), Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

2.3. Chemical fractionation and isolation of pure compounds

The air-dried plant material of *C. spinosus* (3.5 kg) was powdered and extracted 3 times at room temperature by maceration with a 1:1 mixture of $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$. After removing the solvent in vacuo, a residue (400 g) was obtained, which was chromatographed on a silica gel column with a gradient solvent system of *n*-hexane-EtOAc. The fractions (250 mL each) were monitored by TLC and pooled into twenty-eight main fractions: F1 (100:00), F2 (95:05), F3 (90:10), F4 (85:15), F5 (80:20), F6 (75:25), F7 (70:30), F8 (65:35), F9 (60:40), F10 (55:45), F11 (50:50), F12 (45:55), F13 (40:60), F14 (35:65), F15 (30:70), F16 (25:75), F17 (20:80), F18 (15:85), F19 (10:90), F20 (05:95), F21-F28 (0:100). The fractions F6-F10 were joint and submitted to column chromatography (*n*-hexane-EtOAc gradient) to afford 3 β -acetoxy-hop-22(29)-ene (1) (685.8 mg), 3-oxo-hop-22(29)-ene (2) (200 mg), 3 β -hydroxy-hop-22(29)-ene (3) (107.7 mg), and β -amyirin palmitate (80 mg). Fraction F14 afforded β -sitosterol (130 mg) and stigmaterol. From fraction F27 was isolated β -sitosteryl-3-*O*- β -D-glucopyranoside (400 mg).

3 β -acetoxy-hop-22(29)-ene (1): $[\alpha]_D^{25} + 0.07$ (c 0.1, hexane); UV (hexane) λ_{max} (log ϵ) 205.5 (1.73) nm; IR (CHCl_3) ν_{max} cm^{-1} : 2950, 2871, 1720, 1466, 1391, 1246, 1028, 978, 920, 852. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 ; δ in ppm, J in Hz): 4.78 (brs, 2H, H-29), 4.47 (dd, $J = 10.5, 6.0$, 1H, H-3), 2.68 (ddd, $J = 9.5, 9.5, 7.0$, 1H, H-21), 2.04 (s, 3H, H-2'), 1.84 (m, 1H, H-20a), 1.80 (m, 1H, H-20b), 1.75 (s, 3H, H-30), 1.69 (m, 1H, H-1a), 1.65 (m, 1H, H-16a), 1.62 (m, 2H, H-2), 1.60 (m, 2H, H-19a), 1.52 (m, 1H, H-6a), 1.50 (m, 1H, H-11a), 1.48 (m, 1H, H-12a), 1.47 (m, 1H, H-7a), 1.42 (m, 1H, H-12b), 1.41 (m, 1H, H-16a), 1.40 (m, 1H, H-6b), 1.40 (m, 1H, H-15a), 1.38 (m, 1H, H-17), 1.37 (m, 1H, H-13), 1.32 (m, 1H, H-11b), 1.24 (m, 1H, H-9), 1.23 (m, 1H, H-7b), 1.23 (m, 1H, H-15b), 1.03 (m, 1H, H-1b), 1.02 (m, 2H, H-19b), 0.96 (s, 3H, H-26), 0.93 (s, 3H, H-27), 0.85 (s, 3H, H-23), 0.84 (s, 3H, H-25), 0.83 (s, 3H, H-24), 0.79 (ddd, $J = 12.0, 12.0, 2.0$, 1H, H-5), 0.72 (s, 3H, H-28). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 171.0 (C, C-1'), 148.8 (C, C-22), 110.3 (CH₂, C-29), 81.1 (CH, C-3), 55.3 (CH, C-5), 55.0 (CH, C-17), 50.2 (CH, C-9), 49.6 (CH, C-13), 46.6 (CH, C-21), 44.9 (C, C-18), 42.1 (C, C-14), 42.2 (CH₂, C-19), 37.9 (C, C-4), 38.5 (CH₂, C-1), 37.2 (C, C-10), 33.8 (CH₂, C-15), 33.4 (CH₂, C-7), 28.1 (CH₃, C-23), 27.5 (CH₂, C-20), 25.1 (CH₃, C-30), 24.0 (CH₂, C-12), 23.9 (CH₂, C-2), 21.8 (CH₃, C-16), 21.5 (CH₃, C-2'), 21.2 (CH₂, C-11), 18.4 (CH₂, C-6), 16.7 (CH₃, C-24), 16.83 (CH₃, C-26), 16.80 (CH₃, C-27), 16.2 (CH₃, C-25), 16.1 (CH₃, C-28); HRESIMS m/z 469.4040 (calcd for C₃₂H₅₃O₂, 469.4046).

Crystal data for 1: C₃₂H₅₂O₂, monoclinic, space group C2, $a = 13.084$ (4) Å, $b = 7.7797$ (18) Å, $c = 15.5894$ (10) Å, $\alpha = \gamma = 90.00^\circ$, $\beta = 97.557(12)^\circ$; $V = 2724.6$ (14) Å³, $T = 150$ (2) K, $Z = 4$, $D_{\text{calcd}} = 1.143$ Mg/m³, $F(000) = 1040$ A total of 3066 reflections were collected within the range $2.744 \leq \theta \leq 68.323$, in which 13,899 reflections were observed [$I > 2\sigma(I)$]. The final $R = 0.0491$, $R_w = 0.1238$, and $S = 1.078$. Flack parameter = 0.0(2).

Crystal data for 2: C₃₂H₄₈O, monoclinic, space group P2₁, $a = 10.7651$ (4) Å, $b = 7.2610$ (3) Å, $c = 16.431$ (6) Å,

$\alpha = \gamma = 90.00^\circ$, $\beta = 105.6544$ (16)°; $V = 1245.13$ (8) Å³, $T = 298$ (2) K, $Z = 2$, $D_{\text{calcd}} = 1.133$ Mg/m³, $F(000) = 1040$ A total of 11,971 reflections were collected within the range $2.744 \leq \theta \leq 68.374$, in which 13,899 reflections were observed [$I > 2\sigma(I)$]. The final $R = 0.0893$, $R_w = 0.1737$, and $S = 1.059$. Flack parameter = 0.1(6).

Parameters in the Crystallographic Information File (CIF) format of compounds 1 and 2 were deposited at the Cambridge Crystallographic Data Centre [CCDC1851812 (1), and CCDC 1851811 (2)] (details in [supplementary data](#)).

2.4. Cytotoxic assay

Compounds 1–3 were screened in vitro against six human cancer cell lines including HCT-15 (colon), K562 (leukemia), U251 (glioblastoma), MCF (breast), PC-3 (prostate) and SKLU-1 (lung) which were supplied by National Cancer Institute (USA). The cytotoxic activity was determined per reported methods using the protein binding dye sulforhodamine B (SRB) in microculture assay to measure cell growth, as described in the protocols established by NCI (details in [supplementary data](#)).

2.5. Animal in vivo assays

Experiments were conducted with adult male CD-1 mice (25–30 g) purchased from the Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Mexico City. They were housed at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ under a 12 h light/12 h dark cycle, with access to food and water ad libitum. The mice were acclimatized for at least three days before testing and were used only once throughout the experiments. Experiments reported in this study were performed in accordance with the Mexican Official Regulations NOM-062-ZOO-1999 and was approved by the Internal Ethic Committee (CICUAL-IQ-004-17).

