



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

TEMA DE TESIS

**NUEVOS TRITERPENOS DE *GARCIA PARVIFLORA* (EUPHORBIACEAE).
OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN CITOTÓXICA DE FRIEDELANOS
NATURALES Y SEMISINTÉTICOS**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. BLANCA MIRIAM REYES GARCÍA



TUTOR: Dr. GUILLERMO DELGADO LAMAS Instituto de Química

MÉXICO, D.F. FEBRERO 2012

JURADO

Presidente: Dr. Manuel Jiménez Estrada
Vocal: Dr. Ricardo Reyes Chilpa
Vocal: Dr. Andrés Navarrete Castro
Vocal: Dr. Jesús Martín Torres Valencia
Secretario: Dr. José Fausto Rivero Cruz

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

Sustentante:

Tutor:

M. en C. Blanca Miriam Reyes García

Dr. E. Guillermo Delgado Lamas

CONGRESOS Y ACTIVIDADES ACADÉMICAS

Los resultados obtenidos del presente trabajo se expusieron en los siguientes congresos:

Congreso	Lugar y fecha	modalidad	Trabajo
Internacional	Atenas-Grecia agosto del 2008	cartel	Cytotoxic screening of selected Euphorbiaceae species. Cytotoxic triterpenes from <i>Garcia parviflora</i>
Nacional	Puebla septiembre del 2009	ponencia	Preparación y evaluación citotóxica de derivados semisintéticos a partir de los triterpenos de <i>Garcia parviflora</i> (Euphorbiaceae).

Se participó en la actividad académica “QuimiUNAM 2009” con la ponencia “Triterpenos de *Garcia parviflora*. Evaluación citotóxica de los productos naturales y derivados semisintéticos”

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada con referencia 182179 para la realización del presente trabajo.

A la Coordinación de Estudios de Posgrado y al Posgrado en Ciencias Químicas.

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

A los miembros del Comité Tutelar: Dra. María Isabel Aguilar Laurents y Dr. Mariano Martínez Vázquez, por sus comentarios y sugerencias durante el desarrollo de la tesis.

A la Dra. M. Alejandra León Cabrera, al M en C. Arturo Cano Flores y a la Dra. Beatriz Quiroz García, por su invaluable amistad y consejos durante el desarrollo de este trabajo.

Al Biól. Esteban Manuel Martínez, por su asesoría y colaboración en la colecta e identificación del material vegetal.

A los miembros del Jurado: Dr. Manuel Jiménez Estrada, Dr. Ricardo Reyes Chilpa, Dr. Andrés Navarrete Castro, Dr. Jesús Martín Torres Valencia y Dr. José Fausto Rivero Cruz por los comentarios y correcciones de la tesis.

Al personal técnico académico del Instituto de Química.

*A mis padres Manuel Reyes y Blanca García
a mi hijo Dorian y a mi esposo Pablo
con todo mi cariño*

ÍNDICE

	Página
Abstract	12
1. Resumen	13
2. Introducción	14
3. Antecedentes	16
3.1. Generalidades de la familia Euphorbiaceae	16
3.1.1. Hábitat y diversidad	16
3.1.2. Importancia económica y biológica	16
3.1.3. Estudio químico y actividad biológica	16
3.2. Triterpenos	18
3.2.1. Generalidades	18
3.2.2. Importancia biológica	19
4. Justificación	22
5. Hipótesis	22
6. Objetivos	23
6.1. Objetivo general	23
6.2. Objetivos específicos	23
7. Discusión de resultados	24
7.1. Selección del material vegetal	24
7.2. Determinación de la actividad citotóxica de los extractos vegetales	24
7.3. Estudio químico y evaluación biológica de los metabolitos secundarios de <i>Garcia parviflora</i>	25
7.3.1. Estudio químico del extracto hexánico de <i>G. parviflora</i>	25
7.3.2. Estudio químico del extracto de acetato de etilo de <i>G. parviflora</i>	27
7.3.3. Estudio químico del extracto metanólico de <i>G. parviflora</i>	29
7.3.4. Evaluación citotóxica de los productos naturales	30
7.4. Derivatizaciones químicas a partir de 1 β -hidroxifriedelina (45)	31
7.4.1. Reducción de 1 β -hidroxifriedelina (45)	32
7.4.2. Acetilación de 1 β -hidroxifriedelina (45)	33

7.4.3.	Acetilación de 1 β ,3 β -dihidroxifriedelano (51)	33
7.4.4.	Oxidación de 1 β -hidroxifriedelina (45)	34
7.4.5.	Preparación de la 3-oxima-1 β -hidroxifriedelina (55)	34
7.4.6.	Preparation de la 3,4-lactama de 1 β -hidroxifriedelina (56)	35
7.4.7.	Oxidación de 1 β -hidroxifriedelina con AMCPB	35
7.5.	Determinación de la actividad citotóxica de los derivados	36
8.	Sección experimental	38
8.1.	Material y equipo	38
8.2.	Ensayo de citotoxicidad.	39
8.3.	Colecta del material vegetal	40
8.4.	Preparación de los extractos	40
8.5.	Material vegetal selecto	41
8.6.	Extracción y aislamiento	42
8.7.	Características físicas y espectroscópicas de los productos naturales	43
8.8.	Metodología y características físicas y espectroscópicas de los derivados	49
8.8.1.	Preparación of 1 β ,3 β -dihidroxifriedelano (51)	49
8.8.2.	Acetilación de 1 β ,3 β -dihidroxifriedelano (51)	50
8.8.3.	Preparación de 1,3-diceto-friedelano (54)	52
8.8.4.	Preparación de la oxima de 1 β -hidroxifriedelina (55)	53
8.8.5.	Preparation de la 3,4-lactama de 1 β -hidroxifriedelina (56)	53
8.8.6.	Oxidación de 1 β -hidroxifriedelina con AMCPB	54
9.	Conclusiones	59
10.	Referencias	60
11.	Anexo	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Algunos tipos estructurales de triterpenos	19
Figura 2.	Constituyentes químicos del extracto hexánico de <i>G. parviflora</i>	25
Figura 3.	Fragmento A	26
Figura 4.	Constituyentes químicos del extracto de acetato de etilo e <i>G. parviflora</i>	27
Figura 5.	Interacciones NOESY de 45	28

Figura 6. Estereovista ORTEP de 45	28
Figura 7. Contituyentes químicos del extracto metanólico de <i>G. parviflora</i>	30

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Preparación de los derivados 51-59	32
--	----

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Actividad citotóxica de los extractos orgánicos de las especies de <i>Garcia</i> y <i>Sapium</i> a 50 µg/mL	24
Tabla 2. Actividad citotóxica de los productos naturales 41-43 y 45-48 a 50 µM.	30
Tabla 3. CI ₅₀ (µM) de los productos naturales 42 y 43	31
Tabla 4. Actividad citotóxica de 51-59	36
Tabla 5. CI ₅₀ (µM) de 51 y 59	37
Tabla 6. Especies vegetales selectas	41
Tabla 7. Datos de RMN ¹ H de 51-53 y 55 (δ en ppm, <i>J</i> en Hz) ^a	56
Tabla 7. (continuación). Datos de RMN ¹ H de 56, 57 y 59 (δ en ppm, <i>J</i> en Hz) ^a	57
Tabla 8. Datos de RMN ¹³ C de 51-53, 55-57 y 59 (δ en ppm) ^a	58

DIAGRAMAS

Diagrama 1. Metodología general	38
---------------------------------	----

ESPECTROS

Espectro 1. EM-IE de 41	65
Espectro 2. IR (KBr) de 41	66
Espectro 3. RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de 41	67
Espectro 4. RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de 41	68
Espectro 5. Experimento COSY (500 MHz, CDCl ₃) de 41	69
Espectro 6. EM-IE de 45	70
Espectro 7. IR (KBr) de 45	71
Espectro 8. RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃ , 50°C) de 45	72
Espectro 9. RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃ , 50°C) de 45	73

Espectro 10. Experimento COSY (500 MHz, CDCl ₃ , 50°C) de 45	74
Espectro 11. EM-FAB de 48	75
Espectro 12. RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃ :CD ₃ OD/1:1) de 48	76
Espectro 13. IR (KBr) de 48	77
Espectro 14. RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃ :CD ₃ OD/1:1) de 48	78
Espectro 15. Experimento COSY (500 MHz, CDCl ₃ :CD ₃ OD/1:1) de 48	79
Espectro 16. RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de 51	80
Espectro 17. RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de 51	81
Espectro 18. RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de 52	82
Espectro 19. RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de 52	83
Espectro 20. RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de 53	84
Espectro 21. RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de 53	85
Espectro 22. RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃ -DMSO- <i>d</i> ₆ , 3:1) de 55	86
Espectro 23. RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃ -DMSO- <i>d</i> ₆ , 3:1) de 55	87
Espectro 24. RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃ -CD ₃ OD, 1:1) de 56	88
Espectro 25. RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃ -CD ₃ OD, 1:1) de 56	89
Espectro 26. RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de 57	90
Espectro 27. RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de 57	91
Espectro 28. RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de 59	92
Espectro 29. RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de 59	93
PUBLICACIÓN	94

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de etilo
AMCPB	Ácido <i>m</i> -cloroperbenzoico
°C	Grado Celsius
CCPR	Cromatografía en Columna a Presión Reducida
CCG	Cromatografía en Columna a Gravedad
CCFP	Cromatografía de Capa Fina Preparativa
CPP	Cromatografía de Placa Preparativa
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CI ₅₀	Concentración Inhibitoria Media
COSY	Espectroscopia de Correlación (Correlation Spectroscopy)
c	Cuádruple
d	Doble
da	Doble ancho
dd	Doble de dobles
ddd	Doble de doble de dobles
δ	Desplazamiento químico
DEPT	Aumento sin Distorsión por Transferencia de Polarización (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)
EM	Espectrometría de Masas
EMAR	Espectrometría de Masas de Alta Resolución
EMIE	Espectrometría de Masas de Impacto Electrónico
eV	Electronvolts
FAB	Bombardeo Rápido de Átomos
g	Gramo
HMBC	Correlación Heteronuclear de Múltiples Enlaces (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)
HSQC	Correlación Heteronuclear Cuántica Sencilla (Heteronuclear Single Quantum Correlation)

Hz	Hertz
IE	Impacto Electrónico
IR	Espectroscopía de Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
λ	Longitud de onda (cm ⁻¹)
L	Litro
M ⁺	Ion Molecular
m	Multiple
mg	Miligramo
mL	Mililitro
μ M	Micromolar
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
nm	Nanómetro
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
pf	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno-1
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13
RO	Rotación óptica
s	Simple
sa	Simple ancha
SRB	Sulforrodamina B
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Tetrametilsilano
UV	Espectrofotometría de Ultravioleta

ABSTRACT

The cytotoxic activity against some cancer cell lines of the organic extracts from the aerial parts of *Garcia parviflora* was evaluated. The hexane and ethyl acetate extracts displayed activity and from these residues were isolated the new natural products 1,2-dehydro-2,3-secofriedelan-3-oic acid (**41**), 1 β -hydroxyfriedelin (**45**) and 3 β -hydroxyfriedelan-23-oic acid (**48**) together with the known compounds acetyl aleuritolic acid (**42**), friedelin-3,4-lactone (**43**), β -sitosterol (**44**), elemicin (**46**) and 4-hydroxy-5-propionyl-1,3-di-*O*-methylpyrogallol (**47**). Furthermore, from the methanolic extract were isolated (-)-syringaresinol (**49**) and β -sitosteryl- β -*D*-glucopyranoside (**50**). Additionally, several derivatives (**51-59**) were obtained from **45** by reduction, oxidation and esterification. Some natural products and semisynthetic derivatives were evaluated as inhibitors of cancer cell growth showing marginal activity.

1. RESUMEN

Se evaluó la actividad citotóxica de los extractos orgánicos de las partes aéreas de *Garcia parviflora* contra algunas líneas celulares de cáncer. De los extractos de hexano y de acetato de etilo que exhibieron actividad se aislaron los productos naturales novedosos ácido 1,2-dehidro-2,3-secofriedelan-3-oico (**41**), 1 β -hidroxifriedelina (**45**) y el ácido 3 β -hidroxi-23-friedelin-oico (**48**) y los compuestos conocidos ácido acetyl aleurítico (**42**), lactona 3,4-friedelina (**43**), β -sitosterol (**44**), elemicina (**46**) y 4-hidroxi-5-propionil-1,3-di-*O*-metilpirogalol (**47**). Por otra parte, del extracto metanólico se aislaron el (-)-siringaresinol (**49**) y el β -*D*-glucopiranosido de β -sitosterilo (**50**). Adicionalmente, a partir de **45** se obtuvieron algunos derivados (**51-59**) mediante procesos de reducción, oxidación y esterificación. Algunos productos naturales y derivados semisintéticos se evaluaron como agentes inhibidores del crecimiento de células cancerígenas mostrando actividad marginal.

2. INTRODUCCIÓN

Las plantas superiores han constituido un recurso importante de la medicina tradicional que se ha practicado desde la antigüedad por diferentes culturas en el mundo. Como resultado de estas prácticas, se ha generado conocimiento sobre el uso y manejo de ciertas plantas con el fin de mantener la salud y prevenir, mejorar o tratar padecimientos físicos o mentales que han aquejado a la humanidad [1].

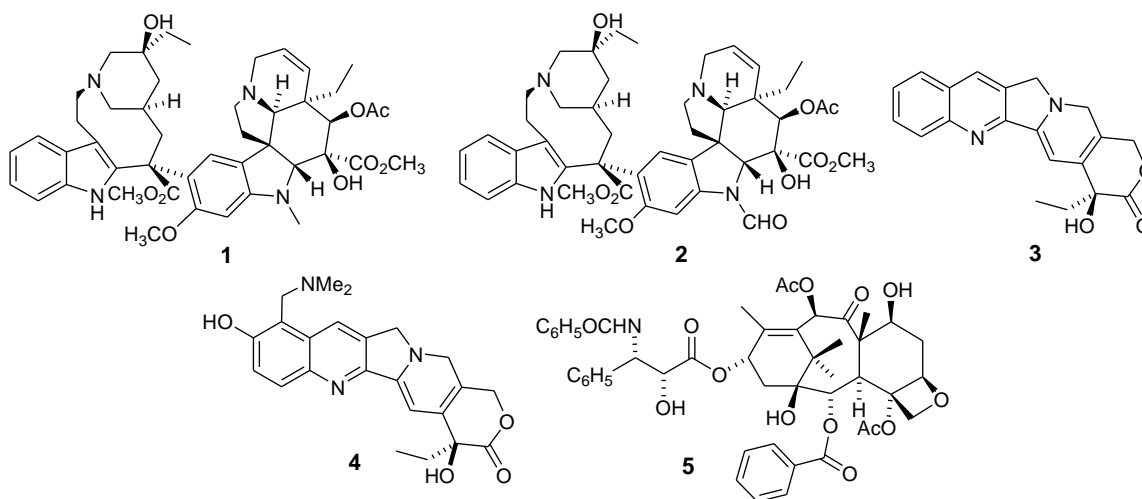
Las plantas y otros organismos vivos tienen la habilidad de biosintetizar una amplia variedad de estructuras químicas complejas que han mostrado diferentes actividades biológicas relevantes. Una parte significativa de estos productos naturales han sido la base para el desarrollo de nuevos fármacos [2].

Es reconocido que el cáncer constituye una de las principales causas de muerte en el mundo. Basta mencionar que sólo en el 2008 fallecieron 7.6 millones de personas y más del 70% de los decesos se registraron en países de bajos y medianos ingresos [3]. En México, el cáncer constituye la tercera causa de muerte, después de la diabetes y las enfermedades cardiovasculares y en el mismo año se registraron 71,074 decesos a causa de este padecimiento [4]. Debido a que esta enfermedad constituye un problema de salud pública, la búsqueda de metabolitos secundarios provenientes de plantas se ha concentrado hacia la prevención y el tratamiento de este padecimiento y para este último caso, que actúen específica y selectivamente contra células tumorales. Es interesante notar que el 42% de los fármacos anticancerígenos aprobados en el período comprendido de 1940 al 2006 son de origen natural [5].

A lo largo de la historia se han reportado más de 3000 especies de plantas en el mundo que se emplean en medicina tradicional para tratar alguna condición física relacionada al cáncer. Puede afirmarse que la búsqueda de agentes anticancerígenos a partir de esta fuente natural, inició en la década de 1950 con el descubrimiento de los alcaloides vinblastina (**1**) y vincristina (**2**) aislados de la planta *Catharanthus roseus* (Apocynaceae), usada por varias culturas para el tratamiento de la diabetes. La vinblastina (**1**) se emplea para tratar leucemias, cáncer de testículo, pecho, ovario y pulmón, mientras que la vincristina (**2**) se emplea para el tratamiento de leucemia linfocítica aguda en niños, cáncer cervicouterino, de colon y de pecho [6].

La camptotecina (**3**) es un alcaloide que se obtiene de la planta *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae) que mostró su eficacia contra tumores de colon y estómago, su análogo semisintético

topotecano (**4**) se usa para tratar el cáncer de ovario. Indudablemente el ejemplo reciente más significativo es el descubrimiento del taxol (**5**), metabolito que se aisló de la corteza del árbol *Taxus brevifolia* y que se usa para el tratamiento del cáncer de ovario, pecho y cerebro [1].



En las últimas décadas se ha recopilado información de plantas que se emplean en medicina tradicional para el tratamiento del cáncer. Dentro de esta información, la familia Euphorbiaceae se considera como una fuente de sustancias con propiedades citotóxicas y antitumorales relevantes (diterpenos de tipo latirano, jatrofano, tigliano, ingenano, entre otros) [7a, 7b].

Considerando que el cáncer es un problema de salud mundial y que plantas pertenecientes a la familia Euphorbiaceae biosintetizan compuestos que exhiben diversas actividades biológicas, entre las que destaca la inhibición del crecimiento de células cancerosas (citotoxicidad), se propuso en el presente trabajo de investigación realizar la evaluación citotóxica de los extractos orgánicos de algunas especies selectas de esta familia (*Garcia parviflora*, *Sapium macrocarpum*, *S. nitidum* y *S. glandulosum*), con el propósito de aislar y caracterizar constituyentes químicos que presenten dicha actividad biológica. Adicionalmente, se describe la obtención de varios derivados semisintéticos del metabolito secundario mayoritario de *Garcia parviflora* y la bioevaluación de los mismos.

3. ANTECEDENTES

3.1. Generalidades de la familia Euphorbiaceae

3.1.1 Hábitat y diversidad

La familia Euphorbiaceae es una de las más grandes a nivel mundial y ocupa el sexto lugar en diversidad entre las angiospermas después de las Orchidaceae, Asteraceae, Fabaceae, Poaceae y Rubiaceae. Se divide en cinco subfamilias: Phyllanthoideae, Oldfieldioideae, Euphorbioideae, Crotonoideae, Acalyphoideae. Está constituida aproximadamente por 8,700 especies incluidas en 320 géneros que se distribuyen en las regiones tropicales, subtropicales y templadas de los hemisferios norte y sur.

En la República Mexicana la flora vascular está calculada en 22,000 especies, dentro de estas, la familia Euphorbiaceae contribuye con el 3% (782 especies ubicadas en 43 géneros). Los miembros de esta familia pueden crecer como plantas herbáceas anuales, hierbas perennes, geófitas, arbustos, árboles y bejucos. Los géneros nacionales que cuentan con el mayor número de especies son: *Euphorbia* con 241, *Croton* con 124, *Acalypha* con 108, *Jatropha* con 48 y *Phyllanthus* con 41, juntos representan el 72% de las especies de Euphorbiaceae en México [8].

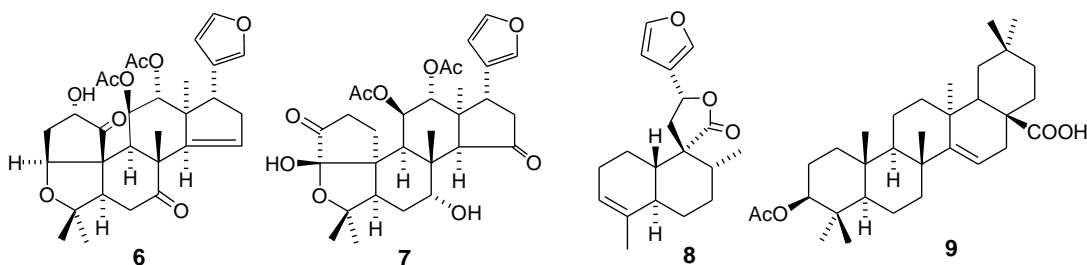
3.1.2 Importancia económica y biológica

La familia Euphorbiaceae es importante económicamente, ya que numerosas especies de este grupo se cultivan por su uso industrial (p.ej. *Ricinus communis* y *Hevea brasiliensis*), alimenticio (p.ej. *Manihot esculenta*) y ornamental (p.ej. *Euphorbia pulcherrima*) [8]. Algunas plantas de esta familia se conocen por sus propiedades tóxicas, irritantes a mucosas y piel e inductoras de tumores e inflamación [9].

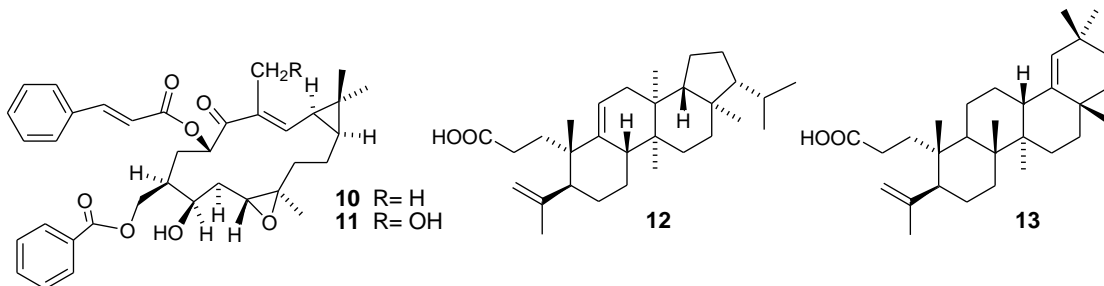
Esta familia se caracteriza por la biosíntesis de una amplia variedad de compuestos diterpénicos con diferentes tipos de esqueleto que presentan actividades biológicas importantes. Dentro de estos, los de tipo tigliano, ingenano y dafnano provocan irritación en la piel y promueven la formación de tumores, y los de tipo latirano y jatrofano han mostrado potente actividad antitumoral [10,11].

3.1.3 Estudio químico y actividad biológica

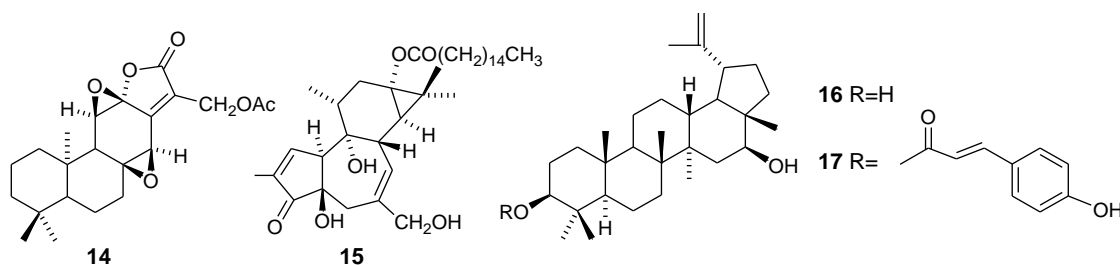
De estudios fitoquímicos previos de diversas especies de la familia Euphorbiaceae, se han aislado y caracterizado compuestos que presentan actividad biológica relevante. Por citar algunos ejemplos de *Croton jatrophoides* se aislaron tetranorditerpenos (limonoides) con actividad antialimentaria para insectos como los compuestos zumketol (**6**) y musidol (**7**) [12, 13]. De la corteza de *C. cajucara* se obtuvieron diterpenos de tipo clerodano como el metabolito *trans*-dehidrocrotonina (**8**) que ha presentado actividad anti-inflamatoria, hipoglicémica, antiulcerosa, anti-estrogénica, antitumoral entre otras [14]. El triterpeno ácido acetil aleuritólico (**9**) aislado de *C. urucurana* mostró actividad antibacteriana relevante contra *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus* [15].



De las partes aéreas (hojas y ramas) de *Euphorbia lagascae* se aislaron diterpenos de tipo latirano **10** y **11** que modulan la glicoproteína P (proteína que transporta los fármacos anticancerígenos fuera de la célula antes de que alcancen el citosol y se presente el efecto deseado) responsable de la resistencia a multifármacos empleados para el tratamiento del cáncer, cabe mencionar que el compuesto **10** induce el mecanismo apoptótico en células cancerígenas [10]. De la hierba de *E. chamaesyce* se aislaron los triterpenos **12** y **13** que mostraron actividad citotóxica contra células cancerígenas de pulmón, colón y estómago [16]. Adicionalmente se reportó que el compuesto **12** inhibe la topoisomerasa II [17].



De las raíces de *E. fischeriana* se obtuvieron los diterpenos 17-acetoxi-jolquinólida B (**14**) y 12-deoxi-forbol-13-decanoato (**15**) que exhibieron actividad citotóxica relevante contra células Ramos B (neoplasia linfoide de células B, linfoma de Burkitt) [18]. Los triterpenos **16** y **17** que fueron obtenidos de la corteza de *Jatropha neopauciflora* inhibieron moderadamente el crecimiento de células cancerosas [19].



De las semillas de *Croton tiglium* se aislaron diterpenos de tipo tigliano como los compuestos 13-acetato de 12-*O*-tetradecanoilforbol (**18**) y 13-decanoato de 12-*O*-acetilforbol (**19**) que inhibieron de manera total el efecto citopático inducido por el VIH, además es importante mencionar que el compuesto **18** (TPA) activa al 100% la proteína quinasa C (asociada con la promoción de tumores) [20]. El diterpene de tipo dafnano rediocida G (**20**) obtenido de la raíz de *Trigonostemon reidioides* mostró citotoxicidad en contra de líneas celulares tumorales [21]. De la planta entera de *Phyllanthus urinaria* y de las hojas de *Sapium sebiferum* se aisló el tanino **21** (geranina), que actuó como antiviral (inhibe la replicación del virus del herpes simple tipo 2) [22] y antihipertensivo [23].

3.2 Triterpenos

3.2.1 Generalidades

Los triterpenos son metabolitos secundarios que contienen 30 átomos de carbono provenientes de la incorporación de seis unidades de isoprenilo. Se conocen alrededor de 20,000 triterpenos naturales que se distribuyen ampliamente en la naturaleza de forma libre o combinados con azúcares (glicósidos). Biosintéticamente provienen de la ciclización del escualeno (dos moléculas de pirofosfato de farnesilo) y del (2,3)-óxido de escualeno que dan lugar a diferentes tipos de esqueleto 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. Para que se lleve a cabo la policiclación de los precursores acíclicos

(escualeno y el óxido de escualeno) es necesario que adopten una conformación plegada adecuada en donde los centros electrónicamente deficientes queden próximos a los centros nucleofílicos. En la figura 1 se ilustran algunos tipos de esqueletos de triterpenos.

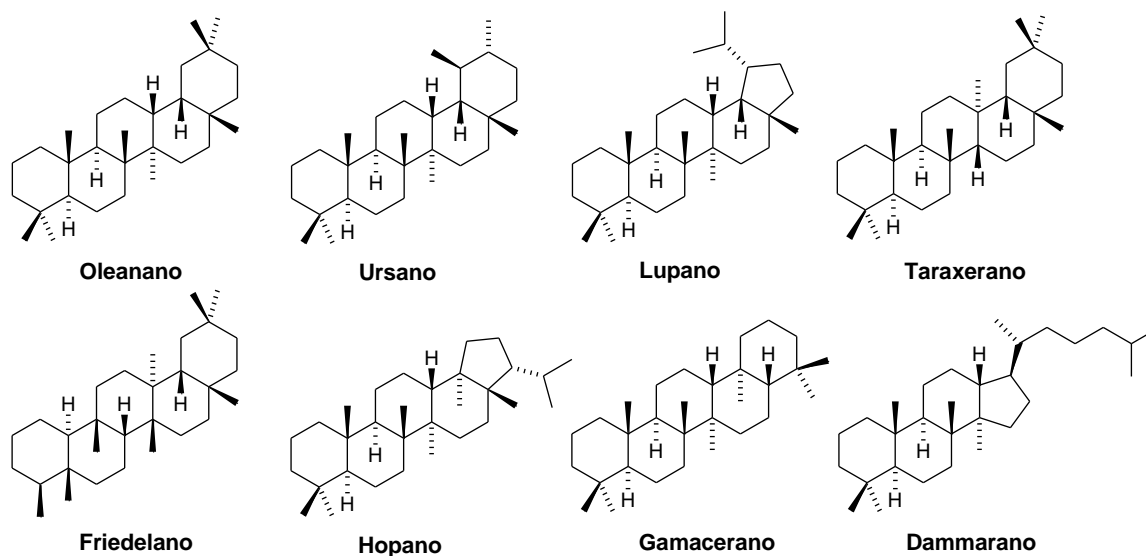
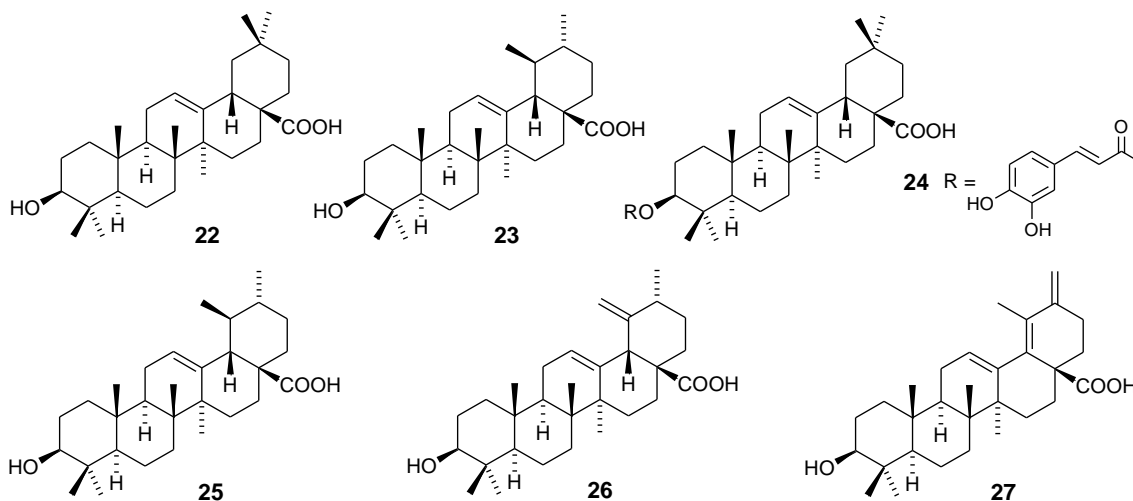


Figura 1. Algunos tipos estructurales de triterpenos

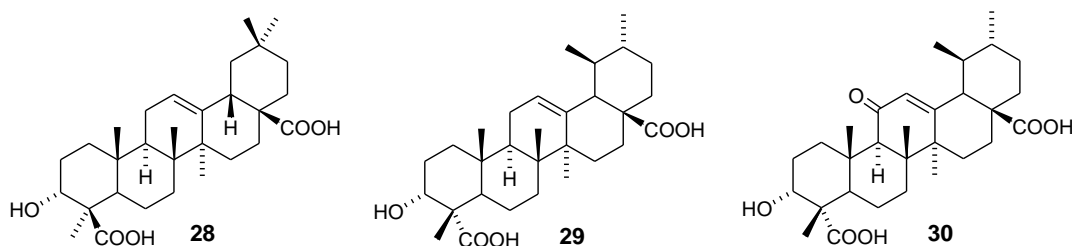
3.2.2 Importancia biológica

Los triterpenos han mostrado diferentes actividades biológicas relevantes como agentes anti-inflamatorios, antivirales, antimicrobiales, hepatoprotectores, inmunomoduladores y antitumorales [24].