2.5.1. Anti-inflammatory activity

2.5.1.1. TPA-induced ear edema. Compounds 1–3 were evaluated using the mouse ear edema model induced by 12-*O*-tetradecanoylphorbol acetate (TPA) according to the methodology described in the literature [21]. A solution of TPA (2.5 μg) in ethanol (10 μL) was applied topically to both faces (5 μL each ear) of the right ear of the mice, 10 min after solutions of the test substances in their respective solvents were applied (10 μL each face). The left ear received ethanol (10 μL) first, and 20 μL of the respective solvent subsequently. Four hours later mice were euthanized with CO₂. A 7 mm diameter plug was removed from each ear. The swelling was assessed as the difference in weight between the left and the right ear. Control animals received the corresponding solvent in each case. Edema inhibition (EI %) was calculated by the equation

$$\text{EI \%} = 100 - (\text{B} \times 100/\text{A})$$

where A corresponds to mass (mg) of edema measured in the positive control group (TPA alone) and B corresponds to mass (mg) of edema induced by TPA plus indomethacin or hopane. Indomethacin was used as the reference compound. The compounds that showed more than 50% inhibition of ear edema were selected for testing at different doses. The dose range was 0.18, 0.32, 0.56, and 1 μmol in 20 μL of chloroform (vehicle). Indomethacin (Sigma-Aldrich) was used as the reference anti-inflammatory drug. The treatment groups included 5–8 mice, and the same test procedure was repeated. A dose-response plot was analyzed with linear regression to determine the dose that provided 50% of inhibition (ID₅₀).

2.5.1.2. Myeloperoxidase (MPO) activity. Tissue MPO activity was measured in biopsy taken from ears 4 h after TPA administration [22,23]. Each mouse ear biopsy was placed in 1 mL of 80 mM phosphate-buffered saline (PBS) pH 5.4 containing 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB). Each was

homogenized for 30 s at 4 °C with a Tissue Homogenizer (OMNI International, model 125). The homogenate was freeze-thawed at room temperature 3 times, sonicated 20 s and centrifuged at 12,000 rpm for 15 min at 4 °C. The resulting supernatants (10 µL in quadruplicate) were poured into 96 well microplate and 180 µL of 80 mM PBS (pH 5.4) without HTAB were added. Microplate was heated at 37 °C then, 20 µL of 0.017% hydrogen peroxide were added to each well. For the MPO assay, 20 µL of 18.4 mM 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine in 50% aqueous DMF were added to start the reaction. Microliter plates were incubated at 37 °C for 5 min. The reaction was stopped with 20 µL of 2 M H₂SO₄. MPO enzyme activity was assessed colorimetrically using a BioTek microplate reader Synergy HT at an absorbance wavelength of 450 nm.

2.5.1.3. Histological analysis. Histological cuts were obtained as described elsewhere [24]. Ears were fixed in 10% formaldehyde solution, dehydrated, embedded in paraffin, and sectioned. Five-µm sections were stained with hematoxylin-eosin. Infiltration of leucocytes was evaluated in selected areas (10× and 40× objective).

2.6. Inhibitory activity against α-glucosidase

2.6.1. Yeast α-Glucosidase

α-Glucosidase activity was evaluated using an adapted method [25]. A solution (25 µL) of samples in DMSO-H₂O 1:1 was added to 150 µL of phosphate buffer solution (PBS, 67 mM, pH 6.8) and incubated at 37 °C for 10 min with 25 µL of glutathione (3 mM in PBS) and 25 µL (0.2 U mL⁻¹) of α-glucosidase type I (Sigma G5003-100 UN). The substrate solution (25 µL, 23.2 µL *p*-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside Sigma N1377, in PBS) was then added and incubated with agitation for 15 min at 37 °C. Reaction mixture was stopped with 50 µL of Na₂CO₃ (1 M) and after 5 min of agitation the absorbance was determined at 405 nm. Acarbose was used as positive control. The inhibition percentage was calculated by the equation:

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{[\text{OD}_{\text{control}} - (\text{OD}_{\text{sample}} - \text{OD}_{\text{background}})]}{\text{OD}_{\text{control}}} \times 100$$

where OD_{control}, OD_{sample} and OD_{background} are defined as the absorbance of 100% enzyme activity, test sample with enzyme and test sample without enzyme, respectively. The concentration of an inhibitor required to inhibit the 50% of enzyme activity under the mentioned assay conditions is defined as IC₅₀ value. All samples were tested in triplicate.

2.6.2. Mammalian α-glucosidase

α-Glucosidase was prepared following the reported modified method [26]. Rat intestinal acetone powder (100 mg) was rehydrated with 4 mL of 67 mM ice cold phosphate buffer (pH 6.8). After homogenization for 3 min at 4 °C, the suspension was centrifuged (13,400 ref, 4 °C, 30 min) and the resulting supernatant was used for the assay. A reaction mixture containing 150 µL phosphate buffer (67 mM, pH 6.8), 25 µL of α-glucosidase and 25 µL of sample (in DMSO 50%) at different concentrations was pre-incubated for 10 min at 37 °C, and 25 µL of 23.2 mM *p*-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside were added. After 15 min incubation at 37 °C, the reaction was stopped by adding 50 µL of Na₂CO₃ (1 M). Acarbose was used as a positive control and DMSO 5% as negative control. Enzyme activity was quantified by measuring the absorbance at 405 nm in a BioTek microplate reader Synergy HT. Experiments were done in triplicates.

The percentage of enzyme inhibition was calculated by the following formula:

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{[(\text{AC} - \text{AS})/\text{AC}]}{1} \times 100$$

where AC is the absorbance of the negative control and AS is the absorbance of the tested sample.

2.6.3. Docking

Structures 1–3 were built and their geometries were optimized applying the semi-empirical method AM1. AutoDock 4.2 [27] was used for molecular docking studies calculations between compounds with *Saccharomyces cerevisiae* α-glucosidase (PDB ID: 4J5T) [28]. AutoGrid program supplied with AutoDock4 was used for the preparation of grid maps. The Lamarckian Genetic Algorithm (LGA) was chosen to search for the best conformers. During the docking process, a maximum of 10 conformers was considered for each ligand. All the docking processes were performed with the default parameters. Population size was set to 150, maximum number of evaluations 2,500,000, maximum number of generations 27,000, maximum number of top individuals that automatically survived 1, gene mutation rate 0.02 and crossover rate 0.8. The output obtained from AutoDock 4.2 was further analyzed with PyMOL software package and Discovery Studio Visualizer v16.

2.7. Antiparasitic activity

Antiparasitic activity against epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* Silvio strains (MHOM/Br/2000/Silvio), Cl Brener (MHOM/Br/1987/Cl Brener) and Queretaro (Qro) (TBAR/MX/2000/Queretaro), epimastigotes of *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania mexicana bricaire* promastigotes was determined per reported methods [29] (for details, see [supplementary data](#)).