Los ácidos oleanólico (AO) (**22**) y ursólico (AU) (**23**) son triterpenos pentacíclicos que se han aislado de diferentes plantas, los cuales presentan diversas actividades biológicas. Ambos triterpenos inhiben el crecimiento de células tumorales [25,26]. El AO es considerado un agente inmunosupresor ya que reduce las citocinas pro-inflamatorias, e inhibe la enzima adenosina desaminasa (incrementada en diversas enfermedades autoinmunes) [27]. Diversos compuestos relacionados como **24** y **25** también muestran actividad citotóxica en diferentes líneas celulares de tumores humanos [28]. Los triterpenos **26** y **27** inhiben la enzima ADN-polimerasa- β [29].

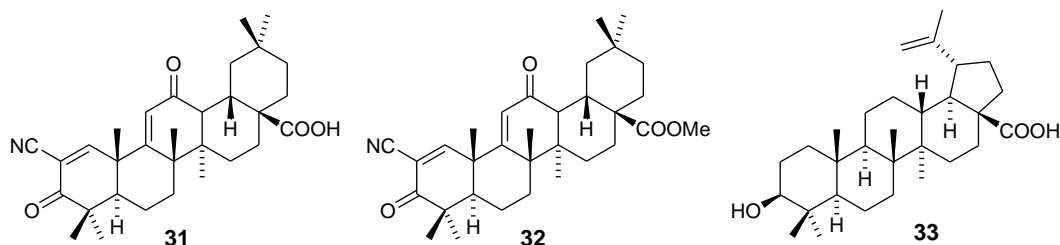


Los ácidos boswélicos **28**, **29** y **30** han mostrado inhibición de diferentes mediadores y enzimas pro-inflamatorias. Estudios clínicos pilotos sugieren que estos compuestos pueden ser eficaces contra enfermedades autoinmunes [30], por otro lado, se ha observado que los análogos acetilados (posición 3) de los tres compuestos antes mencionados inhiben la actividad catalítica de la enzima topoisomerasa I y II α mostrando la mayor actividad el derivado acetilado del compuesto **28** [31].

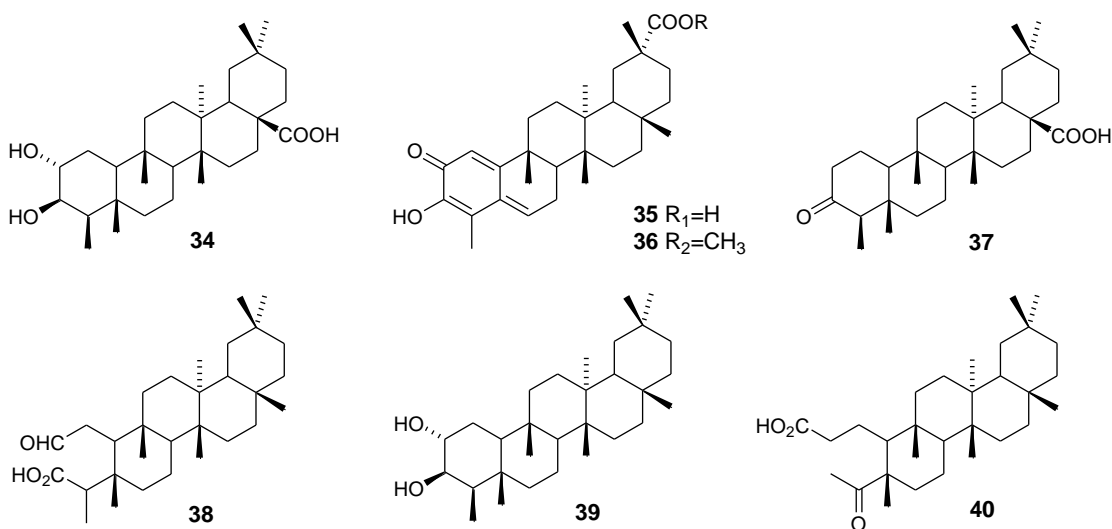


En la literatura se han reportado modificaciones químicas del ácido oleanólico (**22**) y como resultado se han obtenido compuestos con actividades biológicas relevantes. Por mencionar algunos los compuestos **31** (CDDO) y **32** (CDDO-Me) que inducen apoptosis en células cancerígenas e inhiben el crecimiento y la proliferación celular en diversas líneas celulares de cáncer humano. En la actualidad ambos compuestos se encuentran en ensayos clínicos de fase 1 [32]. El compuesto **32**

suprime la secreción de IL-6 (contribuye al crecimiento y supervivencia de las células tumorales y a la resistencia de fármacos) en células cancerosas de ovario resistentes al fármaco antitumoral paclitaxel [33]. El ácido betulínico (**33**) induce apoptosis en la línea celular tumoral de neuroblastoma humano y exhibe citotoxicidad contra líneas celulares tumorales de melanoma humano, cerebro y neuroectodermal [34,35].



Algunos triterpenos de tipo friedelano han mostrado actividad citotóxica en diferentes líneas de células cancerosas como el ácido pluricostático (**34**) [36], celastrol (**35**), pristimerina (**36**) [37] y el compuesto (**37**) [38], así como algunos derivados de la friedelina, como los compuestos **38-40** [39,40].



4. JUSTIFICACIÓN

La familia Euphorbiaceae se reconoce por la diversidad estructural de los productos naturales que se han aislado y caracterizado a partir de especies que la integran. Se ha reportado en la literatura que algunos compuestos de tipo triterpénico y diterpénico han mostrado actividad citotóxica y antitumoral (10-17), y considerando la importancia del cáncer como un problema de salud pública, es relevante realizar investigaciones concernientes al descubrimiento de nuevas estructuras que posean actividad antitumoral o que sean la base para el desarrollo de nuevos fármacos, a partir de algunas especies de los géneros *Garcia* y *Sapium*.

5. HIPÓTESIS

Debido a que la familia Euphorbiaceae se caracteriza por la biosíntesis de ciertos compuestos (di- y triterpénicos) que han presentado actividad citotóxica, y considerando que algunos géneros (*Croton*, *Jatropha* y *Euphorbia*, entre otros) de esta familia son ricos en este tipo de sustancias naturales bioactivas, es esperable aislar y caracterizar compuestos citotóxicos a partir de algunas especies selectas de los géneros *Garcia* y *Sapium*.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Realizar la evaluación de la actividad citotóxica de los extractos orgánicos obtenidos de ciertas especies de *Garcia* y *Sapium* y dado los resultados obtenidos, llevar a cabo el aislamiento, la elucidación estructural y las evaluaciones citotóxicas de los constituyentes químicos presentes en los extractos orgánicos bioactivos. Así mismo, realizar derivatizaciones químicas de los compuestos mayoritarios obtenidos de los extractos orgánicos bioactivos y establecer sus actividades citotóxicas.

6.2. Objetivos específicos

- Compilar la información bibliográfica referente al género *Garcia* y *Sapium*, que muestren la presencia de productos naturales con actividad citotóxica.
- Colectar algunas especies vegetales de los géneros antes mencionados.
- Realizar ensayos de extracción a escala analítica de las especies seleccionadas (*Garcia parviflora*, *Sapium macrocarpum*, *S. nitidum* y *S. glandulosum*) y preparar los extractos orgánicos correspondientes a escala preparativa.
- Evaluar la actividad citotóxica de los extractos orgánicos mediante el ensayo de citotoxicidad de la sulforrodamina B, frente a un conjunto de seis líneas celulares de tumores humanos: pecho [MCF7], sistema nervioso central (glías) [U251], colon [HCT15], leucemia [K562], próstata [PC3] y pulmón [SKLU].
- Realizar el fraccionamiento de los extractos bioactivos, así como el aislamiento y purificación de sus metabolitos secundarios mayoritarios mediante procedimientos cromatográficos convencionales.
- Elucidar y caracterizar los metabolitos aislados mediante distintas técnicas espectroscópicas y espectrométricas.
- Realizar derivatizaciones químicas (oxidaciones, reducciones y esterificaciones) de los metabolitos secundarios obtenidos en mayor cantidad.

- Establecer mediante bioensayos la actividad citotóxica (líneas celulares de cáncer humano) de los metabolitos aislados y de sus posibles derivados.
- Contextualizar los resultados en el ámbito de los productos naturales bioactivos.

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

7.1. Selección del material vegetal

Para continuar con la línea de investigación que se ha desarrollado con anterioridad en nuestro grupo de trabajo concerniente a la familia Euphorbiaceae (*Croton* y *Jatropha*), se propuso en este proyecto de investigación el estudio químico de algunas especies de plantas de esta familia (*Garcia parviflora*, *Sapium macrocarpum*, *S. nitidum* y *S. glandulosum*), que no han sido trabajadas en el laboratorio.

Dada la disponibilidad y antecedentes químicos, la selección de las especies vegetales se realizó mediante el criterio quimiotaxonómico.

7.2. Determinación de la actividad citotóxica de los extractos vegetales

La actividad citotóxica de los extractos que se obtuvieron de las maceraciones del material vegetal se evaluó por el método colorimétrico de la sulforrodamina B frente a un conjunto de seis líneas celulares de tumores humanos [pecho (MCF-7), colon (HCT-15), sistema nervioso central (U-251 Glía), leucemia (K-562) y próstata (PC-3)]. En la Tabla 1 se muestran los resultados preliminares de los extractos expresados en porcentaje de inhibición de la proliferación de células cancerígenas a 50 µg/mL.

Tabla 1. Actividad citotóxica de los extractos orgánicos de las especies de *Garcia* y *Sapium* a 50 µg/mL

Extracto	U251 glías	PC3 próstata	K562 leucemia	HCT15 colon	MCF7 pecho	SKLU1 pulmón
<i>G. parviflora</i> ^a	94.9	93.9	100	60.2	84.0	98.8
<i>G. parviflora</i> ^b	50.7	62.0	94.25	15.3	26.4	33.8
<i>G. parviflora</i> ^c	9.1	37.8	64.86	25.5	s.a	17.1
<i>S. macrocarpum</i> ^a	46.49	46.13	60.38	42.47	40.11	40.11
<i>S. macrocarpum</i> ^b	43.84	53.17	56.49	32.88	28.01	46.74
<i>S. macrocarpum</i> ^c	43.56	41.24	58.36	s.a	2.15	66.12
<i>S. nitidum</i> ^a	26.22	s.a	52.27	s.a	s.a	37.32
<i>S. nitidum</i> ^b	47.45	41.92	58.59	s.a	5.17	57.66

<i>S. nitidum</i> ^c	20.43	s.a	47.0	s.a	s.a	22.99
<i>S. glandulosum</i> ^a	17.64	s.a	58.19	s.a	6.11	21.93
<i>S. glandulosum</i> ^b	37.73	30.33	64.96	6.06	34.2	46.88
<i>S. glandulosum</i> ^c	37.77	24.82	57.56	s.a	18.3	40.49

s.a.: sin actividad. ^a extracto de hexano, ^b extracto de acetato de etilo, ^c extracto de metanol.

De acuerdo a los resultados mostrados en la Tabla 1, se seleccionaron los extractos que inhibieron más del 60 % la proliferación celular para su estudio químico. De estos extractos (marcados con negrita), se decidió analizar químicamente el extracto hexánico y de acetato de etilo de *G. parviflora*, ya que presentaron los mayores porcentajes de inhibición. Aunado a esto, se examinó el extracto metanólico para concluir el estudio químico de esta planta. Los materiales vegetales se analizaron en base al procedimiento convencional [41].

7.3. Estudio químico y evaluación biológica de los metabolitos secundarios de *Garcia parviflora*

La identificación de los compuestos conocidos aislados de las partes aéreas (hojas y ramas) de la especie vegetal selecta, se efectuó mediante la comparación de sus propiedades físicas y espectroscópicas con las de la literatura y en algunos casos al comparar por CCF con muestras auténticas obtenidas previamente en nuestro laboratorio. La elucidación estructural de los compuestos novedosos, se llevó a cabo mediante el análisis detallado de sus propiedades físicas, espectroscópicas y espectrométricas que a continuación se describen.

7.3.1. Estudio químico del extracto hexánico de *G. parviflora*

El estudio químico del extracto hexánico permitió el aislamiento del nuevo triterpeno ácido 1,2-dehidro-2,3-secofriedelin-oico (**41**) junto con los compuestos conocidos ácido acetil aleuritólico (**42**) [42, 43], 3,4-lactona de friedelina (**43**) [44, 45] y β -sitosterol (**44**) [46] (Figura 2).

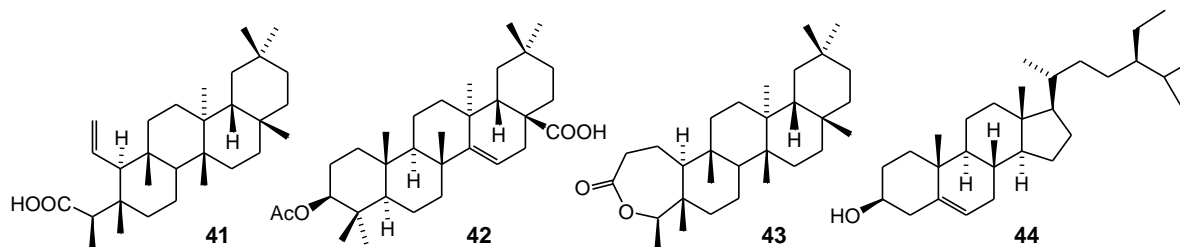


Figura 2. Constituyentes químicos del extracto hexánico de *G. parviflora*

El compuesto **41** fue aislado como un sólido blanco. En el espectro de masa (Espectro 1) se observó un ion molecular en m/z 442 consistente con la fórmula molecular $C_{30}H_{50}O_2$. Su espectro de IR (Espectro 2) mostró bandas de absorción para hidroxilo (3375 cm^{-1}) y carbonilo (1693 cm^{-1}). El análisis del espectro de RMN ^{13}C (Espectro 3), mostró 30 señales, las cuales fueron asignadas (mediante el experimento DEPT) a ocho metilos, diez metilenos (nueve sp^3 y uno sp^2), cinco metinos (cuatro sp^3 y uno sp^2) y siete carbonos cuaternarios (uno corresponde a un grupo carbonilo de ácido carboxílico).

En el espectro de RMN 1H (Espectro 4) se observaron señales características de hidrógenos vinílicos y protones de metilos (siete señales simples y una doble) y metilenos que describen a un esqueleto triterpénico de tipo friedelano. Las señales en δ_H 5.74 (ddd, $J = 17.0, 10.5, 10.0$ Hz, H-1), 5.13 (dd, $J = 10.0, 2.5$ Hz, H-2a) y 4.98 (dd, $J = 17.0, 2.5$ Hz, H-2b) junto con las correlaciones heteronucleares que se observaron en el experimento HSQC, se asignaron a un metino (δ_C 135.2, C-1) y un metileno (δ_C 118.7, C-2) de una olefina terminal. Además, en el experimento COSY (Espectro 5) se observó que el hidrógeno vinílico en δ_H 5.74 correlacionó con una señal doble ($J = 10.5$ Hz) resonante en δ_H 1.72, que corresponde al protón de un metino (δ_C 60.6), y con las dos señales doble de dobles que fueron asignadas a los protones del metileno olefínico antes mencionado. Por otro lado, la señal cuádruple en δ_H 2.48 ($J = 7.0$ Hz) se asignó al protón de un metino (δ_C 47.8, H-4) (experimento HSQC) que correlaciona (experimento COSY) con la señal doble ($J = 7.0$ Hz) del metilo en δ_H 1.09 (H-23), que a su vez correlaciona en HMBC con el carbono del ácido carboxílico en δ_C 179.5 (C-3) y con el carbono cuaternario en δ_C 38.6 (C-5). Además, se observaron correlaciones HMBC de la señal cuádruple (δ_H 1.72) con los carbonos cuaternarios (C-3) y (C-5); con el carbono metino en δ_C 60.6 (C-10) y con los carbonos metilos en δ_C 20.8 (C-24) y 11.7 (C-23). El análisis anterior describe al fragmento A (Figura 3), cuya conectividad se confirmó por las correlaciones HMBC antes mencionadas.

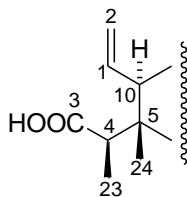


Figura 3. Fragmento A

Adicionalmente, el análisis de los experimentos HSQC y HMBC permitió asignar las señales de los hidrógenos restantes y de sus correspondientes carbonos, confirmando la presencia de un triterpeno novedoso de tipo friedelano (**41**). Cabe mencionar que la configuración relativa de C-4 (*R*) se propuso por analogía de otros friedelanos aislados de la naturaleza.

7.3.2. Estudio químico del extracto de acetato de etilo de *G. parviflora*

El análisis químico del extracto de acetato de etilo permitió el aislamiento de los nuevos triterpenos 1 β -hidroxifriedelina (**45**) y el ácido 3 β -hidroxi-23-friedelin-oico (**48**), junto con los compuestos conocidos elemicina (**46**) [47,48] y 4-hidroxi-5-propionil-1,3-di-*O*-metilpirogalol (**47**) [49] (Figura 4).

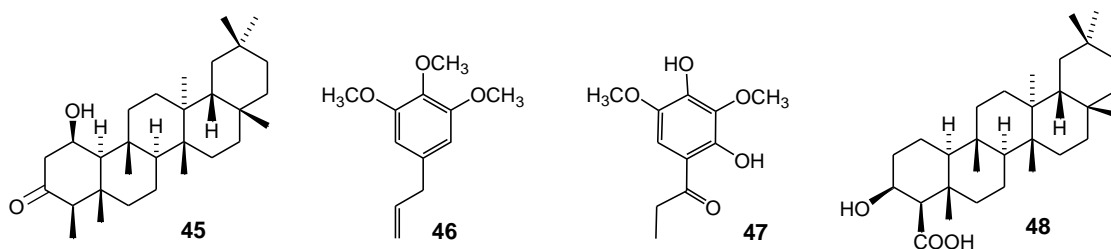


Figura 4. Constituyentes químicos del extracto de acetato de etilo de *G. parviflora*

El compuesto **45** se aisló como agujas transparentes. En el espectro de masa, en la modalidad de impacto electrónico (Espectro 6), se observó un ion molecular en m/e 442, el cual indicó la fórmula molecular $C_{30}H_{50}O_2$. En el espectro de IR (Espectro 7) se observaron bandas de absorción para hidroxilo (3370 cm^{-1}) y carbonilo (1703 cm^{-1}). La presencia de un triterpeno fue evidente por las 30 señales de carbono que se observaron en el experimento de RMN ^{13}C (Espectro 8), las cuales fueron asignadas (mediante el experimento DEPT), a ocho metilos, diez metilenos, cinco metinos (uno unido a una función oxigenada) y siete carbonos cuaternarios (un carbonilo de cetona). Por otro lado, en el espectro de RMN 1H (Espectro 9) se observaron hidrógenos de metilos (siete señales simples y una doble), metilenos y metinos característicos de un triterpeno. En base a esto, se observó (Espectro 9) una señal simple ancha localizada en δ_H 4.84 cuyo desplazamiento químico a campo bajo indica que se trata de un protón carbinólico (H-1). La existencia de este grupo se corroboró con la señal de un carbono unido a oxígeno en δ_C 71.4 (Espectro 8). Por otra parte, este protón carbinólico se acopló (Espectro 10 COSY) a tres enlaces de distancia con la señal simple ancha del metino en δ_H 1.47 (H-10) y con los hidrógenos de un metileno que resuenan en δ_H 2.66 ($J = 14.0, 4.5\text{ Hz, H-2ax}$) y 2.38 ($J = 14.0, 2.5\text{ Hz, H-2ec}$) como señales doble de dobles

respectivamente, cuyos valores de las constantes de acoplamiento permitieron deducir el acoplamiento ecuatorial-axial ($J = 4.5$ Hz, H-2 α) y ecuatorial-ecuatorial ($J = 2.5$ Hz, H-2 β) con el hidrógeno del metino H-1. Por otro lado, la señal cuádruple que resuena en δ_H 2.30 ($J = 6.5$ Hz, H-4 α) presentó correlaciones 1H - 1H con la señal doble en δ_H 0.94 ($J = 6.5$ Hz) correspondiente a un metilo (H-23). Mediante las correlaciones a distancia 3J se estableció que el grupo carbonilo de cetona se encuentra en la posición 3 del triterpeno, ya que el carbonilo correlaciona con los protones del metilo CH₃-23. A partir del experimento NOESY se estableció la orientación β del grupo hidroxilo en C-1, ya que se presentaron interacciones entre el protón ecuatorial H-1 α con los protones H-10 α , H-11, H-8 α , H-2 α y H-2 β . Adicionalmente, las interacciones del protón H-10 α con H-1 α , H-2 α y H-4 α establecieron el arreglo conformacional del anillo A del triterpeno (Figura 5).

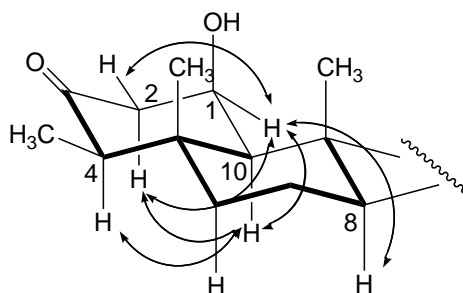


Figura 5. Interacciones NOESY de **45**

Mediante las correlaciones heteronucleares, fue posible establecer el esqueleto del triterpeno pentacíclico de tipo friedelano. La configuración relativa del triterpeno fue confirmada mediante el análisis por difracción de rayos X de un cristal de esta muestra (Figura 6).

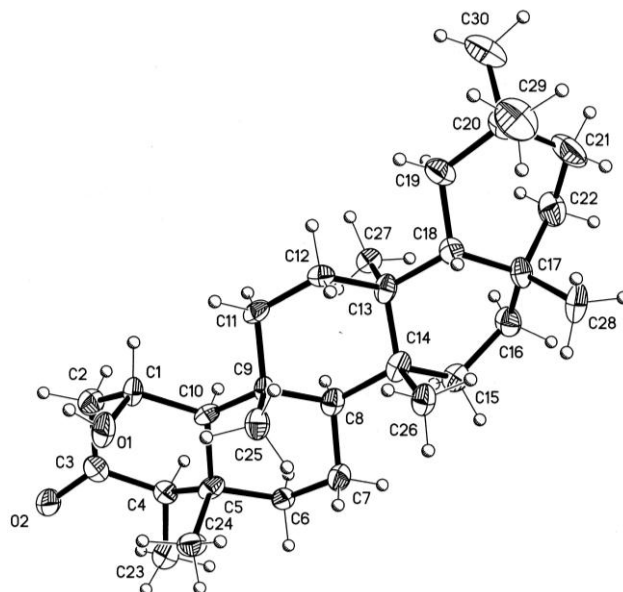


Figura 6. Estereovista ORTEP de **45**

La configuración absoluta de **45** se determinó mediante el espectro de dicroísmo circular, que mostró un efecto Cotton negativo a 295 nm ($\Delta\epsilon - 50.41$), debido a la transición $n \rightarrow \pi^*$ del grupo carbonilo [50].

Del espectro de masa, modalidad FAB (Espectro 11), se estableció la fórmula molecular $C_{30}H_{51}O_3$, que se atribuyó al triterpeno **48** de acuerdo al $[M + H]^+$. El espectro de RMN ^{13}C (Espectro 12) mostró 30 señales, las cuales fueron asignadas (según el experimento DEPT) a siete metilos, once metilenos, cinco metinos y siete carbonos cuaternarios (un carbonilo de ácido). En el espectro de IR (Espectro 13) se observaron absorciones en 3421 y 1717 cm^{-1} atribuidas a un grupo hidroxilo y a un ácido carboxílico respectivamente, tales grupos se confirmaron por las señales de carbono en δ_C 68.2 (carbono unido a oxígeno) y 177.8 (Espectro 12). El espectro de RMN 1H (Espectro 14) mostró a campo alto señales para hidrógenos primarios (metilos), secundarios (metilenos) y terciarios (metinos) y a campo bajo se visualizó un hidrógeno carbinólico. Además se observaron seis señales simples para metilos en δ 0.89, 0.95, 1.00, 1.01, 1.04 y 1.19 (señal que integra para seis protones). La señal en δ 4.15 (ddd, $J = 2.5, 2.5, 2.5$ Hz, H-3 α), fue asignada a un protón carbinólico la cual exhibió correlaciones COSY (Espectro 15) con la señal múltiple en δ_H 1.94 (H-2a), con la señal simple en δ_H 1.50 (H-2b, señal traslapada) y con la señal doble en δ_H 2.20 ($J = 2.5$ Hz, H-4 α), que a su vez correlacionó ($^1H-^1H$) con H-3 α . La constante de acoplamiento entre H-3 y H-4 estableció la orientación β de los grupos hidroxilo y carbonilo presentes en el anillo

A del triterpeno. Esta configuración se confirmó por las interacciones espaciales relevantes del experimento NOESY entre H-4 α y H-3 α y H-10 α .

Por otra parte, en el experimento HMBC se observaron las correlaciones del hidrógeno H-3 α con los carbonos C-1 (δ 71.4) y C-5 (δ 38.5); de H-4 α con C-6 (δ 42.9), C-24 (δ 18.4), C-23 (δ 177.8, carbonilo) y correlaciones de H-6 α con C-10 (δ 61.0) y C-8 (δ 53.7).

El análisis del experimento HSQC junto con el HMBC permitieron asignar las señales de los hidrógenos restantes y de sus correspondientes carbonos; así como la conectividad del resto de la molécula confirmando la estructura del triterpeno **48**.

7.3.3 Estudio químico del extracto metanólico de *G. parviflora*

El fraccionamiento cromatográfico del extracto metanólico permitió la obtención de los productos naturales (-)-siringaresinol (**49**) [51,52] y β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo (**50**) [53]. La identificación de estos compuestos, se llevó a cabo mediante la comparación de sus propiedades físicas y espectroscópicas con las de la literatura y además para el compuesto **50** al comparar por CCF con una muestra auténtica obtenida en nuestro grupo de trabajo.

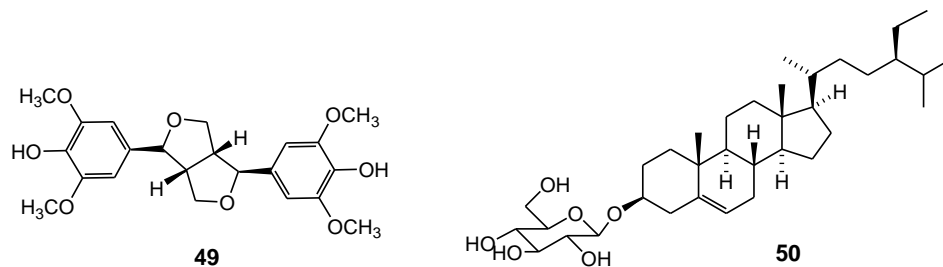


Figura 7. Constituyentes químicos del extracto metanólico de *G. parviflora*

7.3.4. Evaluación citotóxica de los productos naturales

Los productos naturales aislados (excepto **44**, **49** y **50**) fueron evaluados en el ensayo de citotoxicidad de sulforrodamina B frente a seis líneas celulares de cáncer humano a una concentración de 50 μ M. Los resultados preliminares de los porcentajes de inhibición de la proliferación de células cancerígenas se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Actividad citotóxica de los productos naturales **41-43** y **45-48** a 50 μ M.