3. Results and discussion

3.1. Phytochemical analysis

The CH₂Cl₂:MeOH extract of *C. spinosus* was subjected to repeated chromatographic procedures and led to the isolation the hopane-type triterpenes 1–3. Additional compounds were identified as β-amyrin palmitate [30], stigmasterol [31], β-sitosterol [32], and β-sitosterol-3-O-β-D-glucopyranoside [33] (Fig. 1), by comparing their spectroscopic data with those reported in the literature, and by direct comparison with authentic samples available in the laboratory. These last compounds have already been isolated from other *Cnidocolus* species such as *C. urens* [34], *C. quercifolius* [35]. All these compounds are reported herein for the first time from *C. spinosus*.

Compound 1 was obtained as a white solid, mp 208–210 °C, and its molecular formula was deduced to be C₁₅H₁₆O₅ by HRESIMS analysis. ¹H and ¹³C NMR data of 1 (Table 1) closely resembled those of 3-oxo-hop-22(29)-ene (2, named hopenone B) [36] and 3β-hydroxy-hop-22(29)-ene (3, named hopenol B) [37], also isolated in the present work, suggesting the presence of 3β-acetoxy-hop-22(29)-ene, in agreement with the molecular formula and DEPT, COSY, HMBC and HSQC experiments (Fig. 11, [supplementary data](#)). Previously, our group isolated C-21 epimers of hopanes (moretanones) from *C. multilobus* [11] and Table 1 includes the NMR data of our sample of moretenone (4) still extant from our earlier work for direct comparisons. The observed NOE between H-C-17 and H-C-21, and between H₃-C-28 and H₃-C-30 for hopane 1, is in clear contrast with the NOE between H-C-17 and H₃-C-30 and between H-C-21 and H₃-C-28 for compound 4. The ¹H and ¹³C NMR up-field shift of H₃-C-30 and H-C-17 of moretanones could be assigned to a γ-gauche effect [38] (Fig. 2). Therefore, the compound isolated from *C. spinosus* was confirmed as compound 1. Its absolute configuration was determined by X-ray crystal diffraction analysis [Flack parameter: 0.0(2)] (Fig. 3). This is the first time that compound 1 has been reported as a natural product.

Compounds 2 and 3 were identified as 3-oxo-hop-22(29)-ene and 3β-hydroxy-hop-22(29)-ene, respectively, through detailed NMR spectral analysis and comparison with the data in the literature [39]. The X-ray diffraction analysis for compound 2 was also carried out (Fig. 12, [supplementary data](#)). This is the first time that hopane-type triterpenes have been isolated from the genus *Cnidocolus*, and although compounds 2 and 3 have been previously characterized from

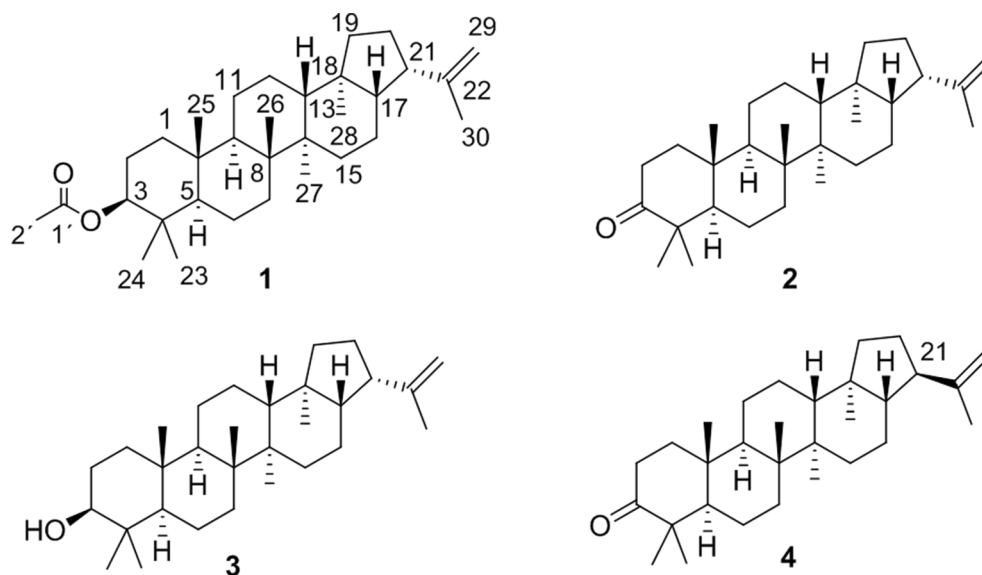


Fig. 1. Chemical structures of the main compounds isolated from *Cnidoscopus spinosus*.

Euphorbiaceae [36,37,40,41], and other plant families [42–44], they are relatively infrequent in the plant kingdom. Hopane-type triterpenes have been isolated not only from bacteria [45] and fungi [46], but also from sediments, and they are significant in geochemistry [47]. It is interesting to note that hopanes are considered the functional and structural analogs of steroids in prokaryotes [48,49] and the enzyme mechanisms for the formation of both type of compounds have been described [50]. Therefore, the hopanoid (and moretanoid) biosynthesis may be considered an ancient trait (in comparison with steroid biosynthesis) in some lineages not only of the Euphorbiaceae family, but of the plant kingdom.

3.2. Cytotoxic activity

The compounds 1–3 were tested *in vitro* as anti-proliferative agents in six human tumor cell lines, including HCT-15 (colon), K562 (leukemia), U251 (glioblastoma), MCF-7 (breast), PC-3 (prostate) and SKLU-1 (lung). None of the compounds displayed cytotoxicity against the tested cell lines. These results were consistent with those of a previous study in which hopenol B (3) was not toxic against some human cancer cell lines [41].

3.3. Acute topical inflammation

The anti-inflammatory activities of compounds 1–3 were evaluated (0.31 $\mu\text{mol}/\text{ear}$) in a mouse ear edema model induced by TPA. Compound 1 decreased 57.27% the inflammation and was the most active compound (Table 2), showing a dose-dependent activity with ID_{50} 0.36 $\mu\text{mol}/\text{ear}$, while that of the reference compound (indomethacin) was 0.24 $\mu\text{mol}/\text{ear}$ (Table 3). In the same model of inflammation, at a concentration twelve times lower, compound 1 exhibited almost the same anti-inflammatory effect as its corresponding 21-epimer (moretenyl acetate) [8]. This observation suggests that the spatial orientation of the isopropenyl group at C-21 in the pentacyclic triterpenes is an important feature for their anti-inflammatory activity.

Fig. 4 shows the microscopic analysis of sections of mouse ears stained with hematoxylin-eosin. Section A shows the basal state in the epidermis, a single cell line observed in the germinative stratum, with the connective tissue of the dermis being compact and with few neutrophils. Section B shows the edema (after administration of TPA), the increase of ear thickness, and the cell infiltration; the germinative stratum is no longer a monolayer of cells, the structure of the dermis is appreciated with spaces filled with tissue fluid and an abundant

quantity of infiltrated neutrophils can be observed. Section C shows the ear after treatment with hopane 1, reducing the effects of TPA: the germinative stratum is restored, with the structure of a normal monolayer, the amount of neutrophils is significantly lower, and the dermis has almost completely recovered its normal histology.