Líneas celulares cancerosas humanas

Productos naturales	U251 (SNC)	PC3 (próstata)	K562 (leucemia)	HCT15 (colon)	MCF7 (pecho)	SKLU (pulmón)
41	48.26	s.a.	s.a	s.a.	s.a.	8.8
42	100	24.24	44.87	s.a.	s.a.	16.54
43	100	7.22	s.a.	s.a.	s.a.	14.13
45	5.66	s.a.	s.a.	s.a.	s.a.	6.9
46	s.a.	s.a.	39.0	18.4	0.3	33.52
47	s.a.	s.a.	19.2	9.2	s.a	19.73
48	29.11	39.65	s.a	28.6	27.83	14.69

Valores expresados en porcentaje de inhibición de la proliferación celular. s.a.: sin actividad

Los resultados mostrados en la Tabla 2, permitieron seleccionar aquellos compuestos que exhibieron porcentajes de inhibición de la proliferación celular mayores al 60%. En base a esto, se determinaron las concentraciones medias (CI_{50}) de los productos naturales **42** y **43** (presentaron el mayor porcentaje de inhibición) en la línea celular U251 (sistema nervioso central) es decir, la concentración en la que el compuesto inhibe el 50 % de la proliferación de células cancerígenas. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

En base a los resultados, los compuestos **42** y **43** mostraron una moderada y baja actividad inhibitoria respectivamente en comparación con el control positivo (adriamicina). Cabe mencionar que tales compuestos son los responsables de la actividad inhibitoria de la de la proliferación de las células tumorales en el extracto hexánico

Tabla 3. CI_{50} (μM) de los productos naturales **42** y **43**

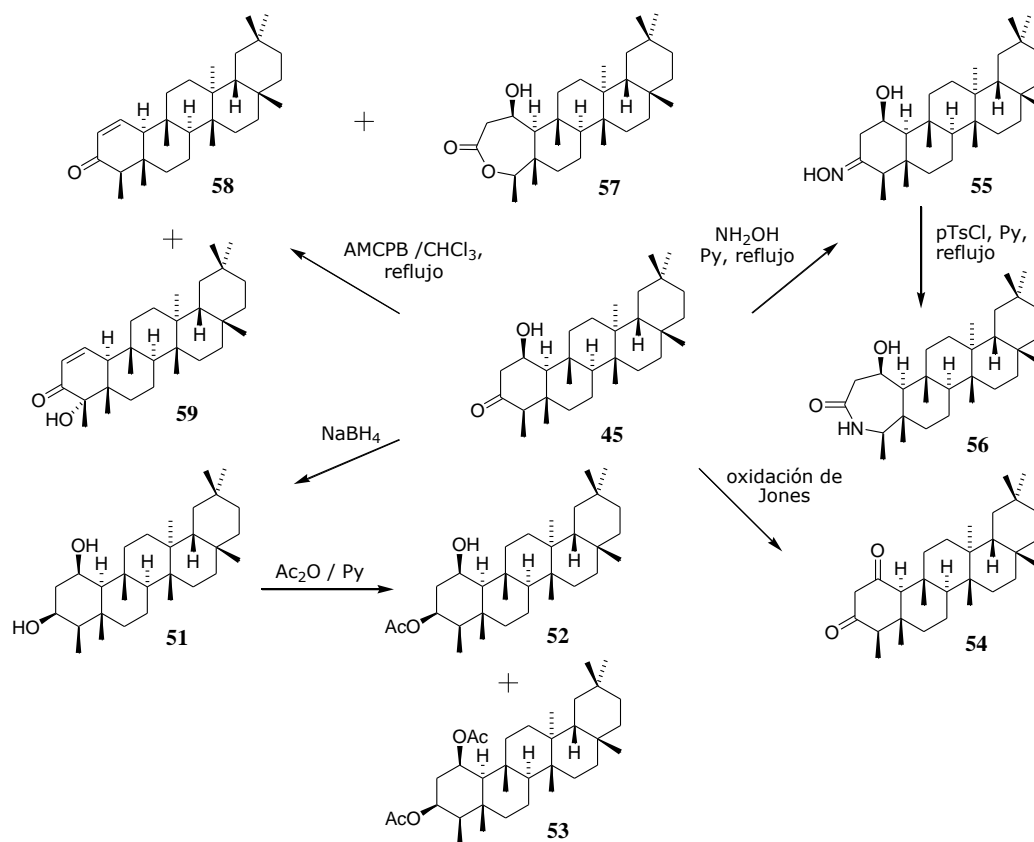
compuesto	U251 (Sistema nervioso central)
42	8.43 \pm 0.3
43	17.07 \pm 0.4
Adriamicina	0.32 \pm 0.02

Adriamicina usada como control positivo. Los resultados son el promedios \pm Error Estándar de la Media (E.E.M.)

7.4. Derivatizaciones químicas a partir de 1 β -hidroxifriedelina (**45**)

Dentro de los productos naturales obtenidos de *G. parviflora*, el nuevo triterpeno de tipo friedelano 1 β -hidroxifriedelina (**45**), aislado del extracto de acetato de etilo, fue el que se obtuvo en mayor cantidad (2 g). Este compuesto es relativamente insoluble en disolventes orgánicos como acetona, acetato de etilo, tetrahidrofurano, cloruro de metileno, metanol, cloroformo, entre otros. Esta solubilidad limitada se puede explicar por la formación de puentes de hidrógenos intermoleculares (identificados por el análisis de rayos X) que se observan entre los grupos carbonilo e hidroxilo de dos moléculas de este compuesto [54]. Debido a esto, la estabilidad cristalina del compuesto aumenta.

Dada la disponibilidad del compuesto **45** se realizaron algunas derivatizaciones químicas con el propósito de explorar la reactividad química del compuesto, ya que cuenta con dos grupos funcionales (carbonilo e hidroxilo) susceptibles a oxidaciones, reducciones y esterificaciones. En el Esquema 1 se ilustran las reacciones propuestas para dicho compuesto.



Esquema 1. Preparación de los derivados **51-59**

7.4.1. Reducción de 1 β -hidroxifriedelina (45)

La reducción del grupo cetona de 1 β -hidroxifriedelina (**38**) con NaBH₄ (borhidruro de sodio), en una mezcla de THF-H₂O (3:0.1 mL), generó el nuevo producto 1 β ,3 β -dihidroxifriedelano (**51**) en buenos rendimientos. La estructura de éste compuesto fue determinada de acuerdo a la siguiente evidencia espectroscópica.

El espectro de masa, presentó un ion molecular en *m/e* 444 consistente con la fórmula molecular C₃₀H₅₂O₂. El espectro de IR mostró una banda de absorción en 3428 cm⁻¹, correspondiente a un grupo hidroxilo. El análisis del espectro de RMN ¹³C (Espectro 16), junto con el experimento DEPT, indicaron la presencia de dos metinos unidos a oxígeno en δ_C 74.1 (C-3) y 68.4 (C-1), los cuales concuerdan con las dos señales simples anchas que se observaron a campo bajo en el espectro de RMN ¹H (Espectro 17) que pertenecen a los dos protones carbinólicos localizados en δ_H 4.48 (H-1) y 3.87 (H-3). Además, se observaron dos señales dobles en δ_H 2.64 (d, *J* = 7.0 Hz, OH-1) y 2.32 (d, *J* = 6.0 Hz, OH-3) que fueron asignados a los protones de dos hidroxilos. La asignación de cada una de las señales restantes de carbono y protón se llevaron a cabo mediante el análisis detallado de los experimentos de 2D HSQC, HMBC, COSY y NOESY los cuales establecieron la estructura del compuesto **51**.

7.4.2. Acetilación de 1 β -hidroxifriedelina (45)

El tratamiento de **45** con piridina y anhídrido acético a temperatura ambiente y bajo condiciones de reflujo a 12, 24, 48, y 72 hrs, no generó el producto acetilado deseado. La ausencia del producto se atribuyó al impedimento estérico del grupo hidroxilo (axial).

7.4.3. Acetilación de 1 β ,3 β -dihidroxifriedelano (51)

La acetilación del compuesto **51** con piridina y anhídrido acético a temperatura ambiente, generó los productos 3 β -acetoxi-1 β -hidroxifriedelano (**52**) y 1 β ,3 β -diacetoxi-friedelano (**53**) en bajos rendimientos. Las estructuras de ambos compuestos se determinaron en base a la siguiente evidencia espectroscópica.

La fórmula molecular C₃₂H₅₄O₃ fue asignada al compuesto **52** mediante EMAR-FAB (M⁺). Su espectro de IR mostró una banda de absorción en 1731 cm⁻¹ que indicó la presencia de un grupo carbonilo. El análisis del espectro de RMN ¹³C (Espectro 18), en adición con el

experimento DEPT, mostraron la presencia de un carbonilo (δ_C 170.2), un metilo de acetato (δ_C 21.3) y dos metinos unidos a oxígeno (δ_C 74.8 y 67.2). En el espectro de RMN 1H (Espectro 19), se observó la señal de un protón en δ_H 5.15 (ddd, $J = 3.0, 3.5, 3.0$ Hz) desplazado a campo bajo por el efecto de desprotección que ejerce el grupo acetato. Además, se observaron dos señales simples en δ_H 4.38 la cual fue asignada a un protón carbinólico, y en δ_H 2.07 que evidenció la presencia del metilo de un grupo acetato. Las asignaciones de los protones y carbonos restantes de la estructura se realizaron mediante el análisis de los experimentos de 2D HSQC, HMBC, COSY y NOESY.

La fórmula molecular del compuesto **53**, fue establecida como $C_{34}H_{56}O_4$ por EMAR-FAB (M^+). Su espectro de IR evidenció una banda de absorción para carbonilo en 1726 cm^{-1} . El análisis del espectro de RMN ^{13}C (Espectro 20), junto con el experimento DEPT, indicaron la presencia de dos carbonos cuaternarios que corresponden a dos carbonilos (δ_C 170.5 y 170.0) y dos metinos unidos a oxígeno (δ_C 72.8 y 68.1). En el espectro de RMN 1H (Espectro 21) se observaron dos señales simples anchas (δ_H 5.47 y 4.94 Hz) que fueron desplazadas a campo bajo, por el grupo éster que ejerció un efecto desprotector sobre estos protones. Adicionalmente, se observaron dos señales simples de metilo (δ_H 2.02 y 2.00), característicos de un éster (acetato). El análisis de los experimentos HSQC, HMBC, COSY y NOESY permitieron asignar las señales de los hidrógenos restantes y de sus correspondientes carbonos de la estructura **53**.

7.4.4. Oxidación de 1 β -hidroxifriedelina (45)

El tratamiento del compuesto **45** (suspendido en THF) con el reactivo de Jones, generó el producto deseado. Los datos espectroscópicos y espectrométricos se compararon con los de la literatura [55,56]. A continuación se describe brevemente la evidencia espectroscópica de este compuesto.

El espectro de IR de **54** mostró dos bandas de absorción para carbonilo en 1728 y 1704 cm^{-1} . El análisis del espectro de RMN ^{13}C evidenció la presencia de dos carbonilos en δ_C 204.1 y 202.7, y en el espectro de RMN 1H se observaron dos señales dobles (δ_H 3.45 y 3.25, $J = 16.0$, Hz) desplazados a campo bajo, que fueron asignados al metileno del anillo A del triterpeno **54**.

7.4.5. Preparación de la 3-oxima-1 β -hidroxifriedelina (55)

El tratamiento de 1 β -hidroxifriedelina (**45**) con NH₂OH:HCl en piridina y etanol absoluto, produjo el nuevo compuesto **55** en buen rendimiento. A continuación se mencionan algunos datos espectroscópicos que evidencian la formación de este compuesto.

La fórmula molecular C₃₀H₅₂O₂N fue asignada a **55** mediante EMAR-FAB [M + H]. El espectro de IR exhibió bandas de absorción en 3611, 3289, 1674, 1460 y 1385 cm⁻¹. El análisis del espectro de RMN ¹³C (Espectro 22), junto con el experimento DEPT, mostró un carbono cuaternario (δ_C 166.6) unido a nitrógeno y un metino unido a oxígeno (δ_C 68.1), el cual concuerda con la señal simple desplazada a campo bajo, que se observó en el espectro de RMN ¹H (Espectro 23), y que fue asignada a un protón carbinólico (δ_H 4.66). Las señales restantes de carbono e hidrógeno de **55** se asignaron de acuerdo al análisis de los experimentos HSQC, HMBC, COSY y NOESY.

7.4.6. Preparación de la 3,4-lactama de 1 β -hidroxifriedelina (**56**).

La reacción de **55** con cloruro de *p*-toluensulfonilo en piridina, produjo el compuesto **56** en buenos rendimientos. La evidencia espectroscópica de este compuesto se menciona a continuación.

La fórmula molecular C₃₀H₅₂O₂N fue asignada al compuesto novedoso **56** mediante EMAR-FAB [M + H]. En el espectro de IR se observaron dos bandas de absorción en 3257 y 1667 cm⁻¹ para un grupo hidroxilo y un carbonilo característico de una lactama respectivamente. El análisis de los espectros de RMN ¹³C (Espectro 24) y ¹H (Espectro 25) y en adición con los experimentos HSQC, HMBC, COSY y NOESY, indicaron la presencia de un carbonilo (δ_C 177.4) y un metino unido a oxígeno (δ_C 64.7), que está de acuerdo con la señal de un protón carbinólico (δ_H 4.61). Las señales restantes de carbono e hidrógeno de la estructura se asignaron en base a los experimentos antes mencionados.

7.4.7. Oxidación de 1 β -hidroxifriedelina con ácido *m*-cloroperbenzoico (AMCPB)

El tratamiento de 1 β -hidroxifriedelina (**45**) con AMCPB en cloroformo dio como resultado tres productos minoritarios. Se generó el producto deseado **57**, el producto de deshidratación **58** y el producto inesperado **59**, el cual se generó a partir de **58**, mediante un mecanismo de competencia entre la deshidratación y oxidación del mismo. A continuación se mencionan algunas evidencias espectroscópicas para dichos compuestos.

La fórmula molecular $C_{30}H_{51}O_3$ fue establecida para el compuesto **57** mediante EMAR-FAB [M + H]. Su espectro de IR mostró absorciones de carbonilo (1720 cm^{-1}) e hidroxilo (3364 cm^{-1}). El análisis de los espectros de RMN ^{13}C (Espectro 26) y 1H (Espectro 27), evidenciaron la presencia de un carbonilo ($\delta_C 172.6$) y de un carbono unido a oxígeno ($\delta_C 65.5$), así como una señal simple ancha desplazada a campo bajo ($\delta_H 4.66$), que se asignó a un protón carbinólico.

Los datos espectroscópicos del compuesto **58**, se compararon con los de la literatura [57,58]. A continuación se mencionaran algunos de ellos que evidenciaron la presencia de este compuesto. Los espectros de RMN 1H y ^{13}C muestran la presencia de un carbonilo ($\delta_C 201.9$) y un doble enlace ($\delta_C 149.1$ y 130.1) que concuerda con las señales de dos protones vinílicos ($\delta_H 6.93$, dd, $J = 2.0, 10.3$ Hz y 6.05 , dd, $J = 3.0, 10.3$ Hz).

Al compuesto **59** se le asignó la fórmula molecular $C_{30}H_{48}O_2$ mediante EMAR-FAB [M⁺]. Su espectro de IR mostró absorciones de doble enlace (1674 cm^{-1}) e hidroxilo (3578 cm^{-1}). El análisis del espectro de RMN ^{13}C (Espectro 28), en adición con el experimento DEPT, mostró un carbonilo ($\delta_C 198.3$), un carbono cuaternario unido a oxígeno ($\delta_C 78.4$) y un doble enlace ($\delta_C 150.7$ y 127.4). Por otro lado, el espectro de RMN 1H (Espectro 29) exhibió protones vinílicos en $\delta_H 6.93$ (dd, $J = 2.0, 10.3$ Hz) y 6.05 (dd, $J = 3.0, 10.3$ Hz).

Las señales restantes de carbono e hidrógeno de los compuestos **57** y **59** se asignaron de acuerdo al análisis de los experimentos HSQC, HMBC, COSY y NOESY.

7.5. Determinación de la actividad citotóxica de los derivados

Los derivados obtenidos se evaluaron mediante el ensayo de sulforrodamina B frente a seis líneas celulares de cáncer humano, los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Actividad citotóxica de **51-59**

Derivados	Líneas celulares cancerosas humanas					
	U251 (SNC)	PC3 (próstata)	K562 (leucemia)	HCT15 (colon)	MCF7 (pecho)	SKLU (pulmón)
51	52.38	25.38	18.21	15.98	28.84	41
52	13.55	3.88	s.a.	s.a.	14.31	s.a.
53	s.a.	s.a.	s.a.	s.a.	s.a.	s.a.
54	13.8	13.8	21.52	13.74	16.28	45.7
55	30.33	1.12	s.a.	s.a.	s.a.	s.a.

56	7.4	s.a.	s.a.	s.a.	s.a.	s.a.
57	27.37	11.19	7.28	1.49	2.74	s.a.
58	20.63	25.38	s.a.	13.62	26.28	62.2
59	53.10	s.a.	49.15	59.83	10.4	s.a.

Valores expresados en porcentaje de inhibición de la proliferación celular. Conc. 50 μ M. s.a.: sin actividad

Los derivados **51**, **58** y **59** presentaron el mayor porcentaje de inhibición de la proliferación de las células cancerígenas, por lo tanto se procedió a determinar sus concentraciones inhibitorias medias. En la Tabla 5 se ilustran las CI_{50} de los compuestos **51** y **59**.

Tabla 5. CI_{50} (μ M) de **51** y **59**

compuesto	U251	compuesto	HCT-15
51	22.76 \pm 1.7	59	41.78 \pm 1.1
adriamicina ^a	0.32 \pm 0.02		0.23 \pm 0.02

^a control positivo. Los resultados son el promedio \pm E.E.M.

El compuesto **51** presentó mayor citotoxicidad (menor concentración) en comparación con el derivado **59**. Ambos compuestos exhibieron actividad citotóxica marginal cuando se compararon con el control positivo. Cabe mencionar que el compuesto **58** también fue evaluado pero los resultados presentaron variaciones significativas, probablemente por la descomposición del mismo.

8. SECCIÓN EXPERIMENTAL

El análisis químico de las especies selectas de la familia Euphorbiaceae se llevó a cabo por la metodología general ilustrada en el Diagrama 1.

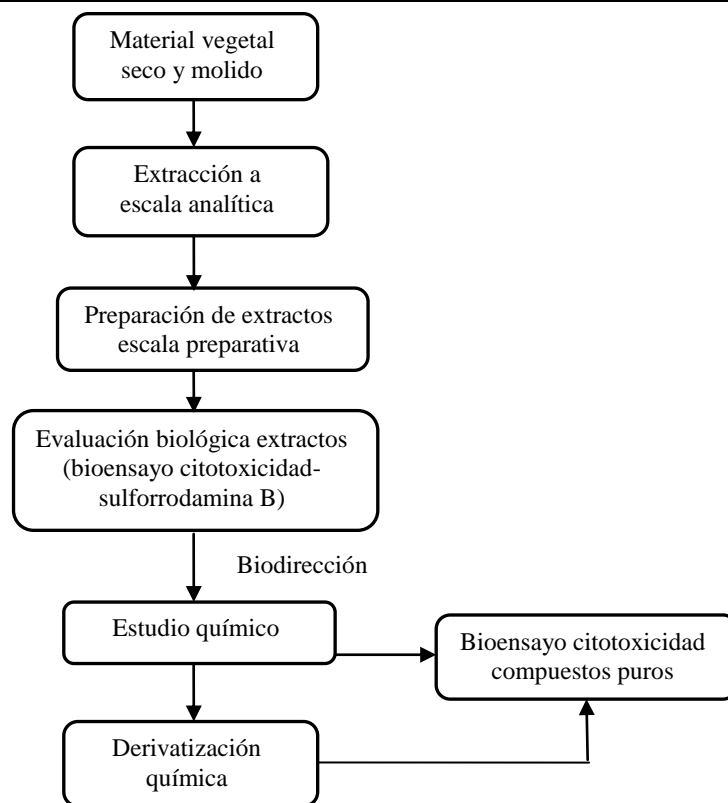


Diagrama 1. Metodología general

8.1 Material y equipo

La separación de los constituyentes químicos presentes en los extractos orgánicos de *G. parviflora*, así como de los derivados, se llevó a cabo mediante técnicas cromatográficas, tales como: cromatografía en columna a presión reducida (CCPR), cromatografía en columna a gravedad (CCG), cromatografía de capa fina (CCF), cromatografía de capa fina preparativa (CCFP) y cromatografía de placa preparativa (CPP). Los procesos cromatográficos tuvieron como fase estacionaria sílica gel (SiO_2) de 60 o 40 Å, marca Macherey-Nagel, y malla 70/230 y 230/400 ASTM. Los disolventes que se emplearon como fase móvil fueron *n*-hexano, acetato de etilo, acetona, diclorometano, cloroformo, benceno y metanol en distintas proporciones. El seguimiento del proceso cromatográfico de las columnas y la pureza de los constituyentes químicos aislados se efectuó en cromatofolios de sílica gel marca Merck 60 F₂₅₄. Como reveladores se utilizaron una lámpara de rayos UV Spectroline ENF-240C (λ de 254 y 365 nm) y una solución de sulfato cérico amoniacal $(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4$ al 1 % en ácido sulfúrico 2N. La cromatografía en capa fina preparativa y analítica se realizó en placas preparativas Merck (2 mm y 0.20 mm de grosor respectivamente y una superficie de 20 x 20 cm). Los puntos de fusión se determinaron en un

aparato *Fisher Johns* y no fueron corregidos. Los espectros de infrarrojo se obtuvieron en un espectrofotómetro *FT-IR Bruker Tensor 750* en solución de CHCl_3 y pastilla de KBr. Los espectros en el UV fueron determinados en un espectrofotómetro *Shimadzu-UV160*. La determinación de la rotación óptica (RO) se realizó en un polarímetro *Perking-Elmer 341*. El espectro de dicroísmo circular (DC) fue determinado en un dicrógrafo *Jasco J-720*. Los espectros de masas por impacto electrónico se obtuvieron en un espectrómetro *Jeol JMS-AX505HA* con un potencial de ionización de 70 eV y una corriente de ionización de $100\mu\text{a}$ y para la técnica de ionización por bombardeo rápido de átomos (FAB^+) se utilizó un *Jeol JMX-SX102A*. Los espectros de RMN ^1H y ^{13}C , fueron llevados a cabo en los espectrómetros: *Varian Unity 300* (a 300/75 MHz) y *Varian Inova 500* (a 500/125 MHz). Los espectros fueron obtenidos en cloroformo deuterado (CDCl_3), dimetil sulfóxido deuterado ($\text{DMSO}-d_6$) y metanol deuterado (CD_3OD) y como estándar interno se empleó tetrametilsilano (TMS). Los valores de desplazamiento químico de los núcleos observados están registrados en ppm. Se realizaron experimentos bidimensionales de RMN como COSY, NOESY, DEPT, HMQC y HMBC para la asignación de cada señal de los productos naturales y derivados novedosos. El análisis por difracción de rayos X fue realizado mediante un difractor automático *Bruker Smart Apex* con un detector de área CCD y usando radiación monocromada de grafito Mo $\text{K}\alpha$ ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$).

8.2 Ensayo de citotoxicidad. Método de la sulforrodamina B (SRB)

La citotoxicidad de los extractos, compuestos puros y derivados frente a un conjunto de células tumorales fue determinada empleando el ensayo de proliferación celular mediante el método colorimétrico de la sulforrodamina B (SRB, colorante de unión a proteínas) [59]. Las líneas celulares de tumores humanos, pecho (MCF-7), colon (HCT-15), sistema nervioso central (U-251 Glía), leucemia (K-562 CML) y próstata (PC-3), fueron proporcionadas por el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos de América. Las líneas celulares fueron cultivadas en el medio RPMI-1640 (Sigma Chemical Co., Ltd., St. Louis, MO, USA), enriquecido con Suero Bovino Fetal al 10%, 2 μM de L-glutamina, 100 IU/mL de penicilina G, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de sulfato de estreptomicina y 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anfotericina B (Gibco). Se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO_2 y 95 % de humedad. Para realizar el ensayo, se tomaron suspensiones celulares de 5×10^4 células/mL (K562 y MCF-7); 7.5×10^4 células/mL (U251, PC-3 y SKLU-1); y 10×10^4 células/mL (HCT-15). Se sembraron 100 μL de las suspensiones celulares en los pozos de un microplato (96 pozos) y se

incubaron para fijar las células a las paredes del pozo. Después de 24 h de incubación se adicionaron 100 μ L de cada muestra y de la sustancia usada como control positivo. Transcurridas 48 h de haber agregado las sustancias a probar, las células adheridas fueron fijadas *in situ* mediante la adición de 50 μ L de ácido tricloroacético (ATCA) frío al 50 % (*peso/vol*) y se incubaron una vez más a 4 °C por 60 min. El sobrenadante fue desechado y los platos fueron lavados tres veces con agua destilada y posteriormente se secaron con aire. Los cultivos fijados con ATCA fueron coloreados con 100 μ L de una solución de SRB al 0.4% por 30 min. El colorante unido a proteínas se extrajo con 10 μ M de una base sin búfer. Las densidades ópticas de las soluciones coloreadas que fueron extraídas se leyeron en un Lector Ultra de Microplatos (*Elx 808, Bio-Tek Instruments, Inc.*), a una longitud de onda de 515 nm. Los resultados fueron expresados como porcentaje de inhibición de la proliferación celular y como concentraciones inhibitorias medias (CI_{50}), los cuales se calcularon de acuerdo al protocolo de Monks [59], es decir, la curva dosis-respuesta fue graficada para cada sustancia y la concentración CI_{50} obtenida fue estimada mediante las ecuaciones de una regresión lineal. Los valores de CI_{50} para las sustancias están reportados como la media \pm error estándar y se encuentran mostrados en las Tablas de la sección de discusión de resultados.

8.3 Colecta del material vegetal

La colecta del material vegetal (hojas y ramas) se realizó en los estados de Chiapas y Veracruz, con la asesoría del Biólogo Esteban Martínez. El Biól. Esteban Martínez y el Sr. Francisco Ramos Marchena del Instituto de Biología de la UNAM, identificaron las especies vegetales. Un espécimen de cada especie colectada se depositó en el Herbario Nacional de la UNAM. En la Tabla 6, se muestran las especies colectadas. Las especies se seleccionaron de acuerdo al criterio quimiotaxonómico y a la disponibilidad de las mismas.

8.4 Preparación de los extractos

Los vegetales fueron secados a la sombra, pulverizados y macerados en pequeña escala (*ca.* 30 g) con disolventes de diferente polaridad: no polar (hexano), polaridad media (acetato de etilo) y polar (metanol). Se comparó el perfil químico entre los extractos orgánicos de cada especie mediante cromatografía de capa delgada, en donde se observaron diferencias entre los constituyentes de cada extracto, por lo que se emplearon estos tres disolventes como sistemas de extracción (ver Tabla 6).

Tabla 6. Especies vegetales selectas

Especie vegetal (material seco kg)	Localidad	Parte colectada	Extracto (g)		
			<i>n</i> -hexano	AcOEt	MeOH
<i>Garcia parviflora</i> Lundell (5.7)	Zacatal, Veracruz (1104455) ^a	Hojas/ramas	27.7	57.4	54.0
<i>Sapium macrocarpum</i> Müll. Arg. (2.2)	Arriaga, Chiapas (EM ^b 39273)	Hojas/ramas	53.0	40.0	73.7
<i>S. glandulosum</i> Croizat (1.5)	Río Lacanjá, Chiapas (EM ^b 39259)	Hojas/ramas	35.5	12.5	18.1
<i>S. nitidum</i> (Monachino.) Lundell (0.596)	Nueva Palestina, Chiapas (EM ^b 39268)	Hojas/ramas	20.6	---	8.1
<i>S. lateriflorum</i> Hemsley (1.1)	San Juan Chancalaito, Chiapas (EM ^b 39267)	Hojas/ramas	45.5	17.2	28.1

^aHerbario Nacional de la UNAM (MEXU), ^bClave del Biól. Esteban Martínez

8.5 Material vegetal selecto

La especie vegetal *Garcia parviflora* se colectó en abril del 2003, en la laguna El Zacatal, ubicada después de tomar el camino a la terracería que va del pueblo La Palma al poblado Lázaro Cárdenas (Estado de Veracruz, México), la especie fue identificada por Francisco Ramos Marchena del Instituto de Biología de la UNAM. Una muestra del material colectado se depositó en el Herbario Nacional de la UNAM, con número de registro: MEXU-1104455.

Garcia parviflora pertenece a la subfamilia Crotonoideae, a la tribu Aleuritideae y a la subtribu Garcinae. Es una planta neotropical endémica de México, que se encuentra como arbusto o árbol pequeño (3-4 m). Presenta hojas alternas simples, inflorescencias terminales bisexuales en cimas reducidas con 1-2 flores pistiladas, flor estaminada pedicelada, fruto en cápsula y semillas subglobosas. Se distribuye desde México hasta Colombia [60]. Cabe mencionar que hasta el momento esta especie vegetal no ha sido estudiada químicamente.

8.6. Extracción y aislamiento

Las hojas y ramas secas y pulverizadas (5.7 Kg) se maceraron a temperatura ambiente con *n*-hexano (24 L × 3), acetato de etilo (24 L × 3) y metanol (24 L × 3). Los macerados se concentraron a presión reducida, para obtener 27.7, 57.4 y 54 g de residuo vegetal respectivamente.

El extracto hexánico (27.7 g) se disolvió en CH₂Cl₂ se adsorbió en 30 g de sílica gel capa fina y se colocó en una columna de vidrio empacada con sílica gel 60 F₂₅₄ (90 g), la cual se eluyó con *n*-hexano, con mezclas de *n*-hexano-acetato de etilo en orden creciente de polaridad. Los eluatos colectados (100 mL) se analizaron mediante cromatografía en capa fina (CCF) y se reunieron de acuerdo a su similitud cromatográfica, lo que permitió la obtención de 7 fracciones principales (F₁-F₇). La F₃ (38.0 mg) se separó por cromatografía de capa fina preparativa (CCFP) empleando como fase móvil una mezcla de benceno-AcOEt (9:1), de este proceso cromatográfico se obtuvieron el ácido 1,2-dehidro-2,3-secofriedelina-3-oico (**41**, 25 mg) y el ácido acetyl aleuritólico (**42**, 8 mg). La F₄ (186 mg) se procesó por cromatografía en columna por gravedad (CCG), la columna fue eluida con mezclas de *n*-hexano:AcOEt de polaridad creciente, de esta cromatografía se obtuvieron cinco subfracciones totales. El residuo vegetal de la subfracción 3 (87 mg) se aplicó a una placa preparativa, la cual se eluyó con una mezcla de benceno-AcOEt (98:2), la extracción de los compuestos se llevó a cabo con una mezcla de CH₂Cl₂-AcOEt (90:10), como resultado de la cromatografía se obtuvieron los compuestos **41** (50 mg), 3,4-lactona de friedelina (**43**, 6 mg) y β-sitosterol (**44**, 19 mg) (ver Figura 2).