Because compound 1 reduced the cell infiltration (Fig. 4C), we examined the myeloperoxidase (MPO) enzymatic activity as a specific marker for migration and cellular infiltration. We particularly focused on neutrophils because of their increased activity and production in many inflammatory processes [51]. We observed that MPO activity was inhibited by triterpene 1 in a dose-dependent manner, with IC_{50} of 0.23 $\mu\text{mol}/\text{ear}$ (Table 5, supplementary data).

3.4. Inhibitory activity against α -glucosidase

Pentacyclic triterpenes have been reported to exhibit anti-diabetic activity [52–54], however, few studies have demonstrated the mechanism of action of these compounds in specific targets involved in glucose homeostasis. In a previous work, the effects of hopenol B (3) on insulin and glucagon-like peptide 1 (GLP-1) were investigated. This compound diminished glycemia, stimulated GLP-1 secretion, potentiated insulin secretion, increased hepatic glycogen content, and modulated intracellular calcium in pancreatic islets [55]. The inhibitory activity of the enzyme α -glucosidase is another molecular target established for the evaluation of compounds for diabetes therapy [56]. We evaluated yeast (type 1 *Saccharomyces cerevisiae*) and mammalian (type 2) α -glucosidases to determine the inhibitory activity of the isolated hopanes because the substrate specificity of α -glucosidase differs depending on its source, and because α -glucosidase inhibitors show variable activities depending on the enzyme [57]. In the case of yeast α -glucosidase, it has been frequently used as model to identify its inhibitors [58], however, α -glucosidase activity from rat intestine closely mimics the mammalian system, therefore, we have used both of these test systems [59]. The effects of the triterpenes 1–3 were screened *in vitro* for yeast α -glucosidase inhibition at concentrations 1, 10, 100 μM . In the preliminary screening, compound 1 at 10 and 100 μM caused 83.5 and 98.79% inhibition of the enzyme activity, respectively (Table 6, supplementary data). The triterpene 1 showed a high inhibitory activity with IC_{50} of $5.74 \pm 0.49 \mu\text{M}$ in comparison with the positive control acarbose ($7.26 \pm 0.34 \text{ mM}$) (Table 4). However, the activity of the compounds isolated in this study was significantly lower in the mammalian α -glucosidase test, indicating that the substrates have higher interaction with type 1 enzymes.

Table 1
 ^1H and ^{13}C NMR data of compounds **1** and **4** (CDCl_3 , δ in ppm).

Position	1 ^a		4 ^b	
C/H	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)
1a,1b	38.5, CH ₂	1.69, m 1.03, m	39.7, CH ₂	1.93, m 1.42, m
2a, b	23.9, CH ₂	1.62, m	34.3, CH ₂	2.40, ddd (15.5, 7.5, 4.0)
3	81.1, CH	4.47, dd (10.5, 6.0)	218.3, CH	
4	37.9, C		47.5, C	
5	55.3, CH	0.79, ddd (12.0,12.0,2.0)	55.0, CH	1.31, m
6a	18.4, CH ₂	1.52, m	19.9, CH ₂	1.50, m
6b		1.40, m		1.46, m
7a	33.4, CH ₂	1.47, m	32.8, CH ₂	1.51, m
7b		1.23, m		1.30, m
8	41.9, C		41.8, C	
9	50.2, CH	1.24, m	49.9 CH	1.34, m
10	37.2, C		37.0, C	
11a	21.2, CH ₂	1.50, m	21.8, CH ₂	1.53, m
11b		1.32, m		1.39, m
12a	24.0, CH ₂	1.48, m	24.1, CH ₂	1.51, m
12b		1.42, m		1.44, m
13	49.6, CH	1.37, m	49.0, CH	1.45, m
14	42.1, C		42.5, C	
15a	33.8, CH ₂	1.40, m	32.8, CH ₂	1.43, m
15b		1.23, m		1.25, m
16a	21.8, CH ₂	1.65, m	21.0, CH ₂	1.42, m
16b		1.41, m		1.19, m
17	55.0, CH	1.38, m	54.0, CH	1.01, m
18	44.9, C		44.4, C	
19a	42.2, CH ₂	1.60, m	40.4, CH ₂	1.51, m
19b		1.02, m		1.05, m
20a	27.5, CH ₂	1.84, m	27.5, CH ₂	1.85, m
20b		1.80, m		1.43, m
21	46.6, CH	2.68, ddd (9.5, 9.5, 7.0)	48.0, CH	2.25, ddd (12.5, 11.0,7.0)
22	148.8, C		148.3, C	
23	28.1, CH ₃	0.85 s	26.7, CH ₃	1.08, s
24	16.7, CH ₃	0.83 s	21.3, CH ₃	1.03, s
25	16.2, CH ₃	0.84 s	15.9, CH ₃	0.93, s
26	16.83, CH ₃	0.96 s	16.6, CH ₃	1.02, s
27	16.80, CH ₃	0.93 s	16.7, CH ₃	0.95, s
28	16.1, CH ₃	0.72 s	15.3, CH ₃	0.69, s
29a	110.3, CH ₂	4.78 brs	109.7, CH ₂	4.69, d (15.6)
29b				
30	25.1, CH ₃	1.75 s	19.8, CH ₃	1.68, s
C1	171.0, C			
C2	21.5, CH ₃	2.04 s		

^a Recorded at 400 MHz (^1H) and 100 MHz (^{13}C).

^b Recorded at 700 MHz (^1H) and 175 MHz (^{13}C). “m” means multiplet or overlapped with other signals.

To explore the binding mode of the isolated compounds (**1–3**) and to support the experimental results, a molecular docking study was performed using the validated docking protocols with α -glucosidase from *Saccharomyces cerevisiae* (PDB 4J5T), using Autodock 4.2. We observed that all the compounds bound near the amino acids that make up the catalytic site (Glu-771 and Asp-568); however, they displayed

different modes of binding. In the case of compound **1**, we observed the formation of hydrogen bonds between the acetyl group and the amino group of the Arg-428 residue, located in another nearby cavity (Fig. 5), allowing the rest of the compound **1** to occupy the cavity of the catalytic site, thus blocking its activity. Compound **2** adopted a similar conformation to **1**, however, despite having greater binding energy, compound **2** did not form hydrogen bonds with any other residue. It displayed only Van der Waals interactions, which do not allow it to remain fixed in the cavity of the active site; so, the inhibitor could be expelled more easily than compound **1**. Therefore, it acts as a poorer inhibitor (Fig. 15, supplementary data). Compound **3** was also able to occupy the cavity of the catalytic site, however, this compound formed a hydrogen bridge between the hydroxyl group and the Glu-707 residue, which located farther away from the main active site and from site B. It is possible that the rest of the molecule can exhibit greater mobility and can move away faster from these sites, thus accounting for its lack of activity (Fig. 16, supplementary data).