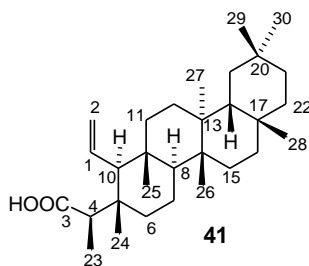
El extracto de acetato de etilo fue suspendió en acetona, se filtró y se lavó con una mezcla de hexano-AcOEt (1:1). Mediante este procedimiento se obtuvieron agujas cristalinas parcialmente solubles en CHCl₃ caliente, correspondientes a 1β-hidroxifriedelina (**45**, 2.0 g). El filtrado fue evaporado a sequedad y el residuo (55.0 g) fue procesado por cromatografía en columna a presión reducida (CCPR), el residuo fue adsorbido en 60 g de sílica gel de capa fina y depositado en una columna empacada con sílica gel (350 g), la cual fue eluida con mezclas de *n*-hexano, *n*-hexano-AcOEt y AcOEt-MeOH de polaridad creciente. Los eluatos obtenidos fueron reunidos de acuerdo a su similitud en CCF, lo que permitió la obtención de once fracciones principales. La fracción 2 (1.48 g) fue resuelta en sus componentes por CCG empacada con sílica gel 230-400, la columna fue eluida con mezclas de *n*-hexano-AcOEt y como resultado de la separación se obtuvieron 8 subfracciones (8.1–8.8). La subfracción 8.6 (82 mg) fue purificada por CCFP, la cual fue eluida con una mezcla de tolueno-AcOEt (7:3) y como resultado se obtuvo un aceite amarillo que corresponde al compuesto fenólico elemicina (**46**, 63 mg). La fracción 6 (3.7 g) fue adsorbida en 4.0 g de celita, la cual fue aplicada a una columna cromatográfica empacada con 100 g de sílica 230-400 y eluida con un gradiente de *n*-hexano-AcOEt de la cual se obtuvieron 13 subfracciones (13a-13m). La subfracción 13g (0.97 g) fue adsorbida en 1 g de celita y procesada mediante CCG (empacada con

10 g de sílica gel 230-400), la columna fue eluida con una mezcla de *n*-hexano-AcOEt de polaridad creciente, de esta cromatografía se obtuvieron 7 fracciones. La fracción 13g-4 (46 mg) fue aplicada a una placa preparativa de capa fina (cromatofolio) y se eluyó con una mezcla de *n*-hexano-AcOEt (6:4), de este procedimiento se obtuvieron cristales incoloros correspondientes al 4-hidroxi-5-propionil-1,3-di-*O*-metilpirogalol (**47**, 36.8 mg). La subfracción 13i (0.38 g) fue suspendida en una mezcla de hexano-CH₂Cl₂ (1:1), la suspensión fue filtrada y los sólidos obtenidos fueron lavados con la misma mezcla de disolventes y cristalizados a partir de CHCl₃-MeOH, para obtener sólidos cristalinos parcialmente solubles en la mezcla antes mencionada que corresponden al compuesto **48** (7.8 mg) (ver Figura 4).

El extracto metanólico (54 g) fue resuelto en sus componentes mediante CCG, empacada con sílica gel 230-400 y eluida con mezclas de *n*-hexano-AcOEt y AcOEt-MeOH de polaridad creciente, de este proceso se obtuvieron 15 fracciones principales. La fracción F₁₃ (152 mg) fue purificada por CCFP, empleando como fase móvil *n*-hexano-AcOEt-MeOH (40:55:5), de este procedimiento se obtuvo un aceite amarillo (43 mg), que fue purificado por cromatografía analítica de capa fina (cromatofolio). El sistema de elución consistió en una mezcla de CH₂Cl₂-AcOEt-MeOH (80:15:5) de este proceso cromatográfico se aisló (-)-siringaresinol (**49**, 21 mg). A partir de la última fracción se obtuvieron sólidos blancos amorfos que fueron lavados con metanol y filtrados los cuales corresponden al β-*D*-glucopiranosido de β-sitosterilo (**50**, 10 mg) (ver Figura 7).

8.7. Características físicas y espectroscópicas de los productos naturales

Ácido 1,2-dehidro-2,3-secofriedelan-3-oico (**41**)



Sólido blanco (25 mg)

R_f : 0.45 (*n*-hexano/AcOEt 75:25)

Pf : 205-208°C

[α]_D²⁵ +16.8 (*c* 0.095, CHCl₃).

IR (KBr) ν_{\max} : 3375, 2928, 2860, 1693, 1463, 1388, 1231, 1079, 1007, 919, 674 cm^{-1} .

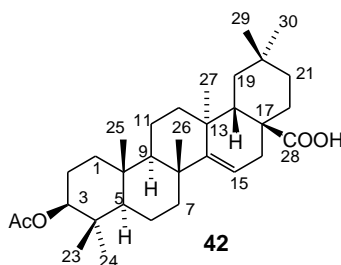
RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): δ 5.74 (ddd, $J = 17.0, 10.5, 10.0$ Hz, H-1), 5.13 (dd, $J = 10.0, 2.5$ Hz, H-2_{cis}), 4.98 (dd, $J = 17.0, 2.5$ Hz, H-2_{trans}), 2.48 (c, $J = 7.0$ Hz, H-4), 1.72 (d, $J = 10.5$ Hz, H-10), 1.64 (ddd, $J = 13.5, 3.5, 3.0$ Hz, H-6a), 1.55 (señal traslapada, H-16a), 1.53 (señales traslapadas, H-6b, H-18), 1.50 (señal traslapada, H-15a), 1.49 (m, H-22a), 1.47 (señal traslapada, H-7), 1.46 (señal traslapada, H-21a), 1.36 (señales traslapadas, H-16b, H-19a), 1.30 (señal traslapada, H-15b), 1.28 (m, H-12a), 1.25 (señal traslapada, H-21b), 1.20 (señal traslapada, H-8), 1.19 (señales traslapadas, H-11a, H-19b), 1.17 (s, H-28), 1.14 (m, H-11b), 1.11 (s, H-24), 1.09 (d, $J = 7.0$ Hz, H-23), 1.02 (s, H-27), 0.995 (s, H-26), 0.990 (s, H-29), 0.95 (s, H-25), 0.94 (s, H-30), 0.93 (señal traslapada, H-22b).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz): δ 179.5 (C-3), 135.2 (C-1), 118.7 (C-2), 60.6 (C-10), 52.4 (C-8), 47.8 (C-4), 42.8 (C-18), 39.7 (C-13), 39.3 (C-22), 38.6 (C-5), 38.5 (C-14), 37.0 (C-9), 36.6 (C-11), 36.0 (C-16), 35.3 (C-19), 34.9 (C-30), 34.3 (C-6), 32.8 (C-21), 32.3 (C-15), 32.1 (C-28), 31.8 (C-29), 30.3 (C-12), 30.0 (C-17), 28.2 (C-20), 20.8 (C-24), 20.3 (C-26), 18.9 (C-25), 18.7 (C-27), 17.7 (C-7), 11.7 (C-23).

EM-IE $^+$ m/z (% intensidad relativa): 442 [$\text{M}]^+$ (31), 427 (32), 245 (39), 205 (96), 191 (55), 163 (49), 137 (53), 109 (79), 95 (100), 69 (81), 57 (61), 43 (40), 29 (7).

EMAR-FAB $^+$ m/z : Observado [$\text{M} + \text{H}]^+$ 443.3886; Calculado:443.3889, $\text{C}_{30}\text{H}_{51}\text{O}_2$.

Ácido acetil aleuritólico (42) [42,43]



Sólido blanco (8 mg)

R_f : 0.55 (*n*-hexano/AcOEt 80:20)

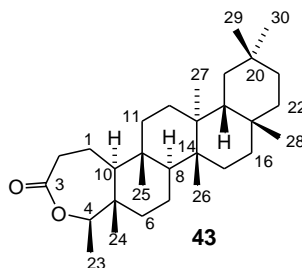
Pf : > 300 °C

IR (KBr) ν_{\max} 3049, 2940, 2863, 1730, 1687, 1468, 1370, 1297, 1247, 1213, 1025, 755 cm^{-1}

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz): δ 5.52 (dd, *J* = 8.0, 3.5 Hz, H-15), 4.46 (dd, *J* = 10.5, 5.5 Hz, H-3α), 2.04 (s, OCO-CH₃), 2.37 (dd, *J* = 14.5, 8.0 Hz, H-16a), 2.28 (dd, *J* = 14.0, 2.5 Hz, H-18), 1.97 (ddd, *J* = 12.5, 3.5, 3.0 Hz, H-7a), 1.93 (dd, *J* = 14.5, 3.5 Hz, H-16b), 0.85 (s, H-23), 0.88 (s, H-24), 0.952 (s, H-25), 0.957 (s, H-26), 0.923 (s, H-27), 0.94 (s, H-29), 0.92 (s, H-30).

RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz): δ 183.5 (-COOH), 170.9 (OCO-CH₃), 160.6 (C-14), 116.8 (C-15), 80.9 (C-3), 55.6 (C-5), 51.4 (C-17), 49.1 (C-9), 41.5 (C-18), 40.8 (C-7), 39.0 (C-8), 37.9 (C-10), 37.7 (C-4), 37.4 (C-13), 37.3 (C-1), 35.4 (C-19), 33.7 (C-21), 33.3 (C-12), 31.9 (C-29), 31.4 (C-16), 30.7 (C-22), 29.7 (C-15), 29.3 (C-20), 28.6 (C-30), 27.9 (C-23), 26.1 (C-26), 23.5 (C-2), 22.4 (C-27), 21.3 (OCO-CH₃), 18.7 (C-6), 17.3 (C-11), 16.6 (C-24), 15.6 (C-25).

3,4-lactona de friedelina (43) [44,45]



Sólido blanco (6 mg)

R_f : 0.50 (*n*-hexano/AcOEt 75:25)

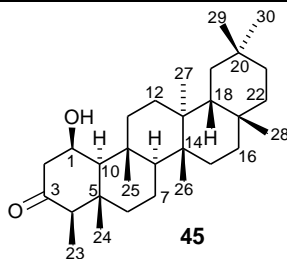
Pf : 270-272 °C

IR (KBr) ν_{max} 3001, 2930, 2866, 1727, 1465, 1390, 1296, 1185, 1072, 750 cm⁻¹

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz): δ 4.21 (c, *J* = 6.5 Hz, H-4), 2.63 (ddd, *J* = 14.0, 7.0, 1.5 Hz, H-2ec), 2.51 (ddd, *J* = 14.0, 13.0, 2.0 Hz, H-2ax), 1.92 (m, H-1a), 1.12 (dd *J* = 12.0, 2.5 Hz, H-10), 1.17 (s, H-28), 0.89 (s, H-24), 1.20 (d, *J* = 6.0 Hz, H-23), 1.01 (s, H-27), 0.996 (s, H-26), 0.991 (s, H-29), 0.84 (s, H-25), 0.94 (s, H-30).

RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz): δ 175.5 (C-3), 84.9 (C-4), 64.0 (C-10), 52.8 (C-8), 42.8 (C-18), 40.8 (C-5), 39.4 (C-13), 39.2 (C-22), 38.5 (C-6), 38.4 (C-14), 38.2 (C-9), 35.9 (C-19), 35.4 (C-16), 35.3 (C-11), 35.0 (C-30), 34.4 (C-2), 32.7 (C-21), 32.4 (C-15), 32.1 (C-28), 31.7 (C-29), 30.6 (C-12), 29.7 (C-17), 28.2 (C-20), 20.2 (C-26), 18.6 (C-1, C-27), 18.0 (C-7), 17.9 (C-25), 16.2 (C-23), 13.4 (C-23).

1β-Hidroxifriedelina (45)



Agujas transparentes (2g)

R_f : 0.45 (*n*-hexano/AcOEt 70:30)

Pf :> 300 °C

$[\alpha]_D^{25}$ -38.0 (*c* 0.1, CHCl₃)

UV (CHCl₃) λ_{max} (log ϵ) 243 (2.42) nm

DC (CHCl₃) λ_{max} $\Delta\epsilon_{295}$ - 50.41.

IR (KBr) ν_{max} 3370, 2938, 2865, 1704, 1454, 1384, 1235, 1174, 1121, 1024, 917, 651 cm⁻¹.

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz a 50°C): δ 4.84 (sa, H-1), 2.66 (dd, *J* = 14.0, 4.5 Hz, H-2a), 2.38 (dd, *J* = 14.0, 2.5 Hz, H-2b), 2.30 (c, *J* = 6.5 Hz, H-4), 1.78 (ddd, *J* = 13.5, 3.5, 3.5 Hz, H-6a), 1.64 (ddd, *J* = 13.0, 3.0, 3.0 Hz, H-11a), 1.58 (dd, *J* = 11.0, 6.0 Hz, H-18), 1.55 (señal traslapada, H-15a), 1.50 (señales traslapadas, H-21a, H-22a), 1.47 (sa, H-10), 1.39 (m, H-12a), 1.33 (señal traslapada, H-8), 1.31 (s, H-25), 1.29 (m, H-15b), 1.19 (s, H-28), 1.08 (s, H-24), 1.05 (s, H-27), 1.04 (s, H-26), 1.01 (s, H-29), 0.96 (s, H-30), 0.94 (d, *J* = 6.0 Hz, H-23, señal traslapada, H-22b).

RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz a 50°C): δ 211.3 (C-3), 71.4 (C-1), 61.6 (C-10), 59.1 (C-4), 53.9 (C-8), 52.7 (C-2), 43.9 (C-5), 43.0 (C-18), 39.8 (C-13), 39.3 (C-22), 38.6 (C-9), 38.5 (C-14), 36.2 (C-16), 35.7 (C-11), 35.5 (C-19), 34.9 (C-30), 34.3 (C-6), 33.0 (C-21), 32.7 (C-15), 32.2 (C-28), 31.8 (C-29), 30.4 (C-12), 30.1 (C-17), 28.2 (C-20), 20.2 (C-26), 19.2 (C-25), 18.8 (C-7), 18.7 (C-27), 17.4 (C-24), 6.9 (C-23).

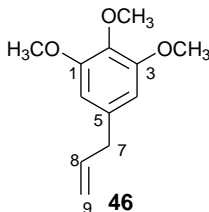
EM- IE⁺ *m/z* (% intensidad relativa): 442 [M]⁺ (5), 424 (4), 344 (100), 289 (7), 258 (41), 230 (14), 205 (11), 193 (77), 184 (22), 135 (39), 129 (27), 90 (33), 77 (20), 57 (50), 18 (57).

EMAR-FAB⁺ *m/z*: Observado: [M + H]⁺ 443.3884; calculado: 443.3889 C₃₀H₅₁O₂.

Análisis de Rayos X . Todos los datos fueron colectados en un difractómetro Bruker Smart Apex CCD utilizando 2.01 θ -25.44 θ a 173(2) K. El compuesto pertenece al sistema

ortorómbico, grupo espacial $P2_12_12_1$ con $a=6.230(3)$ Å, $\alpha=90^\circ$; $b=14.029(8)$ Å, $\beta=90^\circ$; $c=29.261(16)$ Å, $\gamma=90^\circ$. Los métodos de refinamiento fueron matrices de mínimos cuadrados sobre F^2 [54].

Elemicina (46) [47,48]



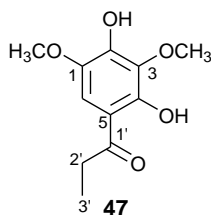
Aceite amarillento (63 mg)

R_f : 0.48 (*n*-hexano/AcOEt 85:15)

RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): δ 6.41 (s, H-4, H-6), 5.11 (dd, $J = 17.0, 2.0$ Hz, H-9a), 5.08 (dd, $J = 10.0, 2.0$ Hz, H-9b), 3.95 (dddd, $J = 17.0, 10.0, 7.0, 6.5$ Hz, H-8), 3.85 (s, OCH_3 -1, OCH_3 -3), 3.83 (s, OCH_3 -2), 3.34 (dd, $J = 6.75, 1.0$ Hz, H-7a), 3.32 ($J = 6.75, 1.0$ Hz, H-7b).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz): δ 153.2 (C-1, C-3), 137.2 (C-8), 136.5 (C-2), 135.7 (C-5), 115.9 (C-9), 105.6 (C-4, C-6), 60.8 (OCH_3 -2), 56.1 (OCH_3 -1, OCH_3 -3), 40.5 (C-7).

4-Hidroxi-5-propionil-1,3-di-*O*-metilpirogallol (47) [49]



Cristales incoloros (36.8 mg)

R_f : 0.52 (*n*-hexano/AcOEt 50:50)

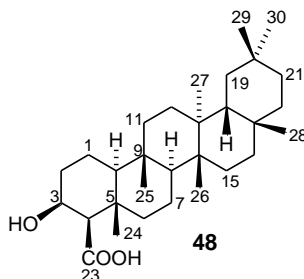
P_f : 123-124 °C

IR (KBr) ν_{max} 3507, 3039, 2940, 1632, 1616, 1500, 1451, 1293, 1241, 1193, 1172, 1108, 1074, 1013, 843 cm^{-1} .

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): δ 7.28 (s, H-6), 4.00 (s, OCH_3), 3.91 (s, OCH_3), 2.97 (c, $J = 7.2$ Hz, H-2'), 1.26 (t, $J = 7.2$ Hz, H-3').

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz): δ 205.4 (C-1'), 152.8 (C-1), 146.0 (C-4), 139.9 (C-2), 135.2 (C-3), 111.2 (C-5), 106.3 (C-6), 60.8 (OCH_3^-), 56.8 (OCH_3^-), 31.4 (C-2'), 8.4 (C-3').

Ácido 3 β -hidroxifriedelan-23-oico (48)



Cristales blancos (7.8 mg)

R_f : 0.51 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 90:10)

Pf: 237-240 °C

$[\alpha]_D^{25} +37.7$ (c 0.13 CHCl_3)

IR (KBr) ν_{max} 3508, 3421, 3192, 2934, 2867, 1717, 1453, 1385, 1235, 1188, 1002, 687 cm^{-1} .

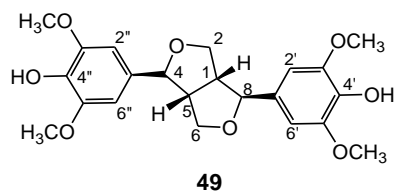
RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): δ 4.15 (ddd, $J = 2.5, 2.5, 2.5$ Hz, H-3), 2.20 (d, $J = 2.5$ Hz, H-4), 1.94 (m, H-2a), 1.76 (da, $J = 12.5$ Hz, H-6a), 1.64 (ddd $J = 13.0, 3.0, 3.0$ Hz, H-11a), 1.58 (dd, $J = 11.0, 6.0$ Hz, H-18), 1.57 (dd, $J = 11.0, 6.0$ Hz, H-18, señal traslapada, H-16a.), 1.52 (m, H-15a), 1.50 (señales traslapadas, H-1, H-2b, H-21a), 1.49 (señal traslapada, H-22a), 1.45 (señales traslapadas, H-7, H-11a), 1.38 (señal traslapada, H-19a), 1.37 (señal traslapada, H-6b), 1.36 (señales traslapadas, H-8, H-16b), 1.34 (m, H-12a), 1.31 (m, H-15b), 1.28 (m, H-21b), 1.22 (dd, $J = 14.0, 6.0$ Hz, H-19b), 1.19 (s, H-24, H-28), 1.04 (s, H-27), 1.01 (s, H-26), 1.00 (s, H-29), 0.98 (sa, H-10), 0.95 (s, H-30), 0.94 (señal traslapada, H-22b), 0.89 (s, H-25).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz): δ 177.8 (C-23), 68.2 (C-3), 61.0 (C-10), 59.5 (C-4), 53.7 (C-8), 43.4 (C-18), 42.9 (C-6), 40.2 (C-13), 39.7 (C-22), 38.8 (C-14), 38.5 (C-5), 37.9 (C-9), 36.5 (C-16), 36.0 (C-11), 35.8 (C-19), 35.2 (C-30), 33.5 (C-2), 33.3 (C-21), 32.8 (C-15), 32.4 (C-29), 32.2 (C-28), 31.0 (C-12), 30.5 (C-17), 28.5 (C-20), 20.4 (C-26), 18.9 (C-27), 18.43 (C-25), 18.40 (C-24), 18.0 (C-7), 16.0 (C-1).

EM-FAB $^+$ m/z 459 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (2), 441 (3), 391 (4), 307 (11), 289 (13), 165 (22), 154 (80), 136 (72), 107 (40), 77 (100), 63 (56), 39 (62), 27 (32), 14 (8).

EMAR-FAB $^+$ m/z : Observado $[\text{M} + \text{H}]^+$ 459.3841; calculado: 459.3838 $\text{C}_{30}\text{H}_{51}\text{O}_3$.

(-)-Siringaresinol (**42**) [51,52]



Aceite amarillo (21.0 mg)

R_f : 0.48 (*n*-hexano/AcOEt/MeOH 50:40:10)

[α]_D²⁵ -7.7 (*c* 0.15 CHCl₃)

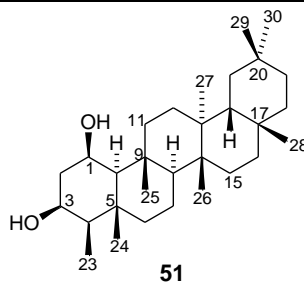
RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz): δ 6.58 (s, H-2', H-6', H-2'', H-6''), 4.73 (d, *J* = 4.5 Hz, H-2, H-6), 4.28 (dd, *J* = 9.0, 4.2 Hz, H-4a, H-8a), 3.91 (m, señales traslapadas, H-4b, H-8b), 3.90 (s, OCH₃-3', 5', 3'', 5''), 3.1 (dddd, *J* = 5.0, 5.0, 5.0, 11.0 Hz, H-1, H-5).

RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz): δ 147.2 (C-3', 5', 3'', 5''), 134.4 (C-4', C-4''), 132.2 (C-1', C-1''), 102.8 (C-2', C-6', C-2'', C-6''), 86.1 (C-2, C-6), 71.8 (C-4, C-8), 56.4 (OCH₃-3', 5', 3'', 5''), 54.4 (C-1, C-5).

8.8. Metodología y características físicas y espectroscópicas de los derivados

8.8.1. Preparación of 1β,3β-dihidroxifriedelano (**51**)

A una solución de **45** (50 mg, 0.11 mmol) en THF-H₂O (3:0.1 mL) se le adicionó NaBH₄ (9.41 mg, 0.25 mmol) y se mantuvo en agitación constante a reflujo. Después de completada la reacción (3 h), se agregó agua destilada (3 mL) y la mezcla se agitó por 5 min más a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se extrajo con CH₂Cl₂ (3 × 10 mL), las fases orgánicas se reunieron, se secaron con Na₂SO₄ anhidro y se concentraron a presión reducida en rotavapor [61]. El material crudo fue purificado por CCG (*n*-hexano/AcOEt, 8:2) obteniéndose **51** (47.8 mg, 95.2 %).



Agujas blancas (CHCl₃:MeOH)

R_f: 0.47 (*n*-hexano/AcOEt 70:30)

Pf : 217–219 °C

[α]_D²⁵ +7.0 (*c* 0.1, CHCl₃)

IR (KBr) ν_{\max} 3428, 2937, 2867, 1459, 1385, 1145, 1055, 976, 848, 578 cm⁻¹

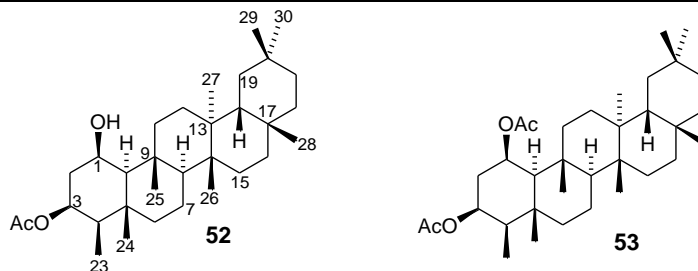
RMN ¹H y **RMN ¹³C** ver Tablas 7 y 8 respectivamente

EM- IE⁺ *m/z* (% intensidad relativa): 444 [M]⁺ (7), 429 (21), 291 (22), 260 (27), 220 (18), 205 (35), 191 (33), 163 (28), 137 (38), 123 (68), 95 (100), 83 (95), 69 (95), 55 (82), 43 (83), 18 (77).

EMAR-FAB⁺ *m/z*: Observado: [M]⁺ 444.3973; calculado: 444.3967 C₃₀H₅₂O₂.

8.8.2. Acetilación de 1β,3β-dihidroxifriedelano (**51**)

El diol **51** (30.5 mg) fue parcialmente disuelto en 1mL de piridina anhidra, posteriormente se le adicionó anhídrido acético (0.5 mL). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente. Después de 72h, la reacción se concluyó adicionando hielo (1 g). La mezcla de reacción se extrajo con cloruro de metileno (3 × 6 mL). Las porciones orgánicas se reunieron y esta fase se lavó con una solución de HCl (10 %) (2 × 20 mL) y posteriormente con una solución saturada de NaHCO₃ y con una solución saturada de NaCl. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró a presión reducida en rotavapor. El residuo se purificó por CCG utilizando mezclas de *n*-hexano/CH₂Cl₂/AcOEt de polaridad creciente (9.8:0.2, 9.5:0.5 y 9:0.5:0.5), de este proceso cromatográfico se recuperó parte de la materia prima (10.7 mg, 35.1%) y se obtuvieron **52** (12.5 mg, 41%) y **53** (3.6 mg, 9.9%).



3β-Acetoxy-1β-hidroxifriedelano (52)

Agujas incoloras (CH₂Cl₂)

R_f: 0.50 (*n*-hexano/AcOEt 80:20)

Pf: 213–215 °C

[α]_D²⁵ –5.45 (*c* 0.11, CHCl₃)

IR (CHCl₃) ν_{max} 2934, 2865, 1731, 1462, 1378, 1251, 1230, 1139, 1019, 978 cm⁻¹

RMN ¹H y RMN ¹³C ver Tablas 7 y 8 respectivamente

EM- IE⁺ *m/z* (% intensidad relativa): 486 [M]⁺ (3), 471 (10), 426 (9), 333 (8), 273 (14), 260 (18), 229 (15), 218 (31), 205 (21), 191 (26), 149 (27), 121 (60), 109 (73), 95 (100), 69 (82), 55 (62), 43 (45), 41 (27), 29 (6).

EMAR-FAB⁺ *m/z*: Observado: [M]⁺ 486.4065; calculado: 486.4073 C₃₂H₅₄O₃.

1β,3β-Diacetoxi-friedelano (53)

Agujas incoloras (CH₂Cl₂)

R_f: 0.54 (*n*-hexano/AcOEt 80:20)

Pf: 219–221 °C

[α]_D²⁵ +9.2 (*c* 0.13, CHCl₃)

IR (CHCl₃) ν_{max} 2939, 2867, 1726, 1462, 1371, 1268, 1242, 1140, 1022, 977 cm⁻¹

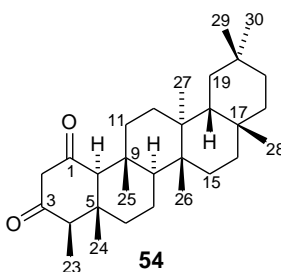
RMN ¹H y RMN ¹³C ver Tablas 7 y 8 respectivamente

EM- IE⁺ *m/z* (% intensidad relativa): 528 [M]⁺ (6), 468 (4), 426 (9), 408 (8), 393 (9), 376 (11), 273 (17), 260 (26), 205 (48), 149 (40), 137 (44), 123 (90), 109 (97), 95 (100), 81 (75), 69 (98), 55 (52), 43 (68).

EMAR-FAB⁺ *m/z*: Observado: [M]⁺ 528.4186; calculado: 528.4179, C₃₄H₅₆O₄.

8.8.3. Preparación de 1,3-diceto-friedelano (54) [55,56]

Una suspensión de **45** (14.0 mg, 0.03 mmol) en THF (5 mL) se enfrió a 0-5 °C y se le adicionó (gota a gota) el reactivo de Jones hasta la persistencia del color amarillo. La mezcla de reacción fue agitada a temperatura ambiente. Después de 30 min, se le adicionó metanol produciendo una solución azul-verdosa. Los disolventes fueron eliminados a presión reducida en rotavapor. Al crudo de reacción se le agregó agua (5 mL) y el producto se extrajo con CHCl₃ (3 × 3 mL), las fases orgánicas se reunieron, se lavaron con una solución saturada de NaCl, se secaron con Na₂SO₄ anhidro y se concentraron a presión reducida en rotavapor [62]. El residuo se purificó por CCG (*n*-hexano-AcOEt, 8:2), obteniéndose parte de la materia prima (2.0 mg, 14.3%) y **54** (9.0 mg, 64%).



Agujas incoloras (CH₂Cl₂)

R_f : 0.45 (*n*-hexano/AcOEt 85:15)

Pf : 268-272 °C

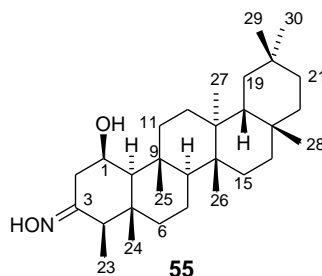
IR (CHCl₃) ν_{\max} 2946, 2870, 1728, 1704, 1462, 1389, 1191, 1177, 1071, 1002 cm⁻¹

RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz): δ 3.45 (d, *J* = 16.0 Hz, H-2a), 3.25 (d, *J* = 16.0 Hz, H-2b), 2.57 (c, *J* = 6.5 Hz, H-4), 2.4 (s, H-10), 2.15 (ddd, *J* = 13.5, 3.5, 3.5 Hz, H-11a), 1.90 (ddd, *J* = 12.5, 3.0, 3.0 Hz, H-6a), 1.20 (s, H-25), 1.18 (s, H-28), 1.05 (d, *J* = 7.0 Hz, H-23), 1.03 (s, H-26), 1.02 (s, H-27), 1.00 (s, H-29), 0.94 (s, H-30).

RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz): δ 204.1 (CO-3), 202.7 (CO-1), 71.9 (C-10), 60.2 (C-2), 59.1 (C-4), 52.1 (C-8), 42.7 (C-18), 40.6 (C-6), 39.5 (C-13), 39.2 (C-22), 38.2 (C-14), 37.8 (C-5), 37.2 (C-9), 35.9 (C-16), 35.3 (C-19), 34.9 (C-30), 34.6 (C-11), 32.7 (C-21), 32.4 (C-15), 32.0 (C-28), 31.7 (C-29), 30.1 (C-12), 30.0 (C-17), 28.1 (C-20), 20.3 (C-26), 18.7 (C-27), 18.05 (C-7), 18.00 (C-25), 15.9 (C-24), 7.28 (C-23).