3.5. Antiparasitic activity

In a previous work, three hopane triterpenoids, hopan-22-ol, hopan-16 β ,22-diol and hopan-6 α ,7 β ,22-triol, were evaluated against *T. cruzi*, displaying weak trypanocidal activity [60]. Compounds **1**, **2** and **3** were tested at a concentration of 50 μM against *T. cruzi* Queretaro strain and against Vero cells at 24 h. Compound **1** was not efficient in reducing the viability of either the parasite or the Vero cells, and so it was not considered for additional evaluation. Compounds **2** and **3** reduced the viability of *T. cruzi* by more than 20% at the concentration of 50 μM without affecting the viability of Vero cells. Thus, we decided to try different concentrations of compounds **2** and **3** at 24 and 48 h. At 24 h, compound **2** reduced the viability of the Queretaro strain of *T. cruzi* by more than 20% at all concentrations tested and had a moderate effect on *T. rangeli* and *L. mexicana*. None of the concentrations had an effect on Cl-Brener and Silvio strains. Interestingly, compound **2** did not display activity against Vero cells, even at the highest concentrations. Compound **3** could only be evaluated at a concentration of 50 μM , due to precipitation in the culture medium at higher concentrations, displaying a similar effect to that of compound **1**. At 48 h, we observed that compound **2** lost the trypanocidal effect, being effective only at the highest concentration, against Cl-Brener and Silvio. The rest of the trypanosomatids were not affected. Unfortunately, at 48 h compound **2** already begins to be cytotoxic for Vero cells. On the other hand, compound **3** did not affect the mammalian cells, but neither did it affect the viability of *T. cruzi* at this time (Fig. 17 and Fig. 18, supplementary data).

4. Conclusions

This study has established that the CH_2Cl_2 :MeOH extract of *C. spinosus* contains three hopane-type triterpenes, the new compound 3 β -acetoxy-hop-22(29)-ene (**1**), 3-oxo-hop-22(29)-ene (**2**), and 3 β -hydroxy-hop-22(29)-ene (**3**) as characteristic secondary metabolites. Hopane type triterpenes, here reported for the first time from a

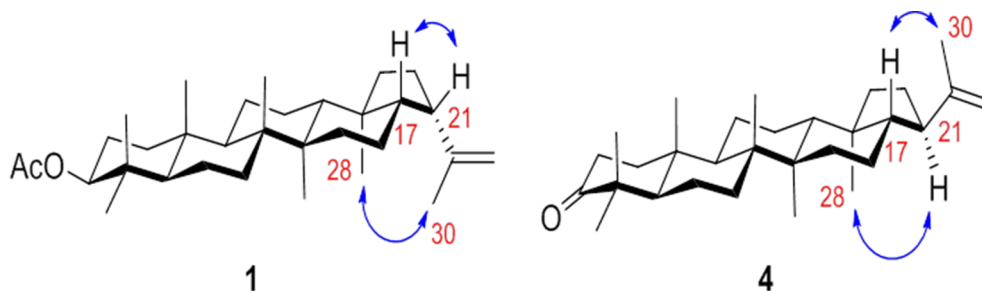


Fig. 2. Key NOESY correlations of compounds **1** and **4**.

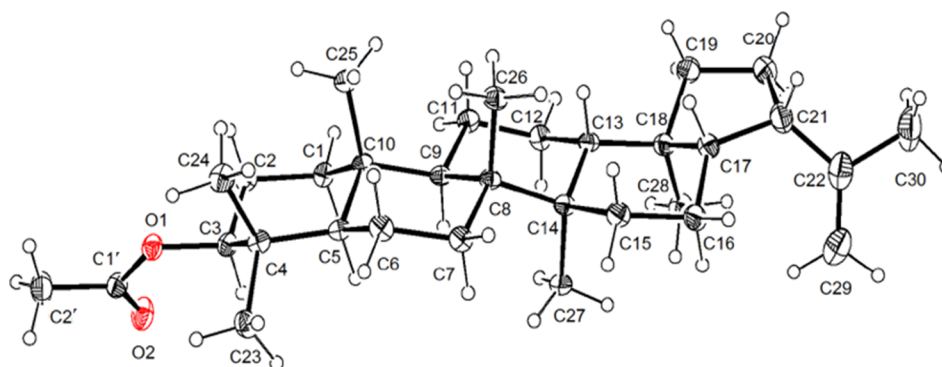


Fig. 3. ORTEP drawing of hopane 1 with atom labeling.

Table 2
Effect of compounds 1–3 on TPA induced mouse ear edema.

Sample	Dose ($\mu\text{mol}/\text{ear}$)	Edema (mg)	Inhibition (%)
Control (CHCl_3)		14.67 \pm 0.80	
1	0.31	6.27 \pm 2.49*	57.27 \pm .16.99*
2	0.31	12.10 \pm 0.60	17.50 \pm .4.11
3	0.31	10.70 \pm 1.08	27.05 \pm .7.38
Indomethacin	0.31	5.62 \pm 0.89**	61.90 \pm .6.00**

Each value represents the mean of three animals \pm standard error; the statistical analysis was done by Dunnett test. P values $p \leq 0.05$ (*) and $p \leq 0.01$ (***) were considered statistically significant.

Table 3
Curve doses-response of 1 on TPA induced mouse ear edema.

Sample	Dose ($\mu\text{mol}/\text{ear}$)	Edema (mg)	Inhibition (%)	ID ₅₀ ($\mu\text{mol}/\text{ear}$)
Control (CHCl_3)		15.15 \pm 0.59		
1	0.18	11.92 \pm 0.16*	21.34 \pm 1.03*	0.36
	0.32	7.85 \pm 0.67**	48.18 \pm .4.41**	($r^2 = 0.98$)
	0.56	4.68 \pm 1.24**	69.09 \pm .8.22**	
	1	2.38 \pm 0.85**	84.27 \pm .5.63**	

Each value represents the mean of six animals \pm standard error; the statistical analysis was done by Dunnett test. P values $p \leq 0.05$ (*) and $p \leq 0.01$ (***) were considered statistically significant.

Cnidioscolus species, are relatively rare in plants, but widely distributed in prokaryotes. The 21-*epi*-hopanes (moretanones) have been previously reported from *C. multilobus* [11] and *C. chayamansa* [8]. The biosynthesis of hopanes and moretanones might be considered a primitive feature for some families in the plant kingdom. Compounds 1–3 did not display cytotoxic activity against a panel of human tumor cell lines, but compound 1 exhibited significant anti-inflammatory activity compared

Table 4
Yeast α -glucosidase inhibitory activity of 1.

Sample	Dose ($\mu\text{mol}/\text{ear}$)	O.D. 405 nm	Inhibition (%)	IC ₅₀ (μM)
1	0	2.02 \pm 0.26	0	5.74 \pm 0.49
	1	1.90 \pm 0.237	4.86 \pm 1.79*	
	1.78	1.85 \pm 0.277	9.19 \pm 4.93	
	3.16	1.59 \pm 0.263	22.08 \pm 7.11	
	5.62	1.010 \pm 0.180*	50.64 \pm 7.23*	
	10	0.392 \pm 0.101**	81.16 \pm 6.1**	
	17.78	0.096 \pm 0.031**	95.31 \pm 0.23**	
	31.62	0.036 \pm 0.029**	97.73 \pm 3.24**	

The values represented the mean of three independent experiments \pm standard error the media. The data were subjected to an ANOVA analysis of variance followed by a Dunnett test to isolate groups with significant differences. The values of $p \leq 0.05$ (*) and $p \leq 0.01$ (***) were considered significant with respect to the control (concentration 0).