8.8.4. Preparación de la oxima de 1 β -hidroxifriedelina (**55**)

Se disolvieron 100 mg (0.22 mmol) de 1 β -hidroxifriedelina (**45**) y 39.3 mg de NH₂OH:HCl (hidrocloruro de hidroxilamina) en 1.5 mL de piridina a esta solución resultante se le adicionó 1.5 mL de etanol absoluto. La mezcla de reacción se dejó a reflujo por 30 min bajo agitación constante, se enfrió a temperatura ambiente y se le agregó una solución de HCl al 10% (2 mL) [63]. El precipitado obtenido se filtró, obteniéndose el derivado **55** (95.6%, 98.9 mg).



3-Oxima-1 β -hidroxifriedelina (**55**)

Cristales incoloros

R_f: 0.50 (*n*-hexano/AcOEt 70:30)

Pf: 242–244 °C

[α]_D²⁵ +18.4 (*c* 0.10, CHCl₃)

IR (KBr) ν_{\max} 3611, 3289, 2933, 2867, 1674, 1460, 1385, 936 cm⁻¹

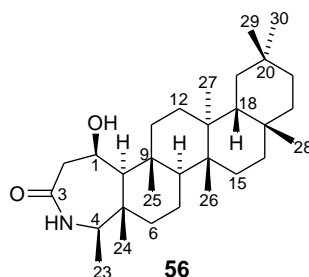
RMN ¹H y RMN ¹³C ver Tablas 7 y 8 respectivamente

EM- IE⁺ *m/z* (% intensidad relativa): 457 [M]⁺ (17), 439 (33), 422 (100), 408 (19), 205 (96), 191 (21), 166 (38), 138 (44), 123 (68), 109 (76), 95 (96), 69 (79), 55 (50), 41 (22), 18 (35).

EMAR-FAB⁺ *m/z*: Observado: [M + H]⁺ 458.3997; calculado: 458.3998, C₃₀H₅₂O₂N.

8.8.5. Preparación de la 3,4-lactama de 1 β -hidroxifriedelina (**56**).

Una mezcla de **55** (42.0 mg, 0.09 mmol) y cloruro de *p*-toluensulfonilo (14.0 mg, 0.07 mmol) se disolvió en piridina seca (1.0 mL) y la solución resultante se reflujo por 5 h bajo agitación constante. La mezcla de reacción se dejó enfriar y se diluyó con agua (3 mL). El producto fue extraído con CHCl₃ (3 × 5 mL). Las fases orgánicas se reunieron, se lavaron con HCl (10%), con solución de NaHCO₃ (sat), con una solución saturada de NaCl y se secaron con Na₂SO₄ sodio anhidro [63]. Al concentrar la fase orgánica se obtuvo el compuesto **56** (39.4 mg, 93.8%).



3,4-Lactama-1β-hidroxifriedelina (**56**)

Polvo blanco

R_f : 0.42 (*n*-hexano/AcOEt/MeOH 50:45:0.5)

Pf : 262–264 °C

$[\alpha]_D^{25}$ –13.3 (*c* 0.10, CHCl₃)

IR (KBr) ν_{\max} 3422, 3257, 3938, 2868, 1667, 1452, 1192 cm⁻¹

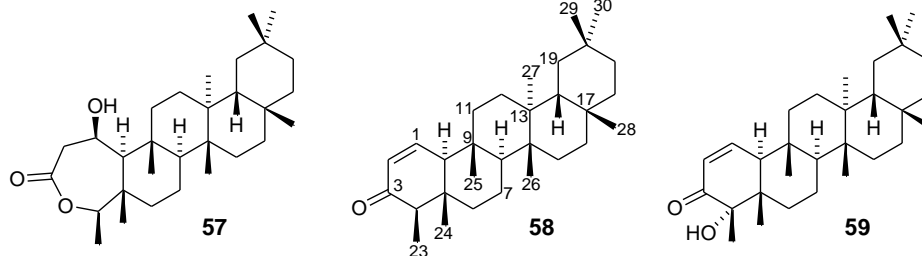
RMN ¹H y **RMN ¹³C** ver Tablas 7 y 8 respectivamente

EM- IE⁺ *m/z* (% intensidad relativa): 457 [M]⁺ (25), 439 (8), 424 (32), 218 (21), 205 (48), 191 (36), 163 (22), 137 (29), 123 (39), 109 (48), 95 (56), 81 (47), 69 (45), 55 (31), 44 (100), 28 (11).

EMAR-FAB⁺ *m/z*: Observado: [M + H]⁺ 458.4000; calculado: 458.3998, C₃₀H₅₂O₂N.

8.8.6. Oxidación de 1β-hidroxifriedelina con ácido *m*-cloroperbenzoico (AMCPB).

Se disolvieron 30 mg (0.06 mmol) de 1β-hidroxifriedelina (**45**) en 15 mL de cloroformo (disolución parcial) y a la solución resultante se le adicionó AMCPB (29.3 mg, 0.16 mmol). La reacción se mantuvo en agitación constante y reflujo (55°C). Después de 6 h, la mezcla de reacción se dejó enfriar, se le agregó 10 mL más de CHCl₃ y la solución se lavó con Na₂SO₃ acuoso al 5%, con una solución saturada de NaHCO₃ y con una solución de saturada de NaCl, se secó con Na₂SO₄ anhidro y finalmente el disolvente se eliminó a presión reducida [64]. Los productos se separaron por CCG, empleando como fase móvil mezclas de *n*-hexano/AcOEt de polaridad creciente. De este proceso se obtuvieron los compuestos **57** (4.2 mg, 13.5%), **58** (4.8 mg, 16.6%) y **59** (3.7 mg, 12.4%) como compuestos mayoritarios. Los datos espectroscópicos del compuesto **58** se compararon con los reportados en la literatura [57,58].



3,4-lactona de 1 β -hidroxifriedelina (57)

Sólido blanco amorfo

R_f : 0.51 (*n*-hexano/AcOEt/MeOH 60:35:5)

Pf : >300 °C

[α]_D²⁵ +17.1 (*c* 0.10, CHCl₃)

IR (KBr) ν_{\max} 3364, 2939, 2867, 1720, 1447, 1384, 1306, 1265, 1183, 1076 cm⁻¹

RMN ¹H y RMN ¹³C ver Tablas 7 y 8 respectivamente

EM- IE⁺ *m/z* (% intensidad relativa): 458 [M]⁺ (1), 173 (12), 83 (100), 55 (35), 43 (7), 18 (5).

EMAR-FAB⁺ *m/z*: Observado: [M + H]⁺ 459.3832; calculado: 459.3838, C₃₀H₅₁O₃.

Friedel-1-en-4 α -hidroxi-3-ona (59)

Cristales blancos

R_f : 0.46 (*n*-hexano/AcOEt 85:15)

Pf : 266□268°C

[α]_D²⁵ -90 (*c* 0.10, CHCl₃)

UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 238 (3.84) nm

IR (CHCl₃) ν_{\max} 3578, 2931, 2866, 2867, 1674, 1463, 1388, 1235, 1172, 1073 cm⁻¹

RMN ¹H y RMN ¹³C ver Tablas 7 y 8 respectivamente

EM- IE⁺ *m/z* (% intensidad relativa): 458 [M]⁺ (43), 412 (12), 397 (13), 218 (13), 205 (26), 152 (30), 109 (31), 95 (73), 69 (100), 67 (42), 55 (29), 18 (87).

EMAR-FAB⁺ *m/z*: Observado: [M]⁺ 440.3651; calculado: 440.3654, C₃₀H₄₈O₂.

Tabla 7. Datos de RMN ¹H de 51–53 y 55 (δ en ppm, *J* en Hz)^a

posición	51	52	53	55
1	4.48 sa	4.38, sa	5.47, sa	4.66, s
2a	2.21, ddd (15.0, 3.0, 2.5)	2.12, ddd (15.5, 2.5, 2.5)	2.21, ddd (16.0, 2.5, 2.0)	3.53, dd (13.0, 3.0)
2b	1.69, ddd (15.0, 3.5, 3.0)	1.80, ddd (15.5, 4.0, 4.0)	1.71, ddd (16.0, 4.0, 4.0)	2.06, dd (13.0, 4.0)
3	3.87, sa	5.15, ddd (3.0, 3.0, 3.0)	4.94, sa	
4	1.32, sa	1.45 ^b	1.44 ^b	2.26, c (6.5)
6a	1.76, ddd (13.0, 3.5, 3.0)	1.77, ddd (13.0, 3.0, 3.0)	1.81, ddd (13.0, 3.0, 3.5)	1.75, ddd (13.0, 3.0, 3.0)
6b	0.96 ^b	1.01 ^b	1.01 ^b	1.23 ^b
7a	1.41 ^b	1.49 ^b	1.45 ^b	1.48 ^b
7b		1.43, m		
8	1.21 ^b	1.21 ^b	1.21 ^b	1.25 ^b
10	0.88, sa	0.88, sa	1.05, sa	1.18 ^b
11a	1.58, m	1.62, ddd (13.0, 3.5, 3.0)	1.45 ^b	1.61, da (13.0)
11b	1.19 ^b	1.37 ^b	1.34 ^b	1.31, da (13.5)
12a	1.41 ^b	1.44 ^b	1.33 ^b	1.38 ^b
12b	1.35 ^b	1.35 ^b		
15a	1.49, m	1.49 ^b	1.49, m	1.50 ^b
15b	1.25 ^b	1.24 ^b	1.24 ^b	1.24 ^b
16a	1.52, m	1.53, m	1.53, m	1.54, m
16b	1.34 ^b	1.35 ^b	1.35 ^b	1.35 ^b
18	1.54 ^b	1.56, dd (12.0, 6.0)	1.54, dd (11.0, 6.0)	1.55, dd (11.0, 6.0)
19a	1.35 ^b	1.37 ^b	1.34 ^b	1.37 ^b
19b	1.23 ^b	1.21 ^b	1.20 ^b	1.21, dd (14.0, 6.0)
21a	1.44, m	1.47 ^b	1.47, m	1.46 ^b
21b	1.26, m	1.26 ^b	1.23, m	1.25 ^b
22a	1.45 ^b	1.47 ^b	1.47 ^b	1.48 ^b
22b	0.92, sa	0.91 ^b	0.93 ^b	0.93 ^b
23	1.04, d (7.0)	0.90, d (7.0)	0.91, d (7.0)	1.08, d (6.5)
24	1.28, s	1.27, s	1.28, s	1.09, s
25	1.29, s	1.32, s	1.07, s	1.27, s
26	1.03, s	1.03, s	1.00, s	1.01, s
27	0.99, s	0.99, s	0.98, s	1.02, s
28	1.17, s	1.18, s	1.17, s	1.17, s
29	1.00, s	1.00, s	0.99, s	1.00, s
30	0.94, s	0.94, s	0.94, s	0.95, s
OH-1	2.64, d (7.0)			
OH-3	2.32, d (6.0)			
OAc-1			2.00, s	
OAc-3		2.07, s	2.02, s	

^a Obtenidos en CDCl₃ (**51–53**), CDCl₃/DMSO-*d*₆ (3:1) (**55**) a 500 MHz. ^b señal traslapada.

Tabla 7 (continuación). Datos de RMN ¹H de **56**, **57** y **59** (δ en ppm, *J* en Hz)^a

position	56	57	59
----------	----	----	----

1	4.61, d (8.0)	4.66, sa	6.96, dd (10.5, 2.0)
2a	2.79, d (14.0)	2.92, d (14.0)	6.01, dd (10.0, 3.0)
2b	2.56, dd (14.0, 7.5)	2.83, dd (14.0, 7.0)	
3			
4	3.37, c (7.0)	2.24, c (6.0)	
6a	1.45, c (3.5)	1.45, m	1.81, m
6b	1.11 ^b	1.05, m	1.53 ^b
7a	1.52, m	1.51	1.58 ^b
7b			
8	1.26, m	1.21 ^b	1.42, dd (11.0, 4.00)
10	0.99, sa	1.00 ^b	2.84, sa
11a	1.64, ddd (13.0, 3.0, 3.0)	1.60, m	1.62 dd (13.0, 3.5, 3.0)
11b		1.34, m	1.32 ^b
12a	1.41 ^b	1.41, m	1.38 ^b
12b		1.37 ^b	
15a		1.50, m	1.32 ^b
15b		1.24 ^b	
16a	1.56 ^b	1.53 ^b	1.54 ^b
16b	1.37, sa	1.37 ^b	1.34, m
18	1.58, dd (11.0, 6.0)	1.57, dd (11.0, 6.0)	1.57, dd (11.0, 6.0)
19a	1.40 ^b	1.38 ^b	1.38 ^b
19b	1.23, dd (14.0, 6.0)	1.21 ^b	1.20, dd (13.5, 6.0)
21a	1.46 ^b	1.47 ^b	1.46, m
21b	1.25 ^b	1.26 ^b	1.27 ^b
22a	1.50, sa	1.49, m	1.47 ^b
22b	0.93, sa	0.94 ^b	0.93, da
23	1.12, d (7.0)	1.24, d (6.5)	1.26, s
24	1.17, s	1.25, s	0.91, s
25	1.30, s	1.29, s	0.96, s
26	1.037, s	1.03, s	1.01, s
27	1.031, s	1.00, s	1.04, s
28	1.19, s	1.18, s	1.19, s
29	1.00, s	1.00, s	1.00, s
30	0.95, s	0.95, s	0.95, s

^a Obtenidos en CDCl₃ (**57** y **59**), CDCl₃/CD₃OD (1:1) (**56**) at 500 MHz. ^b señales traslapadas.

Tabla 8. Datos de RMN ^{13}C de **51–53, 55–57** y **59** (δ en ppm)^a

position	51	52	53	55	56	57	59
1	68.4	67.2	68.1	68.1	64.7	65.5	150.7
2	41.9	39.8	36.1	37.6	45.0	43.7	127.4
3	74.1	74.8	72.8	166.6	177.4	172.6	198.3
4	49.5	48.3	48.0	51.2	60.3	85.2	78.4
5	38.1	37.6	37.8	42.5	41.2	41.7	45.5
6	44.4	44.4	43.7	42.6	41.4	40.4	32.7
7	17.8	18.0	17.9	18.1	19.2	18.4	17.3
8	53.8	53.8	53.9	52.9	53.9	53.4	51.6
9	39.3	38.2	37.8	38.5	40.0	39.3	36.3
10	61.8	61.4	60.4	60.7	67.2	66.2	52.9
11	35.5	35.3	35.3	34.5	36.0	35.6	34.9
12	30.5	30.4	30.3	29.6	31.2	30.5	30.2
13	39.7	39.7	39.6	38.9	39.9	39.5	39.7
14	38.4	38.4	38.4	37.6	39.2	38.6	38.2
15	32.4	32.4	32.4	31.7	33.0	32.6	32.1
16	36.1	36.0	36.0	35.3	36.6	36.1	35.9
17	30.0	30.0	30.0	29.3	30.6	30.0	30.0
18	42.8	42.8	42.8	42.1	43.5	42.9	42.8
19	35.3	35.3	35.3	34.6	35.9	35.4	35.4
20	28.2	28.2	28.1	27.5	28.6	28.2	28.1
21	32.8	32.8	32.8	32.2	33.4	32.9	32.7
22	39.3	39.3	39.3	38.5	39.8	39.3	39.2
23	12.0	11.6	11.5	8.1	15.7	15.2	16.4
24	18.4	18.2	17.2	16.2	15.8	16.2	17.2
25	19.4	19.2	18.8	18.3	19.4	19.2	20.3
26	20.0	20.0	20.1	19.4	20.4	20.0	19.9
27	18.7	18.7	18.6	18.1	19.0	18.6	18.7
28	32.1	32.1	32.1	31.5	32.4	32.1	32.1
29	31.8	31.8	31.8	31.3	32.1	31.8	31.7
30	35.0	35.0	34.9	34.4	35.2	34.9	35.0
Acetate-1							
C=O			170.0				
CH ₃			21.6				
Acetate-3							
C=O		170.2	170.5				
CH ₃		21.3	21.2				

^a Obtenidos en CDCl_3 (**51–53, 57, 59**), $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}-d_6$ (3:1) (**55**), $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ (1:1) (**56**) a 125 MHz (**51–53, 55–57**) y 75 MHz (**59**).

9. CONCLUSIONES

La colecta de especies selectas de la familia Euphorbiaceae permitió la preparación de extractos orgánicos, los cuales fueron bioevaluados en búsqueda de sustancias citotóxicas. Los resultados obtenidos dirigieron la atención a los constituyentes secundarios de *Garcia parviflora*, por lo que esta especie fue analizada en detalle.

El estudio químico de *G. parviflora* generó conocimiento acerca de los metabolitos secundarios de esta planta, de la cual se aislaron y caracterizaron tres nuevos triterpenos de tipo friedelano **41**, **45** y **48** junto con siete productos naturales conocidos. Los productos naturales **42** y **43** son los que presentaron actividad citotóxica moderada.

Por otro lado, la disponibilidad del producto natural **45**, permitió la realización de algunos derivados, con el fin de explorar la reactividad química de este compuesto y la citotoxicidad de los derivados. Como resultado de estas modificaciones químicas se obtuvieron nueve productos semisintéticos de los cuales **51-53**, **55-57** y **59** representan nuevas estructuras químicas. De los derivados obtenidos únicamente los compuestos **51** y **59** mostraron actividad citotóxica moderada cuando se compararon con el control positivo. El compuesto **51** fue dos veces más activo que el **59**. Los resultados obtenidos constituyen una contribución al conocimiento químico y biológico de la flora de nuestro país.

10. REFERENCIAS

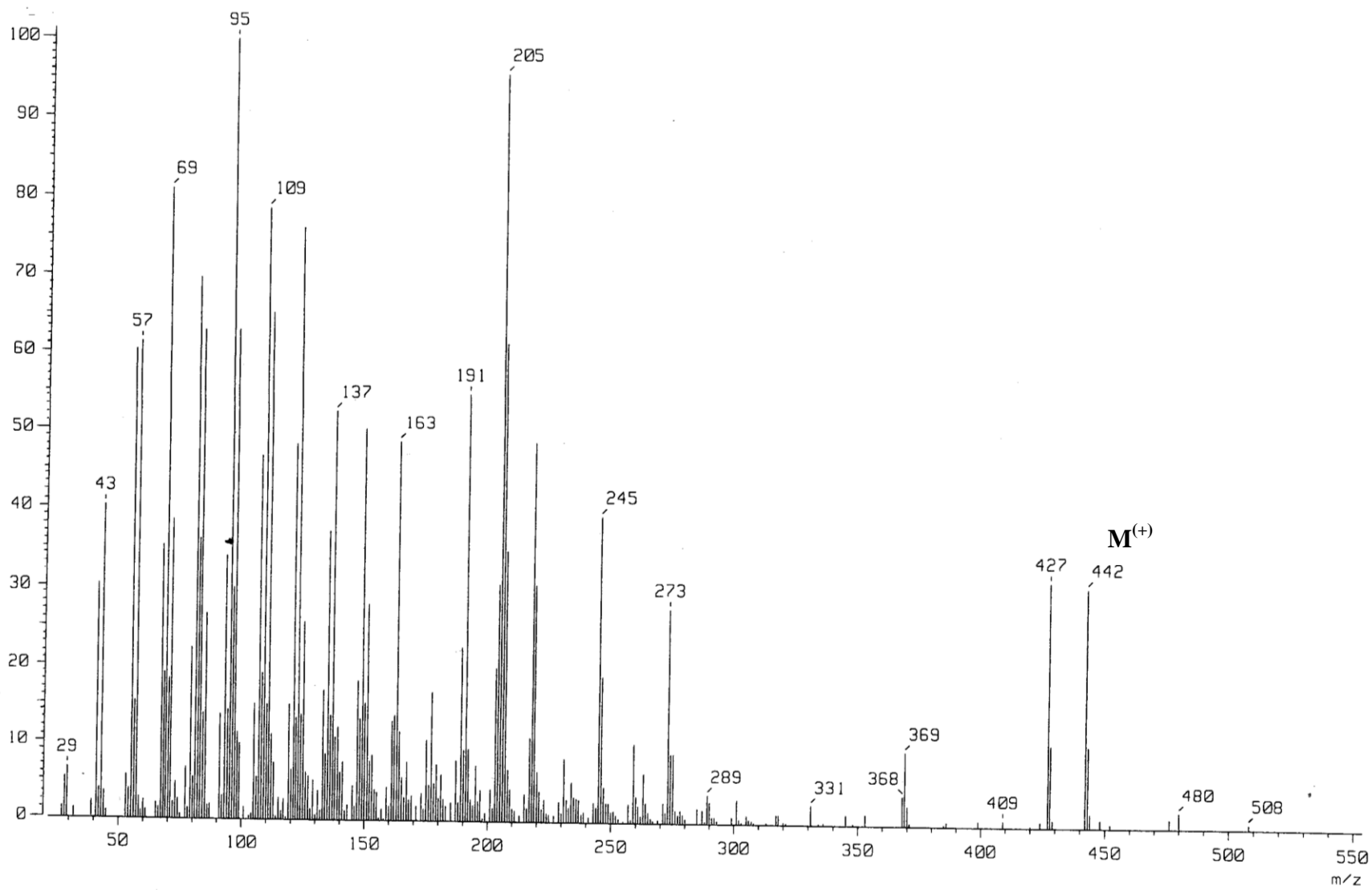
-
-
- [1] Cragg, G. M.; Boyd, M.R.; Khanna, R.; Kneller, R.; Mays, T. D.; Mazan, K. D.; Newman, D. J.; Sausville, E. A. *Pure Appl Chem.* **1999**, *71*, 1619-1633.
- [2] Houghton, P. J. *J. Chem. Ed.* **2001**, *78*, 175-184.
- [3] www.who.int/topics/cancer/es/
- [4] www.inegi.gob.mx/inegi/contenidos/espenol/prensa/estadisticas/2007/cancer07.pdf
- [5] Newman, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 461-477.
- [6] Phillipson, D. *Phytochemistry* **2001**, *56*, 237-243.
- [7] a) Wu, T. S.; Lin, Y. M.; Haruna, M. *J. Nat. Prod.* **1991**, *54*, 823-829. b) Alonso, J. A.; Villarreal, M. L.; Salazar, L. A.; Gomez, M.; Dominguez, F.; Garcia, A. *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *133*, 945-972.
- [8] Steinmann, V. W. *Act. Bot. Mex.* **2002**, *61*, 61-93.
- [9] Abdel-Fattah, M. R. The Chemical Constituents and Economic Plants of the Euphorbiaceae. *Bot. J. Linn. Soc.* **1987**, *94*, 293-326.
- [10] Duarte, N.; Varga, A.; Cherepnev, G.; Radics, R.; Molnár, J.; Ferreira, M. J. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 546-554.
- [11] Miglietta, A.; Gabriel, L.; Appendino, G.; Bocca, C. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2003**, *51*, 67-74.
- [12] Nihei, K.; Asaka, Y.; Mine, Y.; Kubo, I. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 244-247.
- [13] Nihei, K.; Asaka, Y.; Mine, Y.; Yamada, Y.; Ligo, M.; Yanagisawa, T.; Kubo, I. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 975-977.
- [14] Maciel, M. M.; Pinto, A. C.; Arruda, A. C.; Pamplona, S. G. S.; Vanderline, F. A.; Lapa, A. J.; Echeverria, A.; Grynberg, N. F.; Colus, I.; Farias, R. A. F.; Luna, A. M.; Rao, V. S. N. *J. Ethnopharmacol.* **2000**, *70*, 41-55.
- [15] Peres, M. T.; Monache, F. D.; Cruz, A. B.; Pizzolatti, M. G.; Yunes, R. A. *J. Ethnopharmacol.* **1997**, *56*, 223-226.
- [16] Tanaka, R.; Wada, S.; Yamada, T.; Yamori, T. *Planta Med.* **2006**, *72*, 1347-1349.
- [17] Wada, S.; Taka, R.; Iida, A.; Matsunaga, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *28*, 1219-1223.
- [18] Wang, Y. B.; Huang, R.; Wang, H. B.; Jin, H. Z.; Lou, L. G.; Qin, G. W. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 967-970.
- [19] García, A.; Delgado, G. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 1618-1621.
-
-

-
-
- [20] El-Mekkawy, S.; Meselhy, M. R.; Nakamura, N.; Hattori, M.; Kawahata, T.; Otake, T. *Phytochemistry* **2000**, *53*, 457-464.
- [21] Tempeam, A.; Thasana, N.; Pavaro, Ch.; Chuakul, W.; Siripong, P.; Ruchirawat, S. A. *Chem. Pharm. Bull.* **2005**, *53*, 1321-1323.
- [22] Yang, Ch. M.; Cheng, H. Y.; Lin, T. Ch.; Chiang, L. Ch.; Lin, Ch. Ch. *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *110*, 555-558.
- [23] Cheng, J.T.; Chang, S. S.; Hsu, F. L. *J. Pharm. Pharmacol.* **1994**, *46*, 46-49.
- [24] Sun, H.; Fang, W. S.; Wang, W. Z.; Hu, Ch. *Botanical Studies* **2006**, *47*, 339-368.
- [25] Chiang, L.C.; Chiang, W.; Chang, M. Y.; Ng, L. T.; Lin, C. C. *Am. J. Chin. Med.* **2003**, *31*, 37-46.
- [26] Ríos, M. Y.; Gonzáles-Morales, A.; Villarreal, M. L. *Planta Med.* **2001**, *67*, 683-684.
- [27] Brinker, A. M.; Ma, J.; Lipsky, P. E.; Raskin, I. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 732-766.
- [28] Kim, Y. K.; Yoon, S. K.; Ryu, S. Y. *Planta Med.* **2000**, *66*, 485-486.
- [29] Deng, J. Z.; Starck, S. R.; Hecht, S. M. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1624-1626.
- [30] Ríos, J. L. *J. Ethnopharmacol.* **2010**, *128*, 1-14.
- [31] Syrovets, T.; Buchele, B.; Gedig, E.; Slupsky, J. R.; Simmet, T. *Mol. Pharmacol.* **2000**, *58*, 71-81.
- [32] Liby, K. T.; Yore, M. M.; Sporn, M. B. *Nature Rev. Cancer* **2007**, *7*, 357-369.
- [33] Duan, Z.; Ames, R. Y.; Ryan, M.; Hornicet, F. J.; Makin, H.; Seiden, M. V. *Cancer Chemoter. Pharmacol.* **2009**, *63*, 681-689.
- [34] Schmidt, M. L.; Kuzmanoff, K. L.; Ling-Indeck, L.; Pezuto, J. M. *Eur. J. Cancer* **1997**, *33*, 2007-2010.
- [35] Zuco, V.; Supino, R.; Righetti, S. C.; Cleris, L.; Marchesi, E.; Gambacorti-Passerini, C.; Formelli, F. *Cancer lett.* **2002**, *175*, 17-25.
- [36] Olmedo, D. A.; López-Pérez, J. L.; Del Olmo, E.; Vásquez, Y.; San Feliciano, A.; Gupta, M. P. *Molecules* **2008**, *13*, 2915-2924.
- [37] Chang, F. R.; Hayashi, K.; Chen, I.; Liaw, Ch. Ch.; Bastow, K. F.; Nakanishi, Y.; Nozaki, H.; Cragg, G. M.; Wu, Y. Ch.; Lee, K. H. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1416-1420.
- [38] Li, Y. Z.; Li, Z. L.; Yin, S. L.; Shi, G.; Liu, M. S.; Jing, Y. K.; Hua, H. M. *Fitoterapia* **2010**, *81*, 586-589.
-
-

-
- [39] Monteiro, C.; Justino, F.; Tavares, R.; Curto, M. J. M.; Florencio, M. H.; Nascimento, M. S. J.; Pedro, M.; Cerqueira F.; Pinto, M. M. M. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1273-1277.
- [40] Monteiro, C.; Manta, C.; Justino, F.; Tavares, R.; Curto, M. J. M. Pedro, M.; Nascimento, M. S. J.; Pinto, M. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1193-1196.
- [41] Coll, J. C.; Bowden, B. F. *J. Nat. Prod.* **1996**, *49*, 934-936.
- [42] Maciel, M. A. M.; Pinto, A. C.; Brabo, S. N.; Da Silva, M. N. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 823-828.
- [43] McLean, S.; Perpick-Dumont, M.; Reynolds, W. F. *Can. J. Chem.* **1987**, *65*, 2519-2525.
- [44] Patra, A.; Chaudhuri, S. K. *Indian J. Chem.* **1989**, *28B*, 376-380.
- [45] Patra, A.; Chaudhuri, S. K. *Magn. Reson. Chem.* **1987**, *25*, 95-100.
- [46] Zhang, X.; Geoffroy, P.; Miesch, M.; Julien-David, D.; Raul, F.; Aoudé-Werner, D.; Marchioni, E. *Steroids*, **2005**, *70*, 886-895.
- [47] Lane, A. M.; Kubanek, J. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 1224-1231.
- [48] Jayasinghe, L.; Mallika, B. M.; Nishantha, K. H. R.; Gayathri, N. W. M.; Ratnayake, B. M.; Hara, N.; Fujimoto, Y. *Phytochemistry* **2003**, *62*, 637-641.
- [49] Bellido, S. I.; Pollán, M. S.; Caballero, E.; González, M. S. *Phytochemistry* **1985**, *24*, 2758-2760.
- [50] Berova, N.; Nakanishi, K, Woody, R. W. *Circular Dichroism. Principles and Applications*. Ch. 10. Wiley. **2000**
- [51] Choi, S. Z.; Yang, M. C.; Choi, S. U.; Lee, K. R. *Arch. Pharm. Res.* **2006**, *29*, 203-208.
- [52] Ito, A.; Kasai, R.; Yamasaki, K.; Duc, N. M.; Nham, N. T. *Phytochemistry* **1994**, *37*, 1455-1458.
- [53] Faizi, S.; Ali, M.; Saleem, R.; Irfanulla; Bibi, S. Complete ^1H and ^{13}C NMR Assignments of Stigma-5en-3-O- β -glucoside and its Acetyl Derivative. *Magn. Reson. Chem.* **2001**, *39*, 399-405.
- [54] Los datos cristalográficos para el compuesto **38** se encuentran depositados en Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC No.766372). deposit@ccdc.cam.ac.uk <http://www.ccdc.cam.ac.uk/deposit>.
- [55] Klass, J.; Tinto, W. F.; McLean, S.; Reynolds, W. F. *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 1626-1630.
- [56] Joshi, B. S.; Kamat, V. N.; Viswanathan, N. *Tetrahedron* **1973**, *29*, 1365-1374.
-