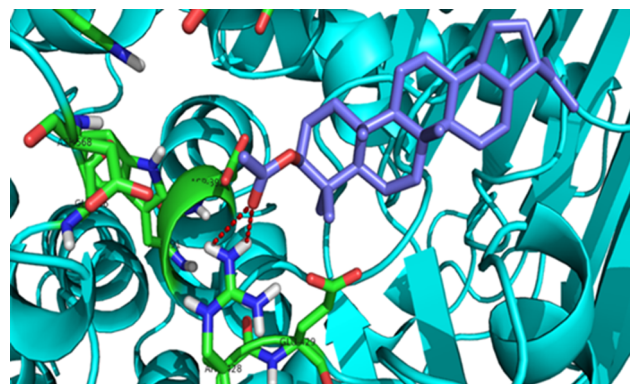


Fig. 5. Molecular docking of compound 1 with yeast α -glucosidase.

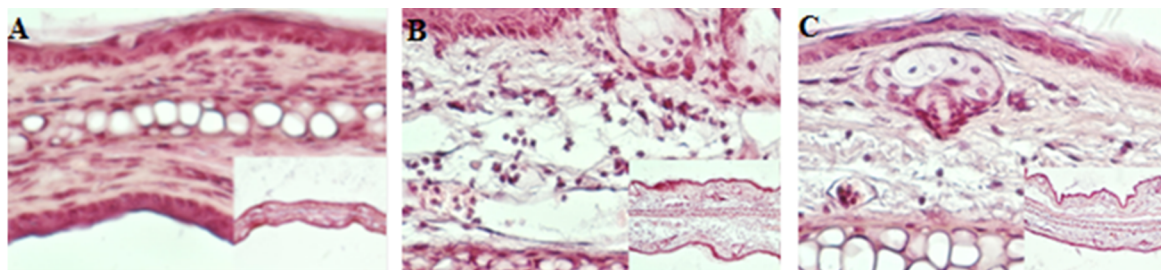


Fig. 4. Analysis of histological sections from mice ears stained with hematoxylin-eosin (400 \times and inserts at 100 \times magnifications), after application of TPA and compound 1 at dose of 0.31 $\mu\text{mol}/\text{ear}$. (A) Basal, (B) TPA, (C) TPA plus treatment with compound 1.

with indomethacin, and was a more potent inhibitor than the reference compound acarbose in the α -glucosidase (yeast) assay. Additionally, compounds 2 and 3 showed a moderate effect on the viability of the Queretaro strain of *T. cruzi* and *L. mexicana*. From the structure activity relationship perspective, among the samples tested for anti-inflammatory activity and the inhibition of α -glucosidase, we concluded that the presence of the acetoxy group at the C-3 β position in the hopane skeleton is essential for bioactivity. The results suggested that hopane-type triterpenes are worth being further researched, particularly for their anti-inflammatory activity.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

The authors thank Universidad Nacional Autónoma de México (Dirección General de Asuntos del Personal Académico, PAPIIT IG200318), Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas (UNAM), and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Scholarship 307784 awarded to F. A. L. H.) for financial support. The authors also acknowledge Sandra Daniela Rodríguez Montañón (Unidad de Histología, Instituto de Fisiología Celular, UNAM), María Teresa Ramírez-Apan (Instituto de Química, UNAM), Graciela García Guzmán (Instituto de Ecología, UNAM) for technical assistance, and Beatriz Quiroz and Nuria Esturau (LURMN-IQ-UNAM, funded by CONACYT, Grant No. 0224747).

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103919>.