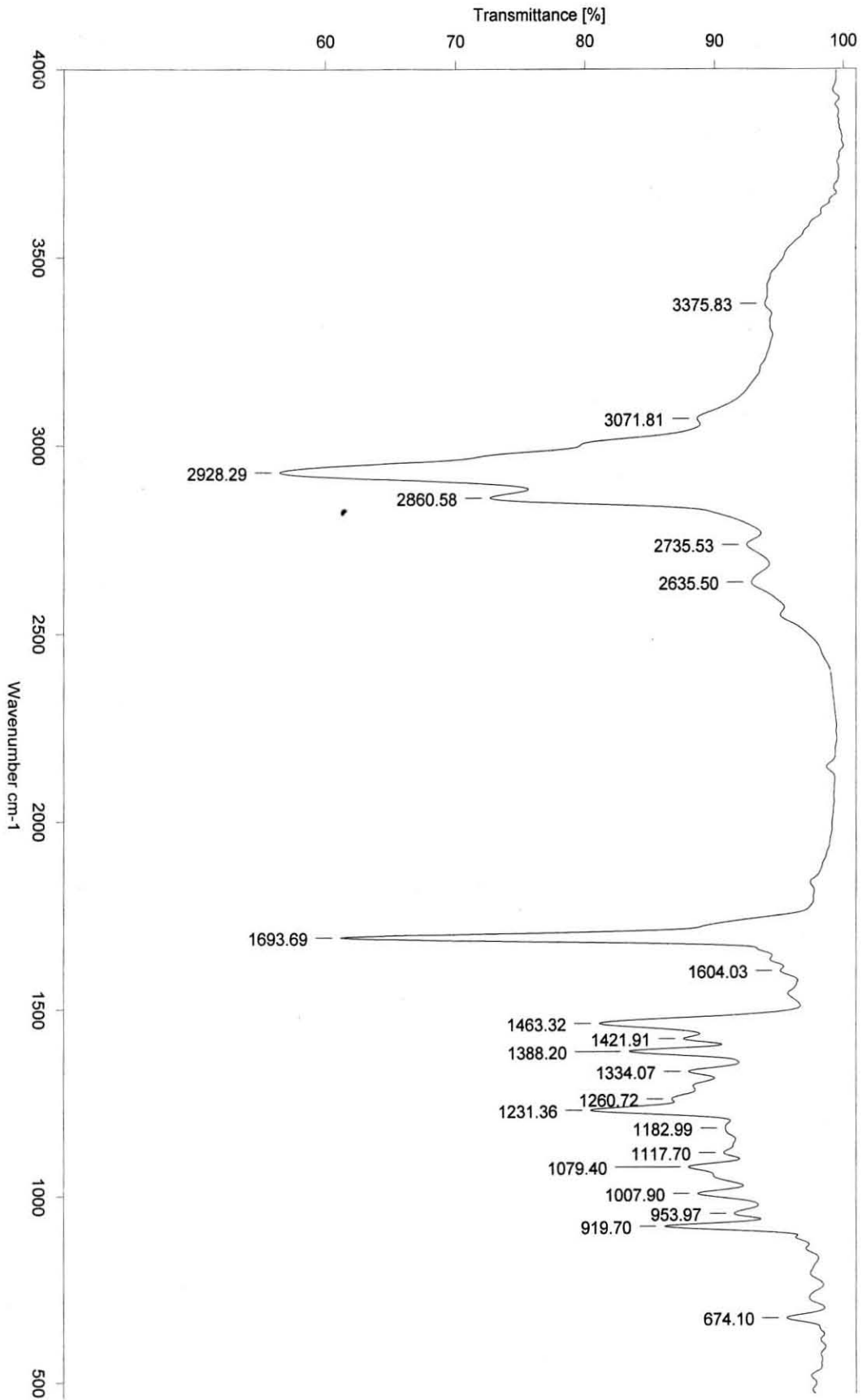
-
-
- [57] Monteiro, C.; Justino, F.; Tavares, R.; Curto, M. J. M.; Florencio, M. H.; Nascimento, M. S. J.; Pedro, M.; Cerqueira F.; Pinto, M. M. M. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1273-1277.
- [58] Talapatra, B.; Lahiri, B.; Basak, A.; Pradhan, D. K.; Talapatra, S. K. *Indian J. Chem.* **1983**, *22B*, 741-745.
- [59] Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A.; Gray-Goodrich, M.; Campbell, H.; Mayo, J.; Boyd, M. *J. Natl. Cancer Inst.* **1991**, *83*, 757-766.
- [60] Martínez, M.; Jiménez, J.; Cruz, R.; Juárez, E.; García, R.; Cervantes, A.; Mejía, R. Los géneros de la familia Euphorbiaceae en México. *Anales del Instituto de Biología (UNAM), Serie Bot.* **2002**, *73*, 155-281.
- [61] Zeynizadeh, B.; Behyar, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2005**, *78*, 307-315.
- [62] Hunter, A. C.; Priest, S. M. *Steroids* **2006**, *71*, 30-33.
- [63] Moiteiro, C.; Curto, M. J. M.; Mohamed, N.; Bailén, M.; Martínez-Díaz, R.; González-Coloma, A. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 3566-3571.
- [64] Tori, M.; Matsuda, R.; Sono, M.; Kohama, Y.; Asakawa, Y. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1988**, *61*, 2103-2108.

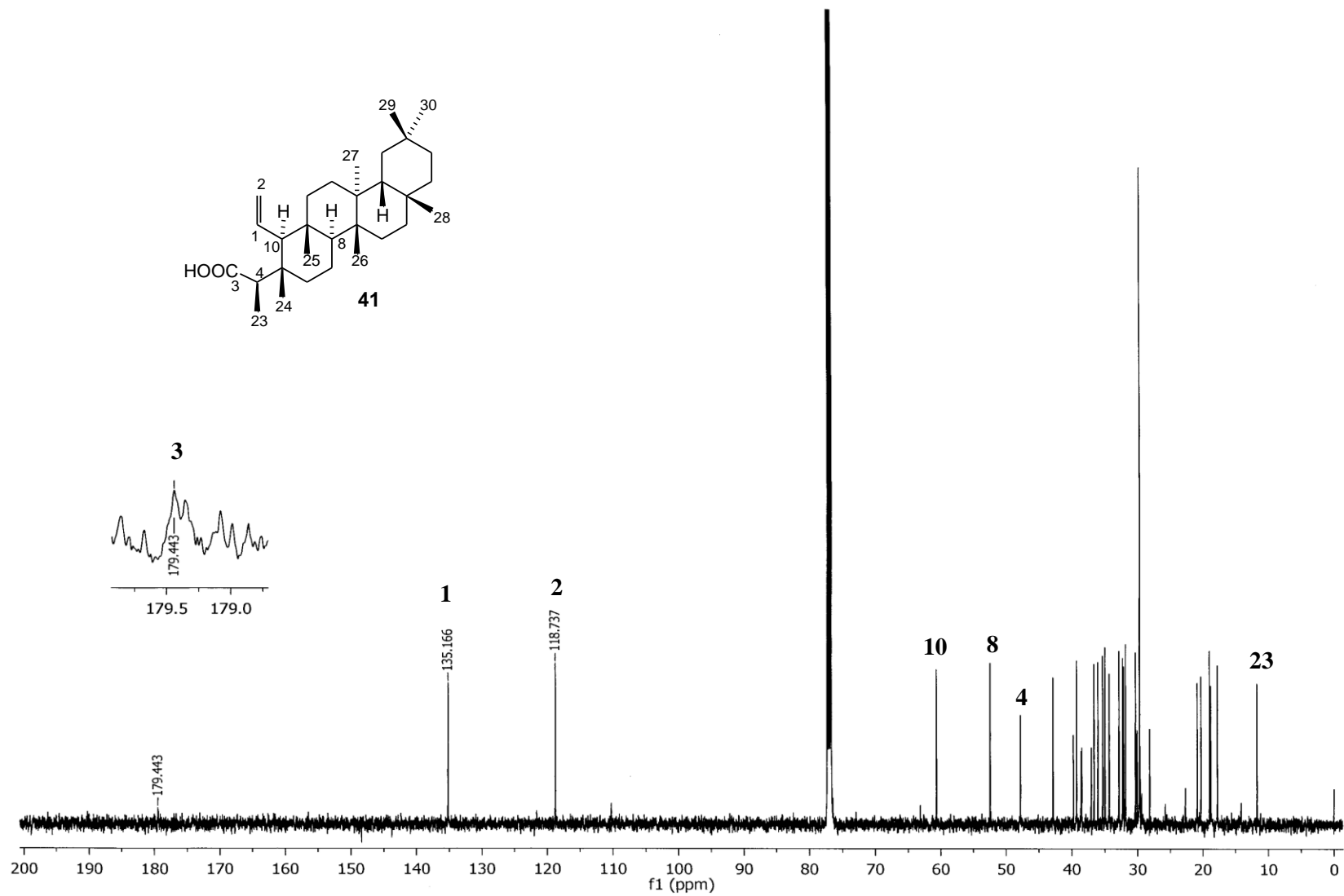
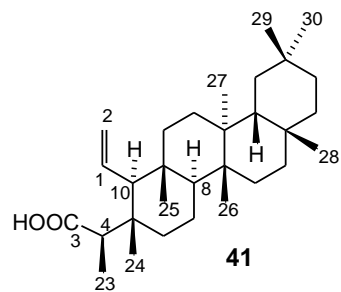
ESPECTROS



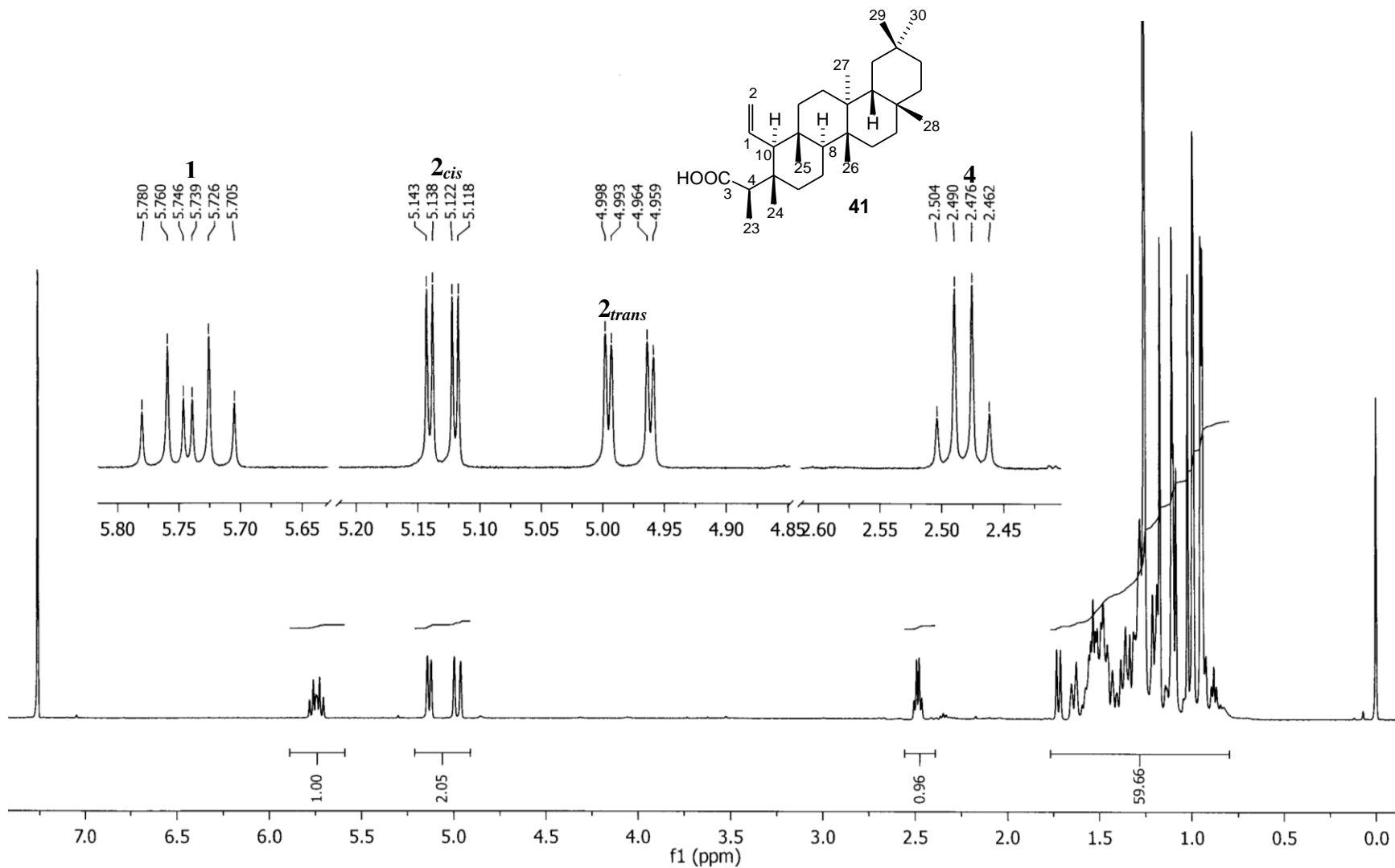
Espectro 1. EM-IE de 41

Espectro 2. IR (KBr) de 41

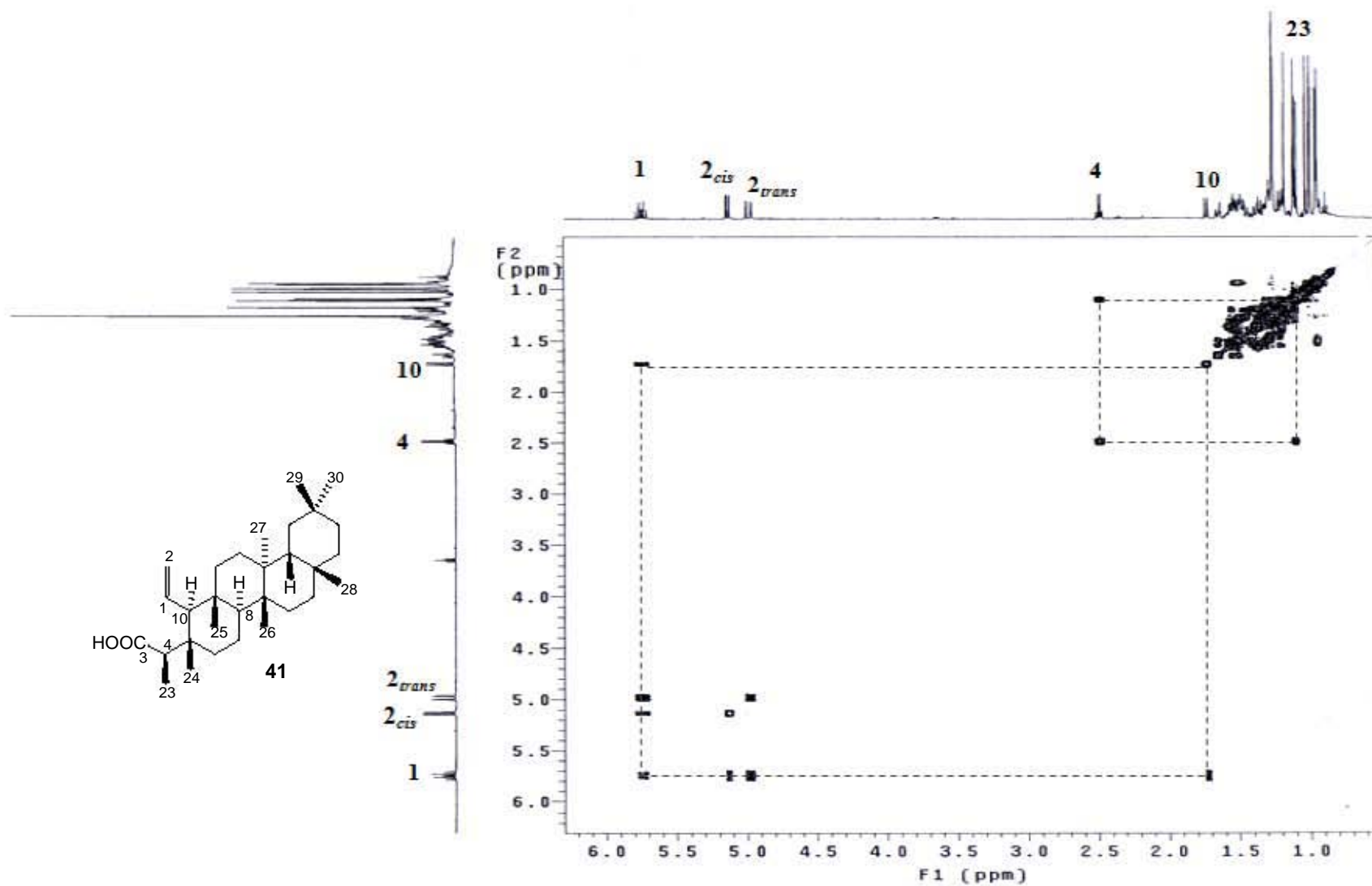




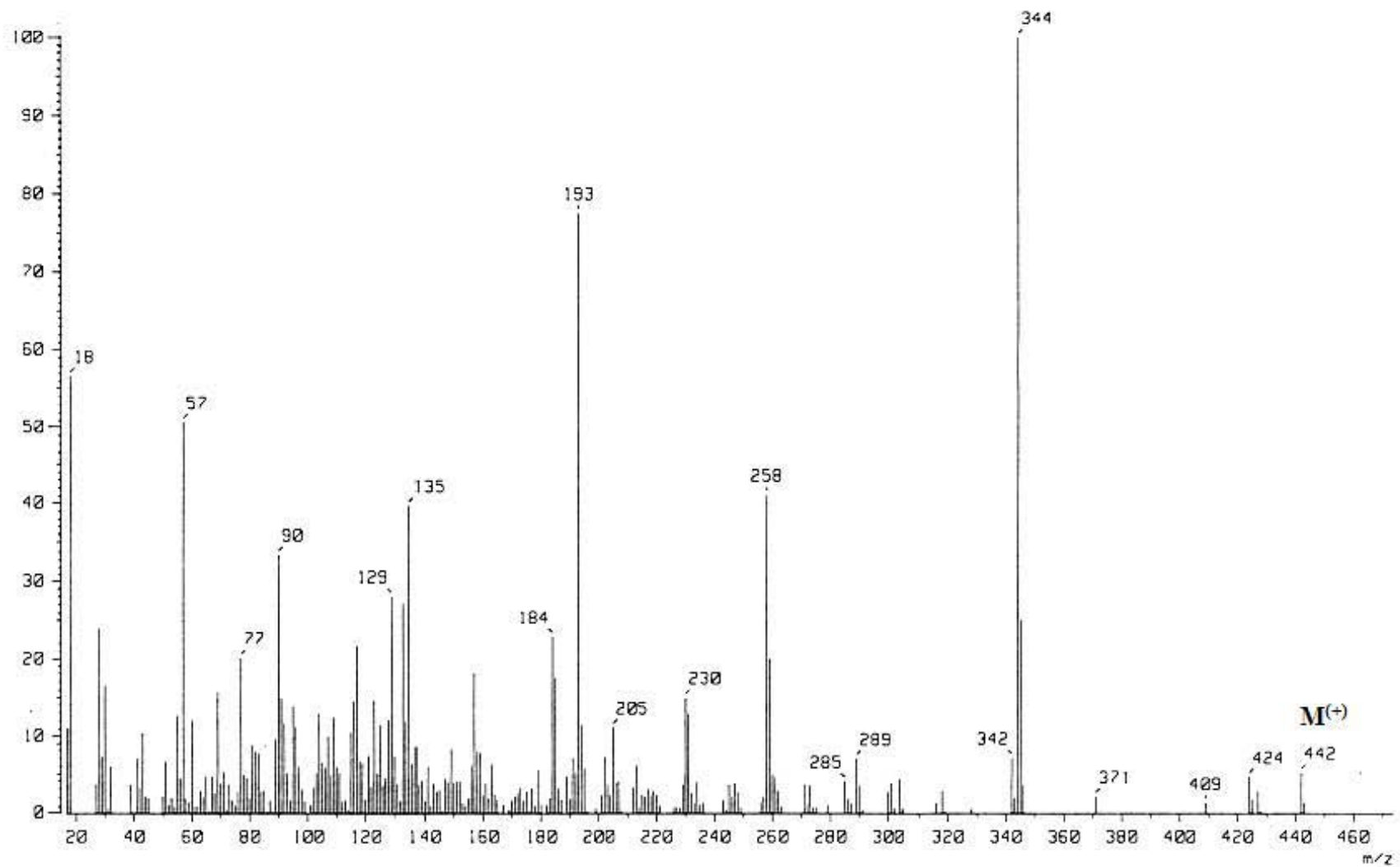
Espectro 3. RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de **41**



Espectro 4. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **41**

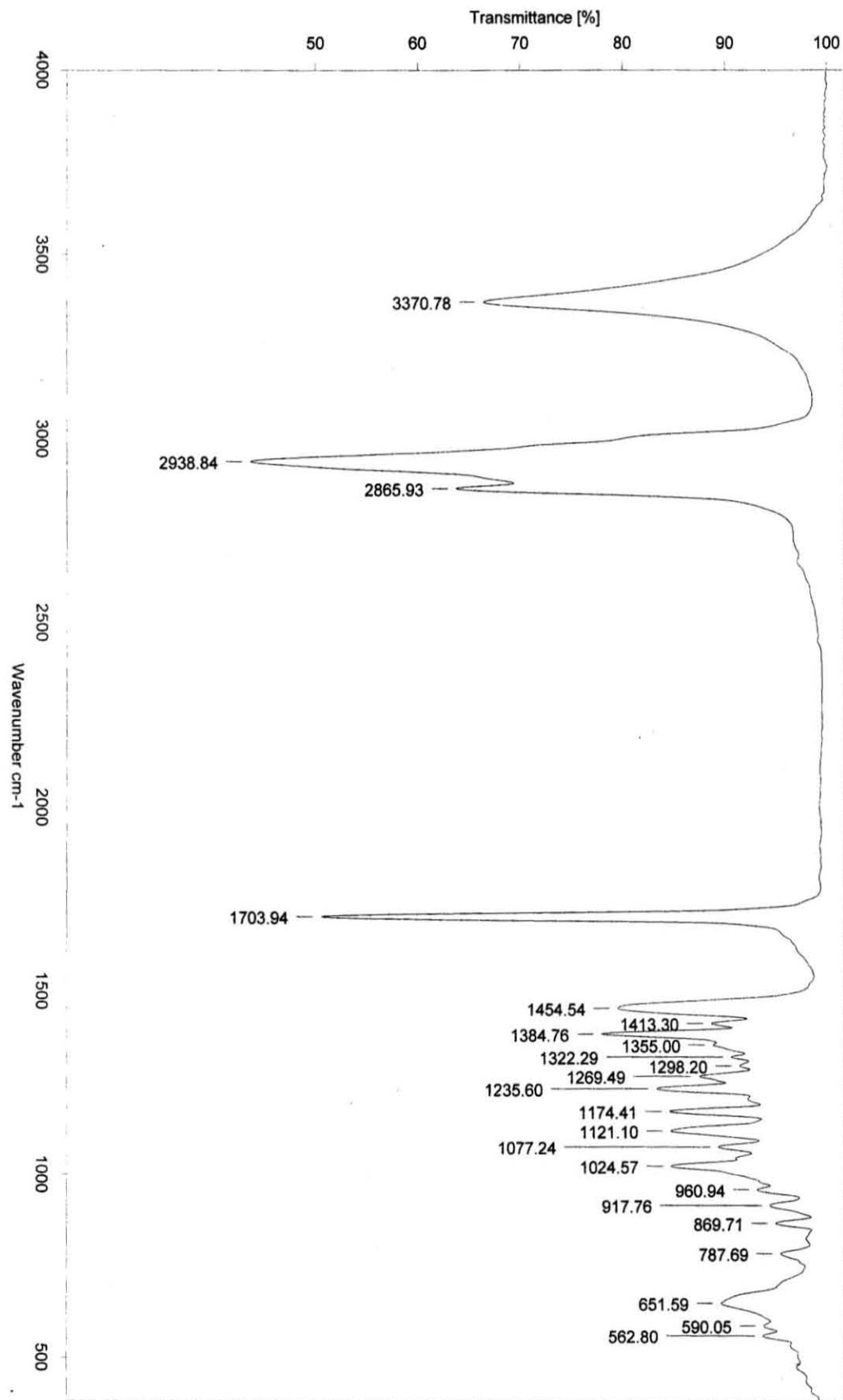


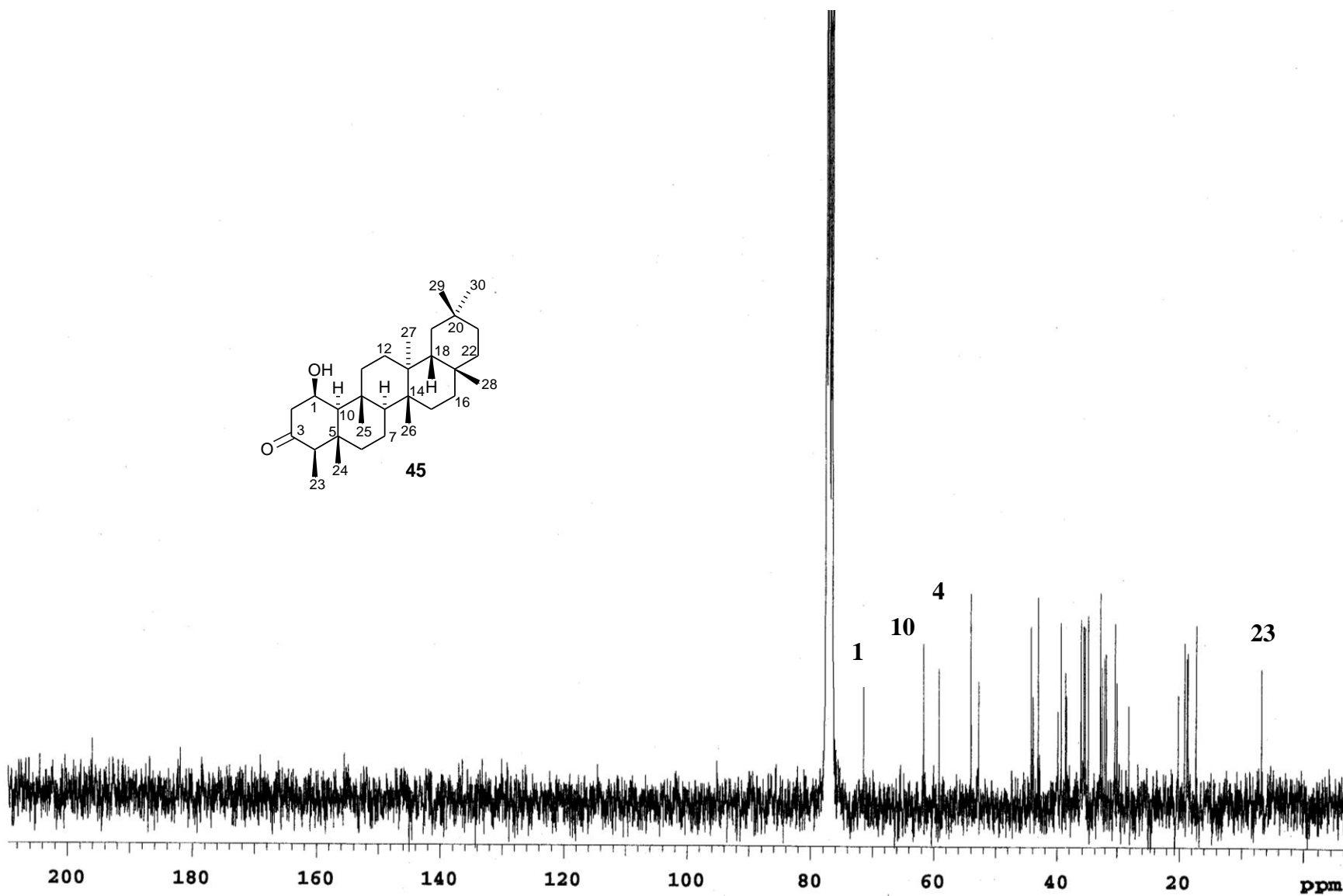
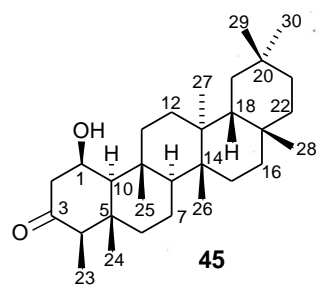
Espectro 5. Experimento COSY (500 MHz, CDCl₃) de **41**