References

- R. McVaugh, The genus *Cnidoscopus*: generic limits and intrageneric groups, *Bull. Torrey Bot. Club.* 71 (1944) 457–474.
- The plant list. <http://www.theplantlist.org/>, 2019 (accessed 10 February 2019).
- M. Martínez-Gordillo, J. Ramírez-Jiménez, R. Cruz-Durán, E. Arriaga, R. García, A. Cervantes, R. Hernández, Los géneros de la familia Euphorbiaceae en México, *An. Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. Méx.* 73 (2002) 155–281.
- V.W. Steinmann, Diversidad y endemismo de la familia Euphorbiaceae en México, *Acta Bot. Mex.* 61 (2002) 61–93.
- O.A. Awoyinka, I.O. Balogun, A.A. Ogunnowo, Phytochemical screening and *in vitro* bioactivity of *Cnidoscopus aconitifolius* (Euphorbiaceae), *J. Med. Plants Res.* 1 (2007) 63–65.
- A.A. Oyagbemi, A.A. Odetola, Hepatoprotective and nephroprotective effects of *Cnidoscopus aconitifolius* in protein energy malnutrition induced liver and kidney damage, *Pharmacognosy Res.* 5 (2013) 260, <https://doi.org/10.4103/0974-8490.118817>.
- R.V. García-Rodríguez, G.A. Gutiérrez-Rebolledo, E. Méndez-Bolaina, A. Sánchez-Medina, O. Maldonado-Saavedra, M.Á. Domínguez-Ortiz, M. Vázquez-Hernández, O.D. Muñoz-Muñoz, J.S. Cruz-Sánchez, *Cnidoscopus chayamansa* Mc Vaugh, an important antioxidant, anti-inflammatory and cardioprotective plant used in Mexico, *J. Ethnopharmacol.* 151 (2014) 937–943, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.12.004>.
- M.Z. Pérez-González, G.A. Gutiérrez-Rebolledo, L. Yépez-Mulia, I.S. Rojas-Tomé, J. Luna-Herrera, M.A. Jiménez-Arellanes, Antiprotozoal, antimycobacterial, and anti-inflammatory evaluation of *Cnidoscopus chayamansa* (Mc Vaugh) extract and the isolated compounds, *Biomed. Pharmacother.* 89 (2017) 89–97, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.02.021>.
- L. Miranda-Velasquez, A. Oranday-Cardenas, H. Lozano-Garza, C. Rivas-Morales, G. Chamorro-Cevallos, D.E. Cruz-Vega, Hypocholesterolemic Activity from the Leaf Extracts of *Cnidoscopus chayamansa*, *Plant Foods Hum. Nutr.* 65 (2010) 392–395, <https://doi.org/10.1007/s11130-010-0202-4>.
- L.M. De Araujo Gomes, T.M. Dantas de Andrade, J. Cabral, Ju. Tolentino de Lima, J. Quintans-JUNIOR, R.G. Da Silva Almedida, Phytochemical screening and anti-inflammatory activity of *Cnidoscopus quercifolius* (Euphorbiaceae) in mice, *Pharmacognosy Res.* 6 (2014) 345, <https://doi.org/10.4103/0974-8490.138290>.
- G. Delgado, J. Hernández, M.Y. Ríos, M.I. Aguilar, Pentacyclic Triterpenes from *Cnidoscopus multilobus*, *Planta Med.* 60 (1994) 389–390.
- L.F.W.G. Moura, J.X. da Silva Neto, T.D.P. Lopes, S.R. Benjamin, F.C.R. Brito, F.E.A. Magalhães, E.O.P.T. Florean, D. de O.B. de Sousa, M.L.F. Guedes, Ethnobotanic, phytochemical uses and ethnopharmacological profile of genus *Cnidoscopus* spp. (Euphorbiaceae): a comprehensive overview, *Biomed. Pharmacother.* 109 (2019) 1670–1679, [doi:10.1016/j.biopha.2018.10.015](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.015).
- A.M. da Silva, G.M.P. Santiago, F.J.Q. Monte, K.M. Melo, T.L.G. Lemos, G.C.G. Militão, D.A. Ferreira, R. Braz-Filho, P.B.N. da Silva, A.C. Paula, T.G. da Silva, Chemical constituents and cytotoxic activity of *Cnidoscopus phyllacanthus*, *Rev. Virtual Química.* 8 (2016) 231–241, <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20160015>.
- R.L. Brum, N.K. Honda, S.C. Hess, A.J. Cavaleiro, F. Delle Monache, Acyl lupeols from *Cnidoscopus vitifolius*, *Phytochemistry* 49 (1998) 1127–1128, [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)00069-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00069-7).
- T.L. De Lemos, E.R. Silveira, M.F. Oliveira, R. Braz Filho, C.D. Hufford, Terpenoids from *Cnidoscopus phyllacanthus* Pax et Hoff, *J. Braz. Chem. Soc.* 2 (1991) 105–110, <https://doi.org/10.5935/0103-5053.19910023>.
- W. Yuan, S. Li, S. Ownby, Z. Zhang, P. Wang, W. Zhang, R.S. Beasley, Flavonoids, coumarins and triterpenes from the aerial parts of *Cnidoscopus texanus*, *Planta Med.* 73 (2007) 1304–1308, <https://doi.org/10.1055/s-2007-990226>.
- C.L. Lundell, The genus *Cnidoscopus* in Mexico: new species and critical notes, *Bull. Torrey Bot. Club.* 72 (1945) 319–334.
- D.A. Kolterman, G.J. Breckon, R.R. Kowal, Chemotaxonomic Studies in *Cnidoscopus* (Euphorbiaceae). II. Flavonoids of *C. aconitifolius*, *C. souzae*, and *C. spinosus*, *Syst. Bot.* 9 (1984) 22–32, <https://doi.org/10.2307/2418403>.
- O.B. Bolaños, A. Sánchez-González, J.A. De Nova Vázquez, N.P.P. Hernández, Composición y estructura arbórea y arbustiva de la vegetación de la zona costera de Bahía de Banderas, Nayarit, México, *Bot. Sci.* 94 (2016) 603–623, [doi:10.17129/botsci.461](https://doi.org/10.17129/botsci.461).
- S.H. Bullock, Componentes fenológicos del sistema de cruzamiento monoico de *Cnidoscopus spinosus* (Euphorbiaceae) en Jalisco, *Bol. La Soc. Botánica México* 42 (1982) 1–9, <https://doi.org/10.17129/botsci.1256>.
- R.P. Carlson, O.D. Lynn, J. Chang, A.J. Lewis, Modulation of mouse ear edema by cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors and other pharmacologic agents, *Agents Actions* 17 (1985) 197–204, <https://doi.org/10.1007/BF01966592>.
- P.P. Bradley, D.A. Priebe, R.D. Christensen, G. Rothstein, Measurement of cutaneous inflammation: Estimation of neutrophil content with an enzyme marker, *J. Invest. Dermatol.* 78 (1982) 206–209, <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12506462>.
- K. Suzuki, H. Ota, S. Sasagawa, T. Sakatani, T. Fujikura, Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes, *Anal. Biochem.* 132 (1983) 345–352, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(83\)90019-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(83)90019-2).
- A.L. Mescher, *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, 13th ed.*, McGraw Hill Lange, 2013.
- X.P. Ye, C.Q. Song, P. Yuan, R.G. Mao, α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activity of common constituents from traditional Chinese medicine used for diabetes mellitus, *Chin. J. Nat. Med.* 8 (2010) 349–352, [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(10\)60041-6](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(10)60041-6).
- S.H. Jo, S. Lee, H.E. Apostolidis, H.D. Jang, Y. Kwon, Comparison of antioxidant potential and rat intestinal α -glucosidase inhibitory activities of quercetin, rutin, and isoquercetin, *Int. J. Appl. Res. Nat. Prod.* 2 (2009) 52–60.
- S. Genheden, U. Ryde, A comparison of different initialization protocols to obtain statistically independent molecular dynamics simulations, *J. Comput. Chem.* 32 (2010) 187–195, <https://doi.org/10.1002/jcc.21546>.
- M.K. Barker, D.R. Rose, Specificity of processing α -glucosidase I is guided by the substrate conformation: crystallographic and *in silico* studies, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 13563–13574, <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.460436>.
- D. Pérez-Morales, K.D. Hernández, I. Martínez, L.T. Agredano-Moreno, L.F. Jiménez-García, B. Espinoza, Ultrastructural and physiological changes induced by different stress conditions on the human parasite *Trypanosoma cruzi*, *Cell Stress Chaperones.* 22 (2017) 15–27, [doi:10.1007/s12192-016-0736-y](https://doi.org/10.1007/s12192-016-0736-y).
- K.W. Wang, A new fatty acid ester of triterpenoid from *Celastrus rosthornianus* with anti-tumor activities, *Nat. Prod. Res.* 21 (2007) 669–674, <https://doi.org/10.1080/14786410701371447>.
- I. Rubinstein, L.J. Goad, A.D.H. Clague, L.J. Mulheirn, The 220 MHz NMR spectra of phytosterols, *Phytochemistry* 15 (1976) 195–200, [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89083-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89083-4).
- X. Zhang, P. Geoffroy, M. Miesch, D. Julien-David, F. Raul, D. Aoudé-Werner, E. Marchioni, Gram-scale chromatographic purification of β -sitosterol: synthesis and characterization of β -sitosterol oxides, *Steroids* 70 (2005) 886–895, <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2005.06.003>.
- G. Flamini, E. Antognoli, I. Morelli, Two flavonoids and other compounds from the aerial parts of *Centaurea bracteata* from Italy, *Phytochemistry* 57 (2001) 559–564, [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00066-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00066-8).
- J. Bhattacharyya, C.B. Barros, Triterpenoids of *Cnidoscopus urens*, *Phytochemistry* 25 (1986) 274–276, [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)94550-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)94550-3).
- K.A. Santos, O.P.A. Filho, C.M. Aguiar, M.C. Milinski, S.C. Sampaio, F. Palú, E.A. da Silva, Chemical composition, antioxidant activity and thermal analysis of oil extracted from favela (*Cnidoscopus quercifolius*) seeds, *Ind. Crops Prod.* 97 (2017) 368–373, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.12.005>.
- A.N. Starratt, Isolation of Hopenone-B from *Euphorbia cyparissias*, *Phytochemistry* 8 (1969) 1831–1832, [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)85979-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)85979-8).
- S. Matsunaga, R. Morita, Hopenol-b, a triterpene alcohol from *Euphorbia supina*, *Phytochemistry* 22 (1983) 605–606, [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(83\)83063-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(83)83063-5).
- E. Kleinpeter, P.R. Seidl, The γ - and δ -effects in ^{13}C NMR spectroscopy in terms of nuclear chemical shielding (NCS) analysis, *J. Phys. Org. Chem.* 17 (2004)