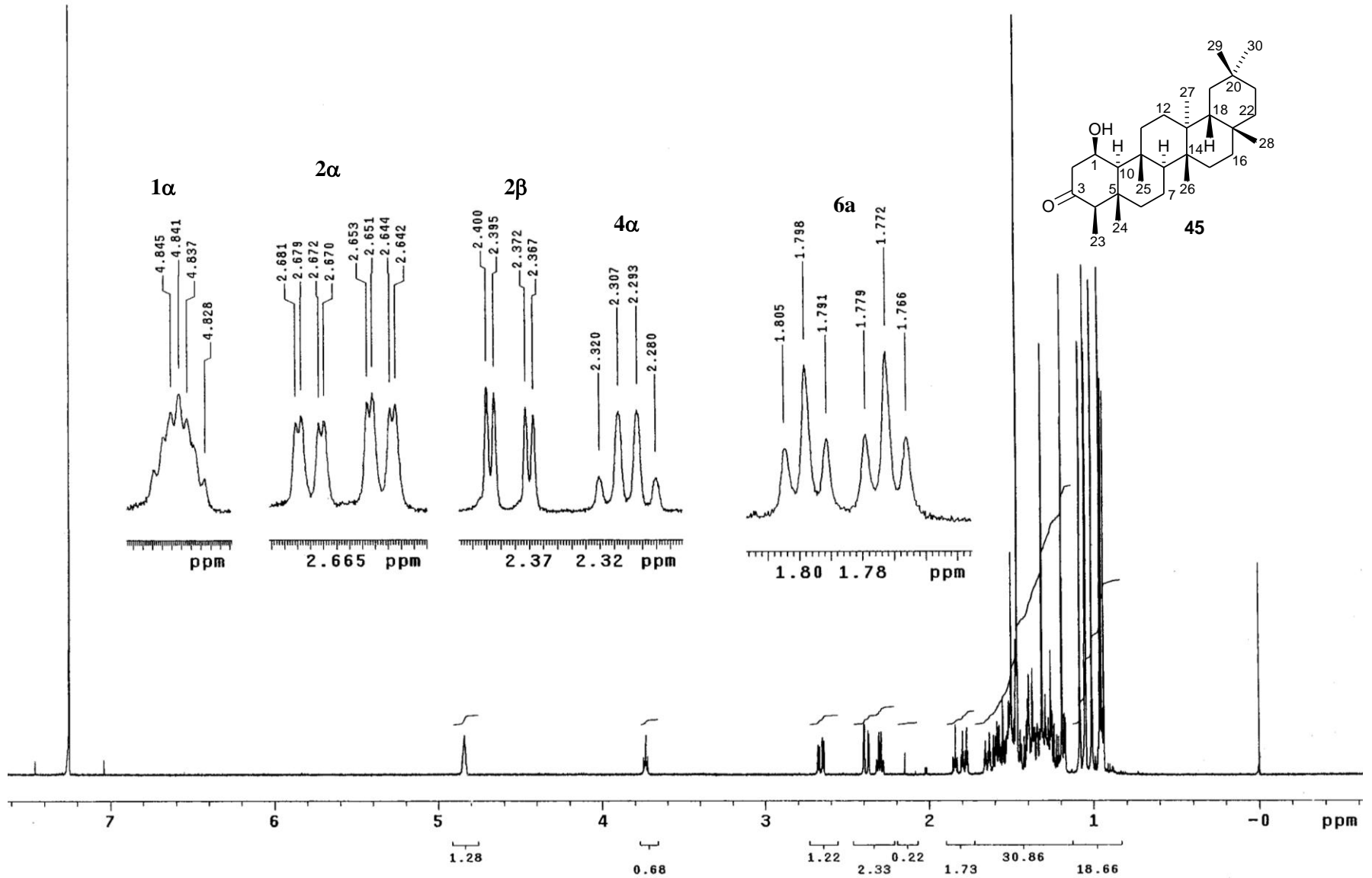
Espectro 6. EM-IE de 45

Espectro 7. IR (KBr) de 45

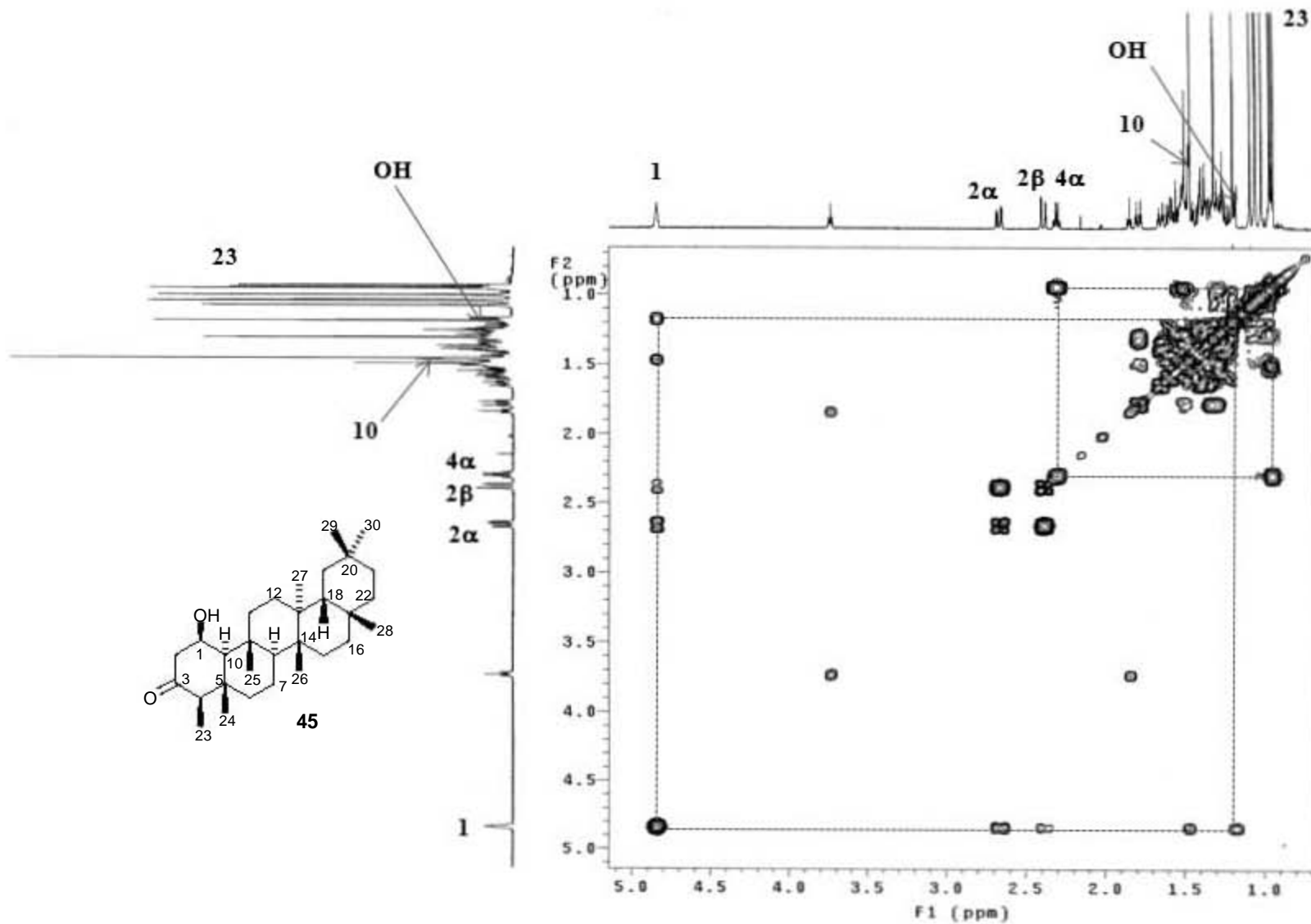




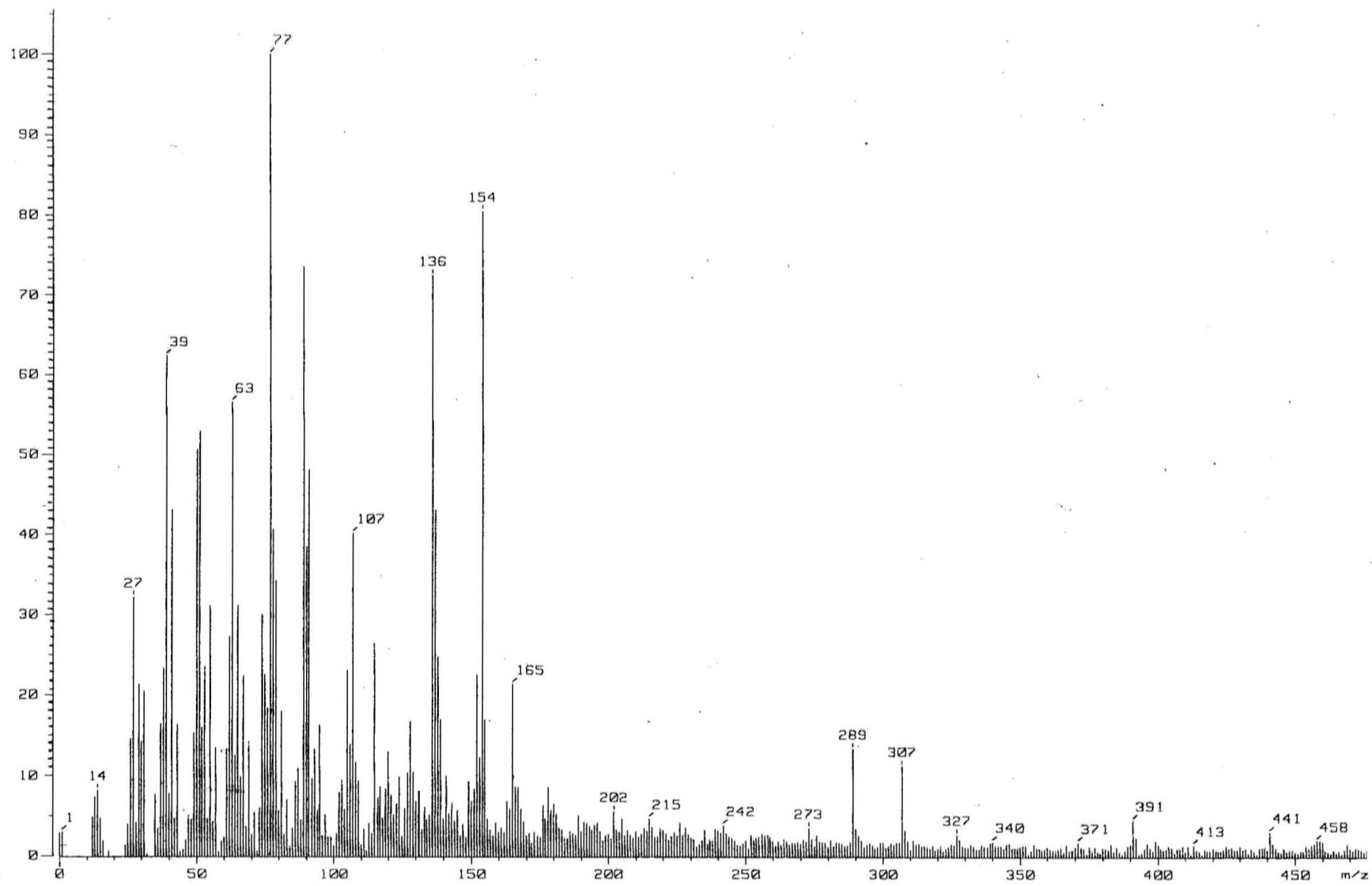
Espectro 8. RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , 50°C) de **45**



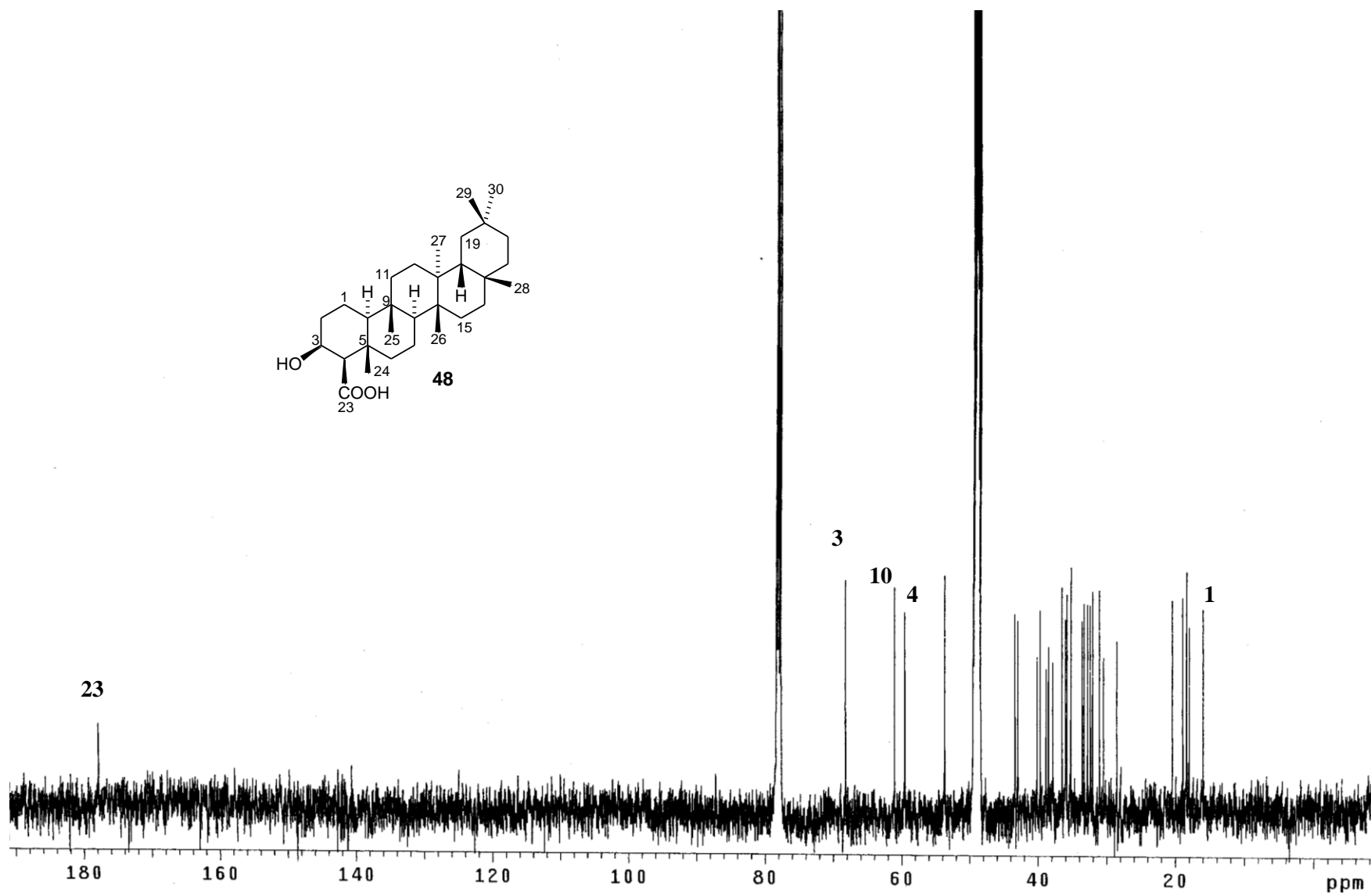
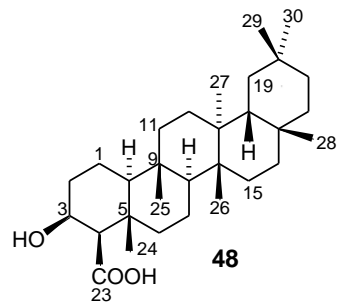
Espectro 9. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , 50°C) de 45



Espectro 10. Experimento COSY (500 MHz, CDCl₃, 50°C) de **45**

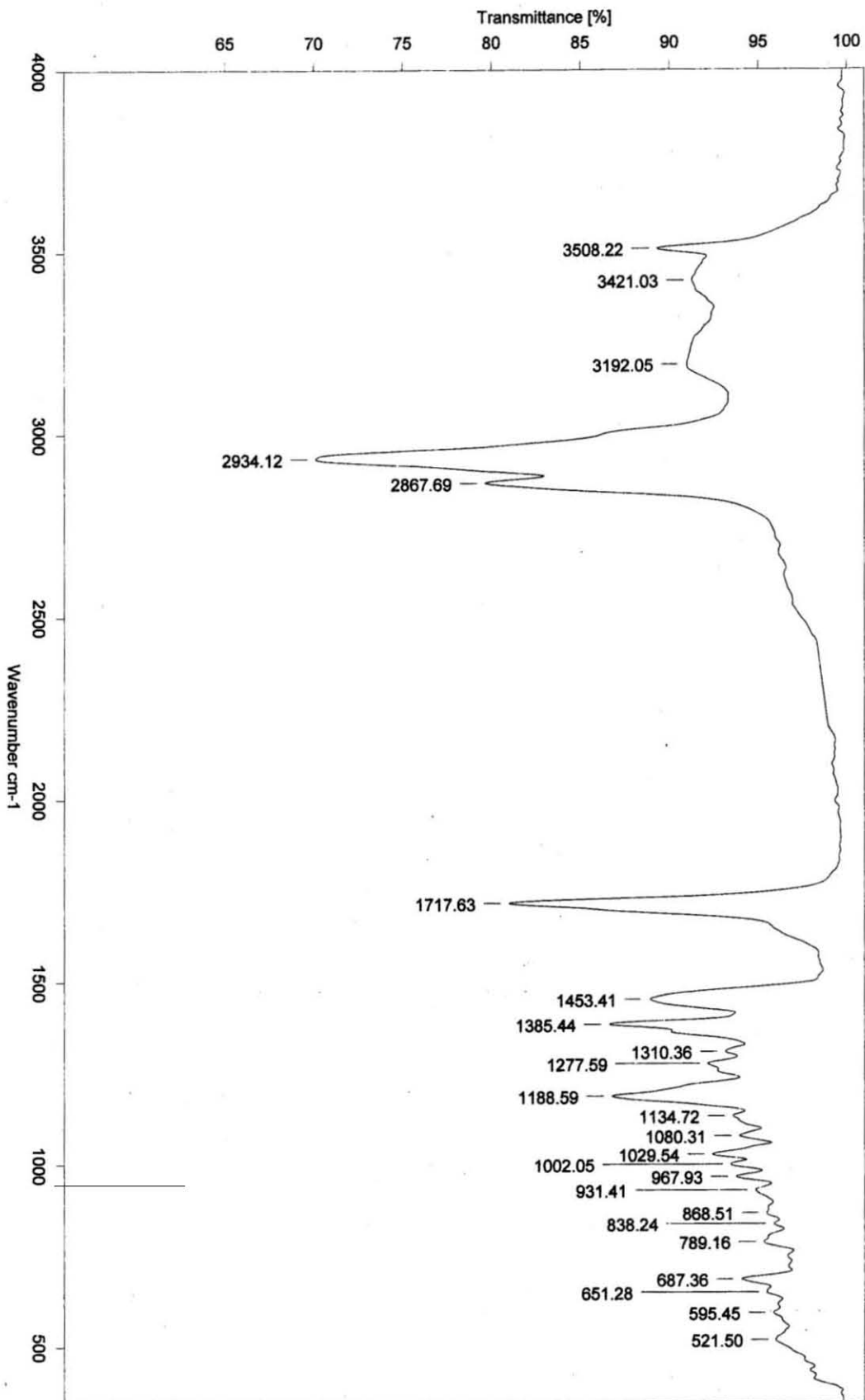


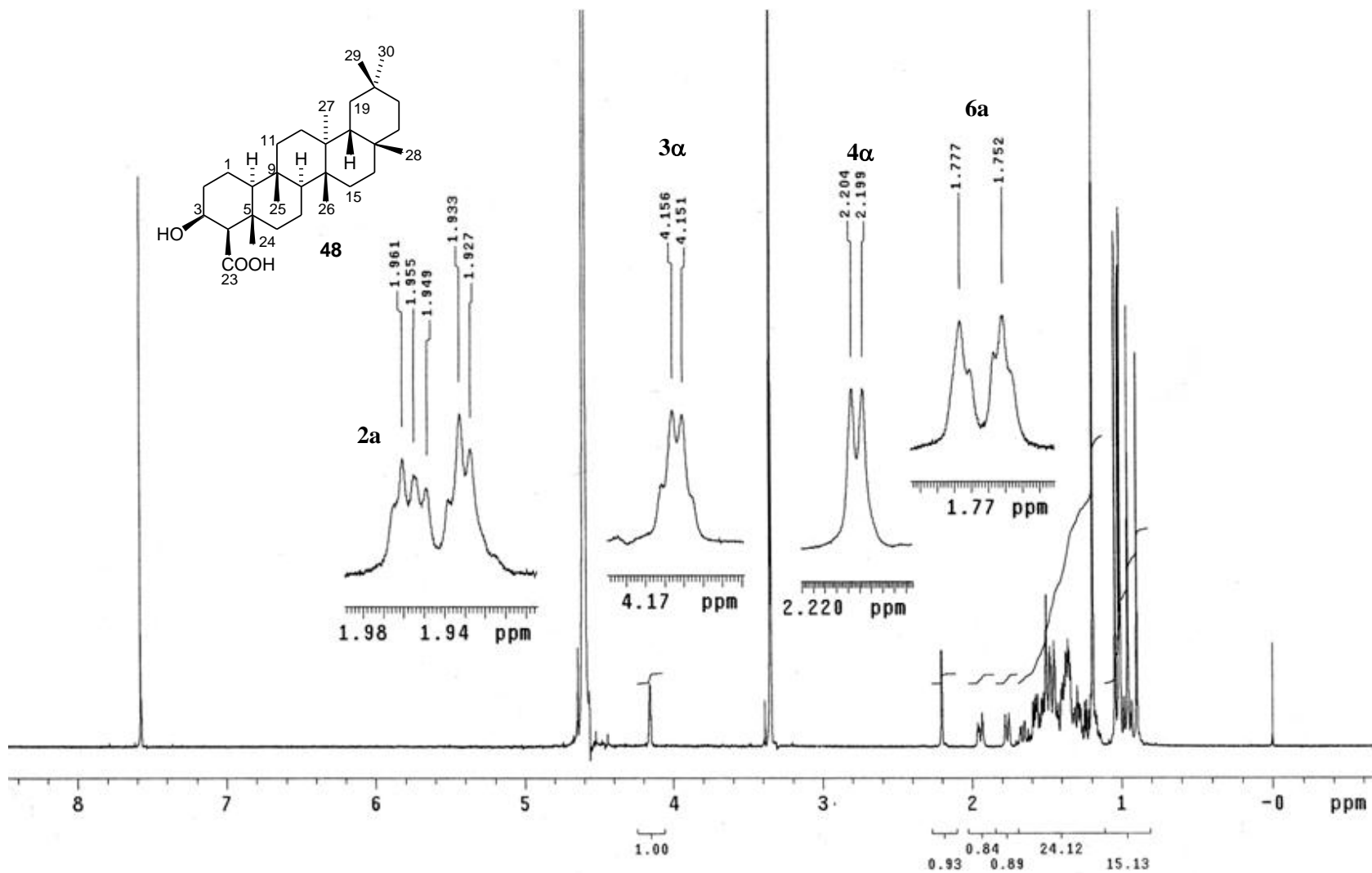
Espectro 11. EM-FAB de 48



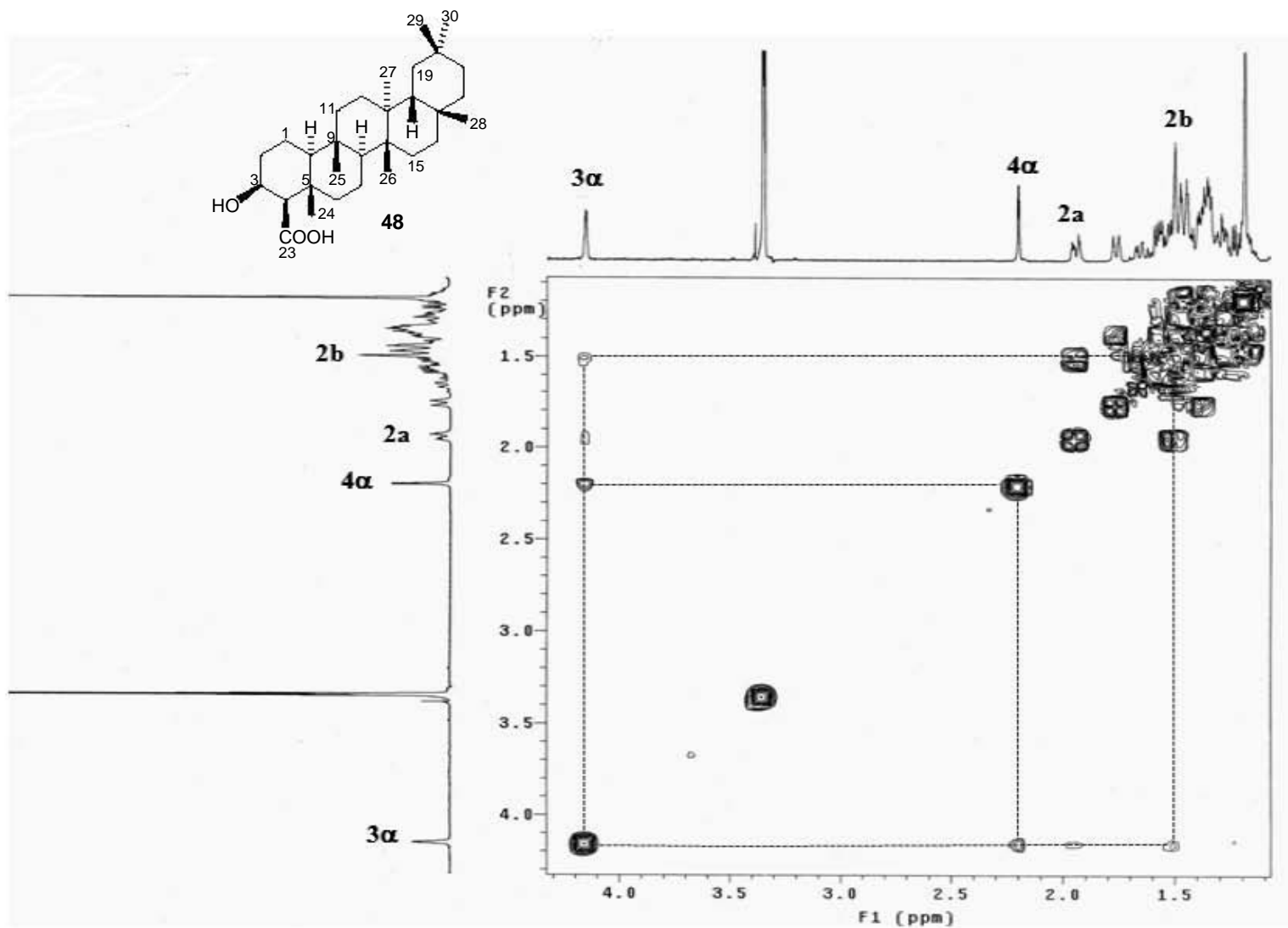
Espectro 12. RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}/1:1$) de **48**

Espectro 13. IR (KBr) de 48

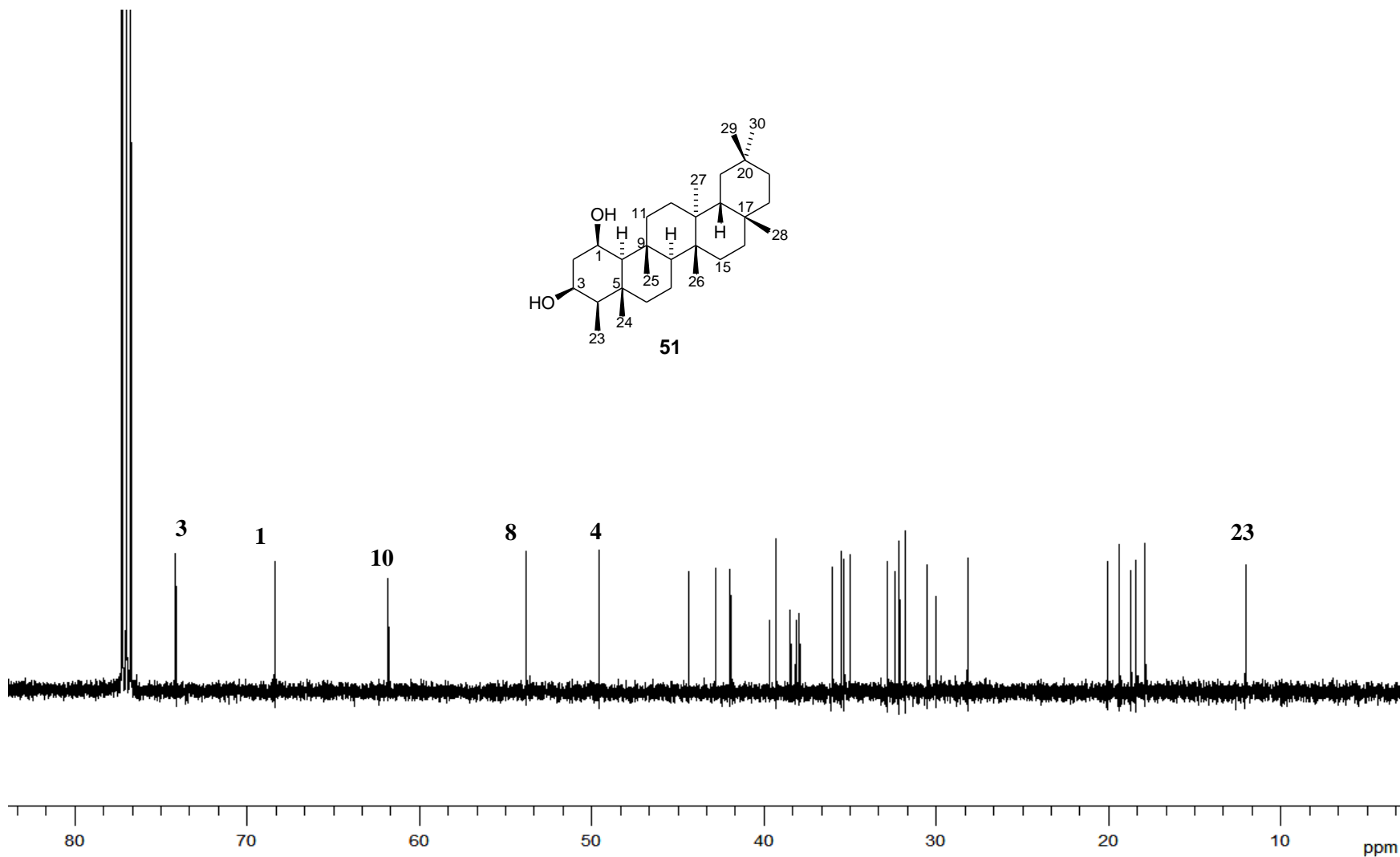
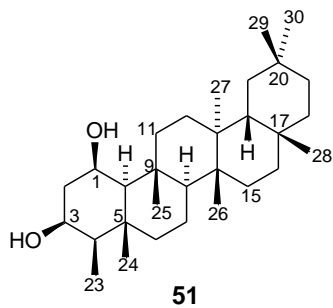