- 680–685, <https://doi.org/10.1002/poc.746>.
- [39] S. Vieira-Filho, J. Takahashi, A. Alcântara, L. Duarte, R. Silva, G. Sousa, D. Oliveira, G. Silva, New triterpenes from *Maytenus robusta*: structural elucidation based on NMR experimental data and theoretical calculations, *Molecules* 17 (2012) 13439–13456, <https://doi.org/10.3390/molecules171113439>.
- [40] J.L. Giner, C. Djerassi, A reinvestigation of biosynthesis of lanosterol in *Euphorbia lathyris*, *Phytochemistry* 39 (1995) 333–335, [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00075-I](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00075-I).
- [41] D. Pattamadilok, R. Suttisri, Seco-terpenoids and other constituents from *Elateriospermum tapos*, *J. Nat. Prod.* 71 (2008) 292–294, <https://doi.org/10.1021/np070629g>.
- [42] G.V. Awolola, H. Chenia, H. Baijmath, N.A. Koorbanally, Anti-adhesion potential of non-polar compounds and extracts from *Ficus natalensis*, *Rev. Bras. Farmacogn.* 27 (2017) 599–602, <https://doi.org/10.1016/j.bjbp.2017.07.004>.
- [43] Y.C.F. Teles, O.S. Chaves, M. de F. Agra, L.M. Batista, A.C. de Queiroz, M. V. de Araújo, M.S. Alexandre-Moreira, R. Braz-Filho, M. de F. V. de Souza, Chemical constituents from *Sidastrum paniculatum* and evaluation of their leishmanicidal activity, *Rev. Bras. Farmacogn.* 25 (2015) 363–368. doi:10.1016/j.bjbp.2015.02.002.
- [44] Y.C.F. Teles, R.A. Gomes, M. da S. Oliveira, K.L. De Lucena, J.S. Do Nascimento, M. de F. Agra, J.O. Igoli, A.I. Gray, M. de F. De Souza, Phytochemical investigation of *Wissadula eroplofolia* (L.) and evaluation of its antacterial activity, *Quim. Nov.* 37 (2014) 1491–1495. doi:10.5935/0100-4042.20140238.
- [45] B.J. Belin, N. Busset, E. Giraud, A. Molinaro, A. Silipo, Di.K. Newman, Hopanoid lipids: From membranes to plant-bacteria interactions, *Nat. Rev. Microbiol.* 16 (2018) 304–315. doi:10.1038/nrmicro.2017.173.
- [46] K. Ma, P. Zhang, Q. Tao, N.P. Keller, Y. Yang, W.B. Yin, H. Liu, Characterization and biosynthesis of a rare fungal hopane-type triterpenoid glycoside involved in the antistress property of *Aspergillus fumigatus*, *Org. Lett.* 21 (2019) 3252–3256, <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.9b00984>.
- [47] G. Ourisson, P. Albrecht, Hopanoids. 1. Geohopanoids: the most abundant natural products on earth? *Acc. Chem. Res.* 25 (1992) 398–402, <https://doi.org/10.1021/ar00021a003>.
- [48] G. Ourisson, M. Rohmer, Hopanoids. 2. Biohopanoids: a novel class of bacterial lipids, *Acc. Chem. Res.* 25 (1992) 403–408, <https://doi.org/10.1021/ar00021a004>.
- [49] M. Rohmer, P. Bouvier, G. Ourisson, Molecular evolution of biomembranes: structural equivalents and phylogenetic precursors of sterols, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 847–851, <https://doi.org/10.1073/pnas.76.2.847>.
- [50] K.U. Wendt, G.E. Schulz, E.J. Corey, D.R. Liu, Enzyme mechanisms for polycyclic triterpene formation, *Angew. Chem. Int. Ed.* 39 (2000) 2812–2833, [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20000818\)39:16<2812::AID-ANIE2812>3.0.CO;2-%23](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20000818)39:16<2812::AID-ANIE2812>3.0.CO;2-%23).
- [51] J.W. Heinecke, W. Li, H.L. Daehnke, J.A. Goldstein, Dityrosine, a Specific Marker of Oxidation, is synthesized by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide system of human neutrophils and macrophages, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 4069–4077.
- [52] A. Alqahtani, K. Hamid, A. Kam, K.H. Wong, Z. Abdelhak, V. Razmovski-Naumovski, K. Chan, K.M. Li, P.W. Groundwater, G.Q. Li, The pentacyclic triterpenoids in herbal medicines and their pharmacological activities in diabetes and diabetic complications, *Curr. Med. Chem.* 20 (2013) 908–931, <https://doi.org/10.2174/092986713805219082>.
- [53] F.S.G. Silva, P.J. Oliveira, M.F. Duarte, Oleanolic, ursolic, and betulinic acids as food supplements or pharmaceutical agents for Type 2 diabetes: promise or illusion? *J. Agric. Food Chem.* 64 (2016) 2991–3008, <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b06021>.
- [54] Y.C. Lai, C.K. Chen, S.F. Tsai, S.S. Lee, Triterpenes as α -glucosidase inhibitors from *Fagus hayatae*, *Phytochemistry* 74 (2012) 206–211, <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.09.016>.
- [55] A.J. Castro, L.H. Cazarolli, G. Carvalho, Francieli Kanumfre Da Luz, D. Altenhofen, A.R. Dos Santos, M.G. Pizzolatti, F.R.M.B. Silva, Acute effect of 3 β -hidroxihop-22(29)ene on insulin secretion is mediated by GLP-1, potassium and calcium channels for the glucose homeostasis, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 150 (2015) 112–122, <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.03.011>.
- [56] W. Hakamata, M. Kurihara, H. Okuda, T. Nishio, T. Oku, Design and screening strategies for alpha-glucosidase inhibitors based on enzymological information, *Curr. Top. Med. Chem.* 9 (2009) 3–12, <https://doi.org/10.2174/156802609787354306>.
- [57] T. Akihisa, W.C.M. Kokke, Y. Hayashi, Y. Kimura, T. Yokota, T. Tamura, Triterpene alcohol and sterols from the fern *Gleichenia japonica* SPR, *Chem. Pharm. Bull.* 41 (1993) 624–626.
- [58] B. wei Zhang, Y. Xing, C. Wen, X. xia Yu, W. long Sun, Z. long Xiu, Y. sheng Dong, Pentacyclic triterpenes as α -glucosidase and α -amylase inhibitors: Structure-activity relationships and the synergism with acarbose, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 27 (2017) 5065–5070. doi:10.1016/j.bmcl.2017.09.027.
- [59] A. Kimura, J.H. Lee, I.S. Lee, H.S. Lee, K.H. Park, S. Chiba, D. Kim, Two potent competitive inhibitors discriminating α -glucosidase family I from family II, *Carbohydr. Res.* 339 (2004) 1035–1040, <https://doi.org/10.1016/j.carres.2003.10.035>.
- [60] M.C. Fritis, C.R. Lagos, N.Q. Sobarzo, I.M. Venegas, C.S. Sánchez, H.C. Altamirano, L.E. Catalán, W.Q. Palma, Depsides and triterpenes in *Pseudocyphellaria coriifolia* (lichens) and biological activity against *Trypanosoma cruzi*, *Nat. Prod. Res.* 27 (2013) 1607–1610, <https://doi.org/10.1080/14786419.2012.740033>.