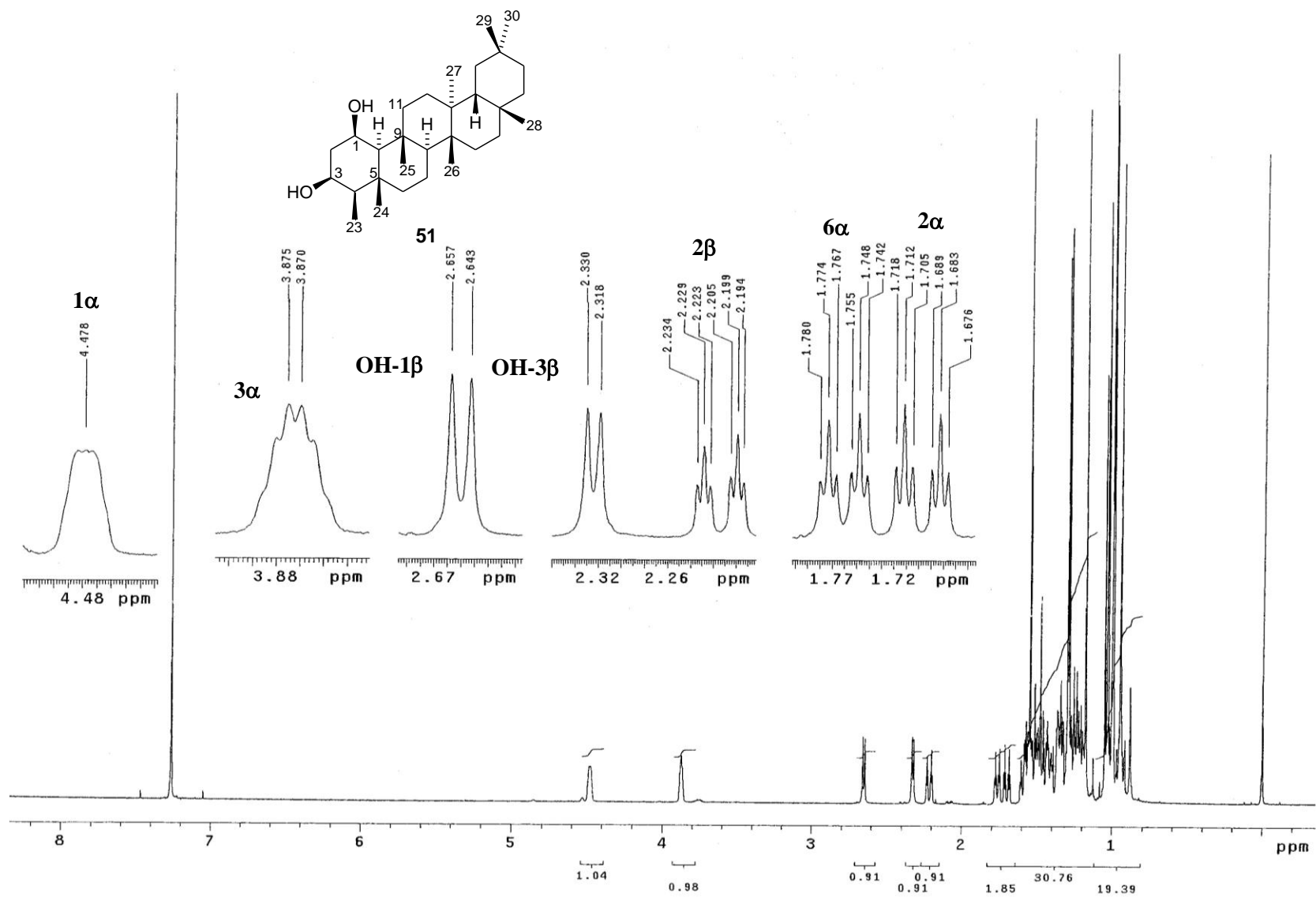
Espectro 14. RMN ^1H (500 MHz, $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}/1:1$) de **48**



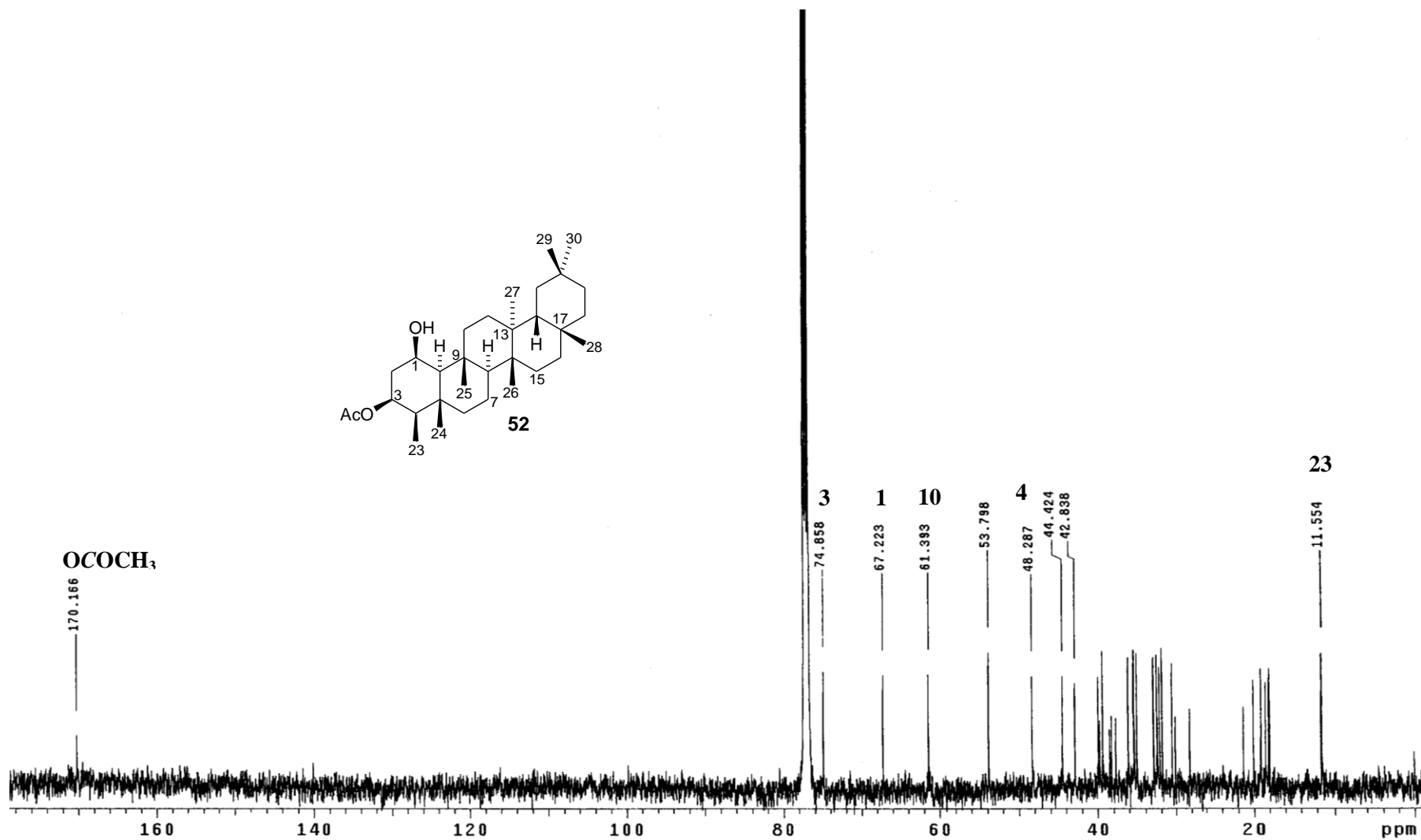
Espectro 15. Experimento COSY (500 MHz, CDCl₃:CD₃OD/1:1) de **48**



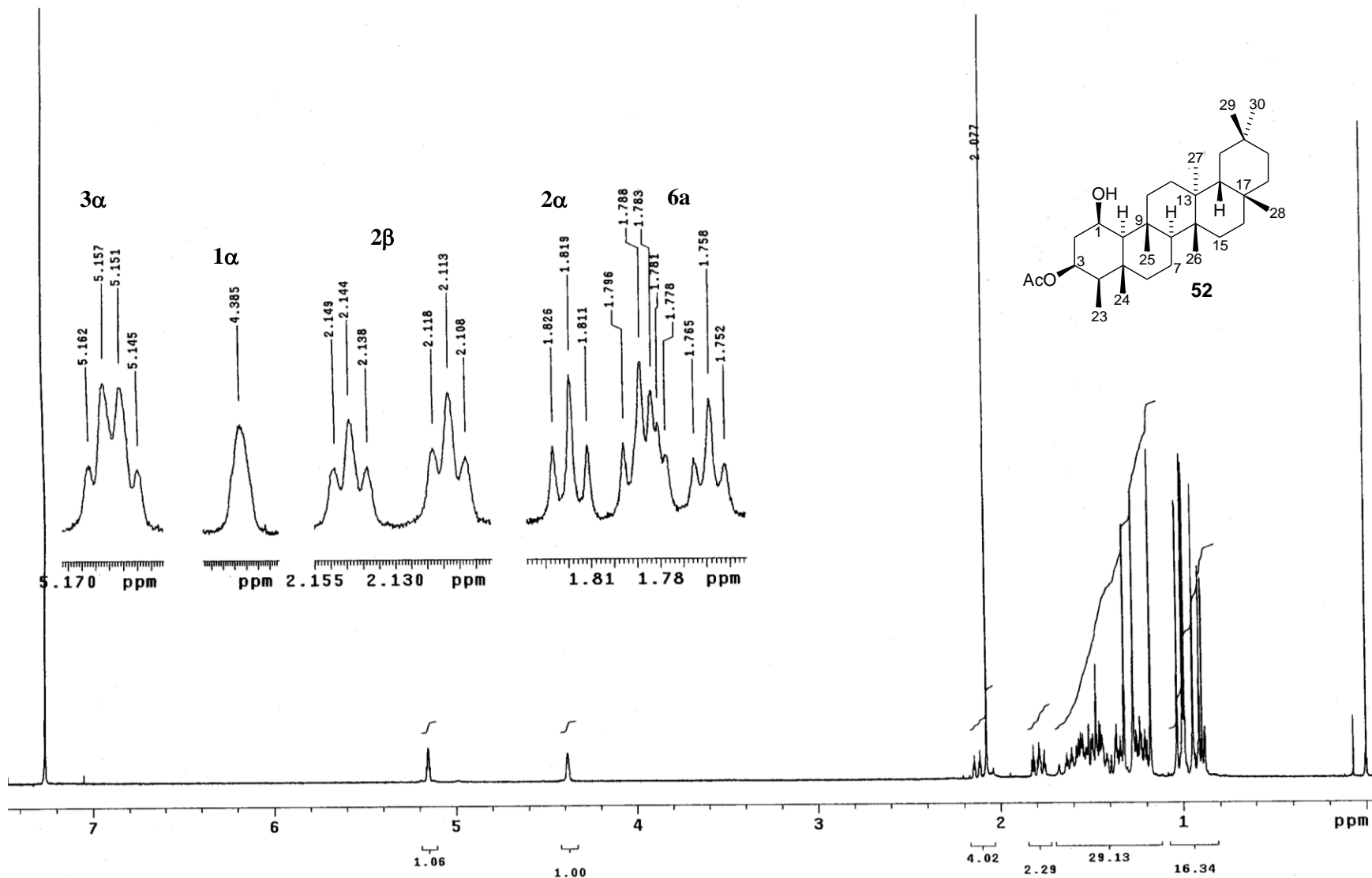
Espectro 16. RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de **51**



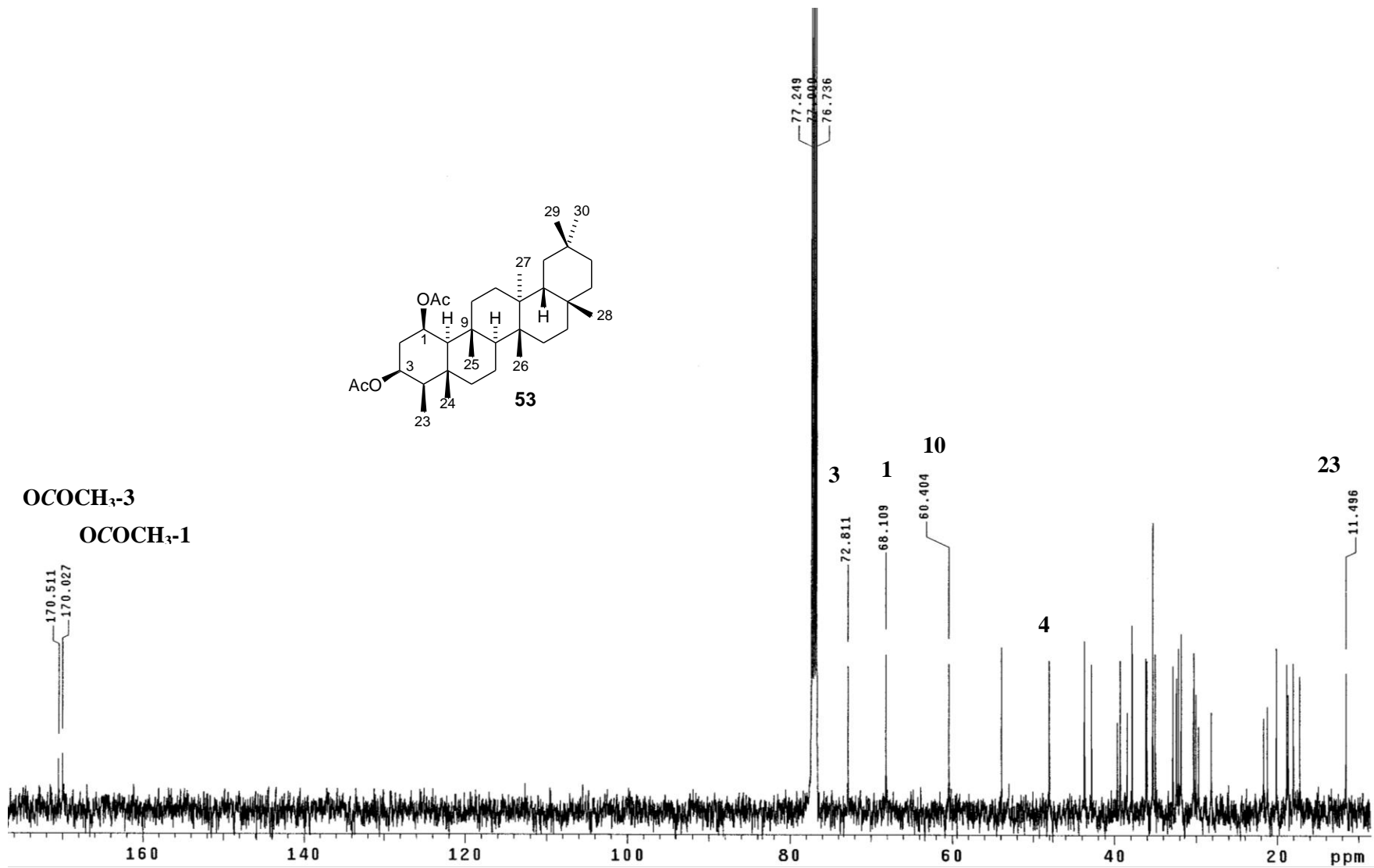
Espectro 17. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 51



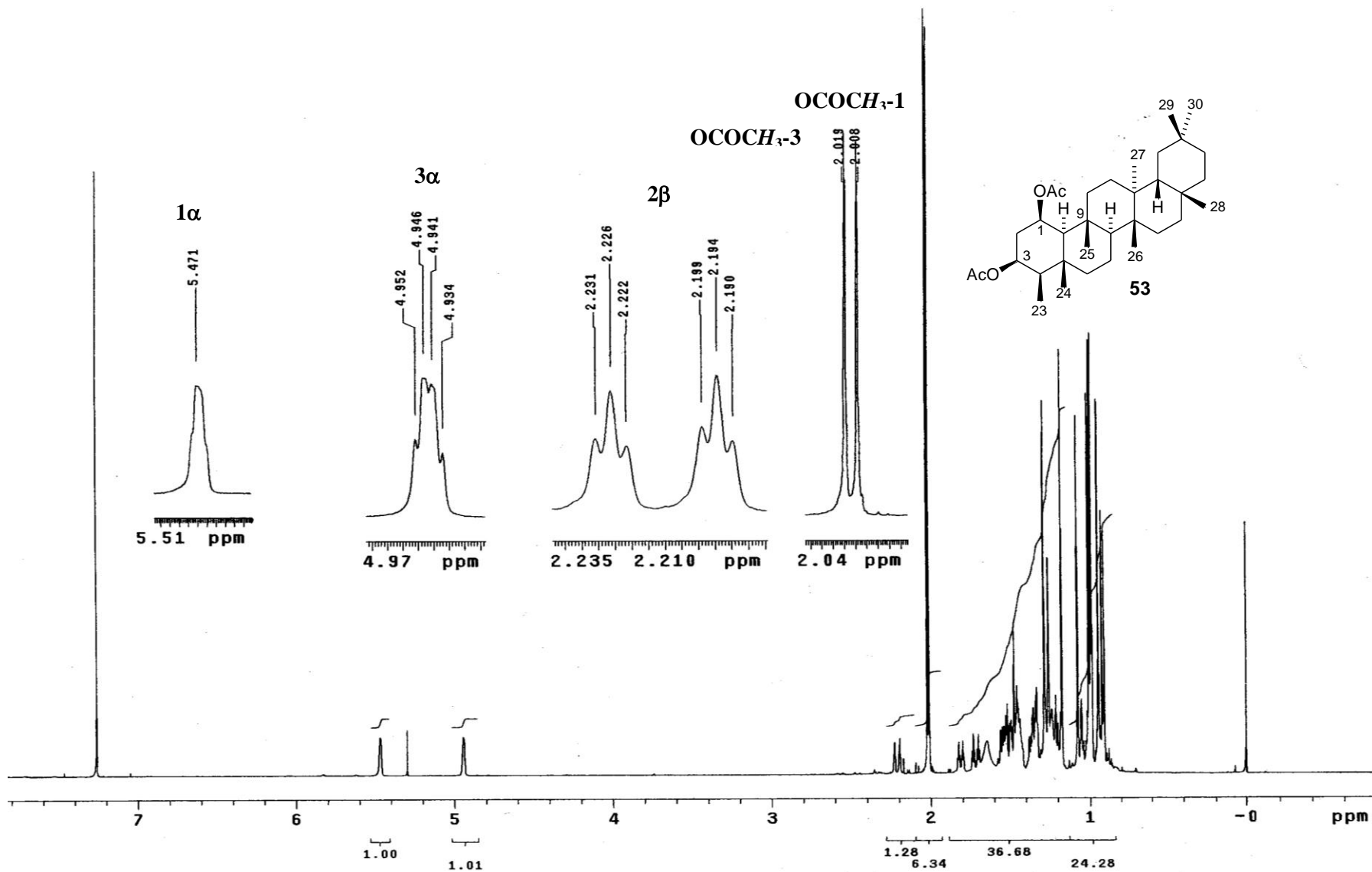
Espectro 18. RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de 52



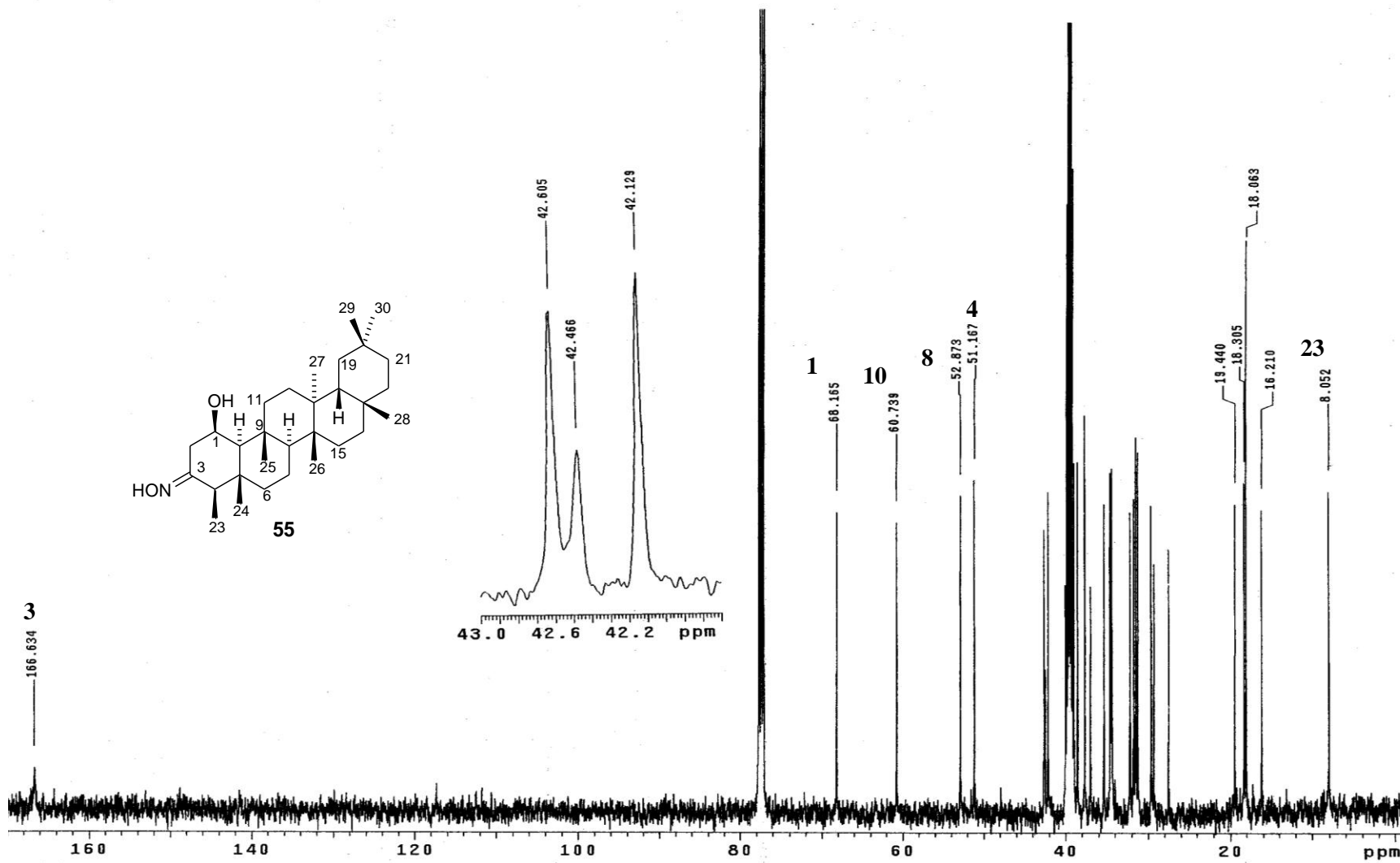
Espectro 19. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **52**



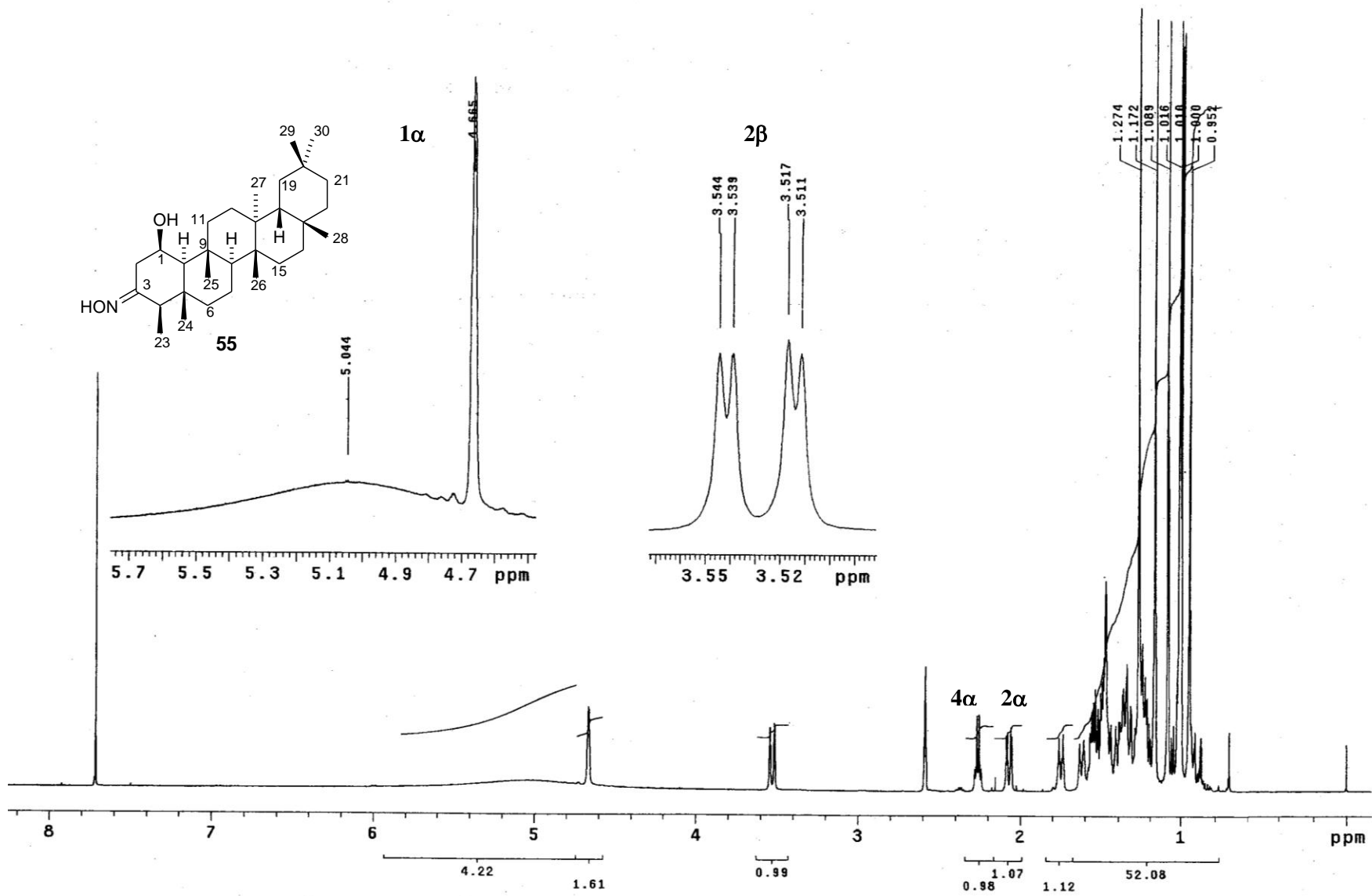
Espectro 20. RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de **53**



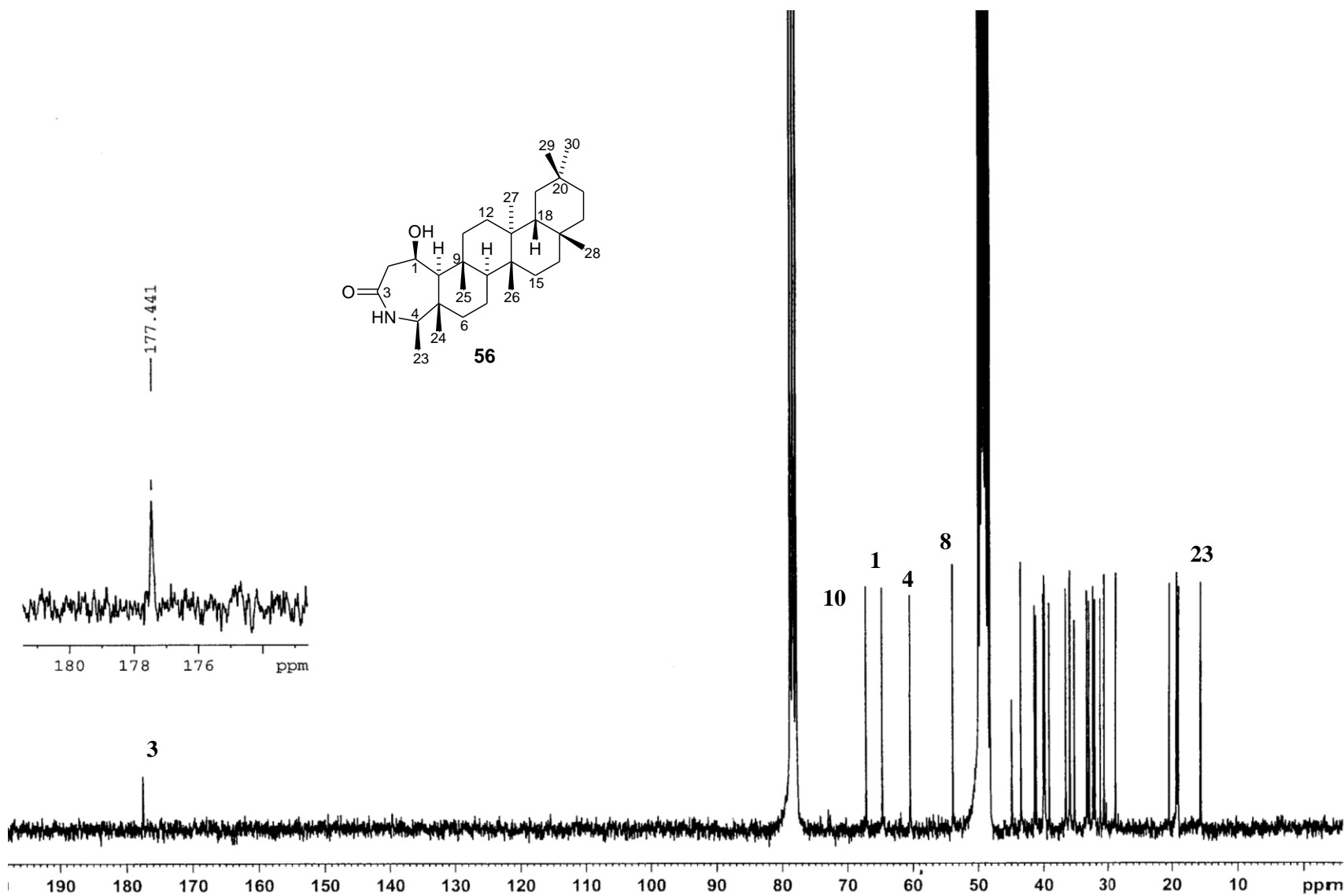
Espectro 21. RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) de **53**



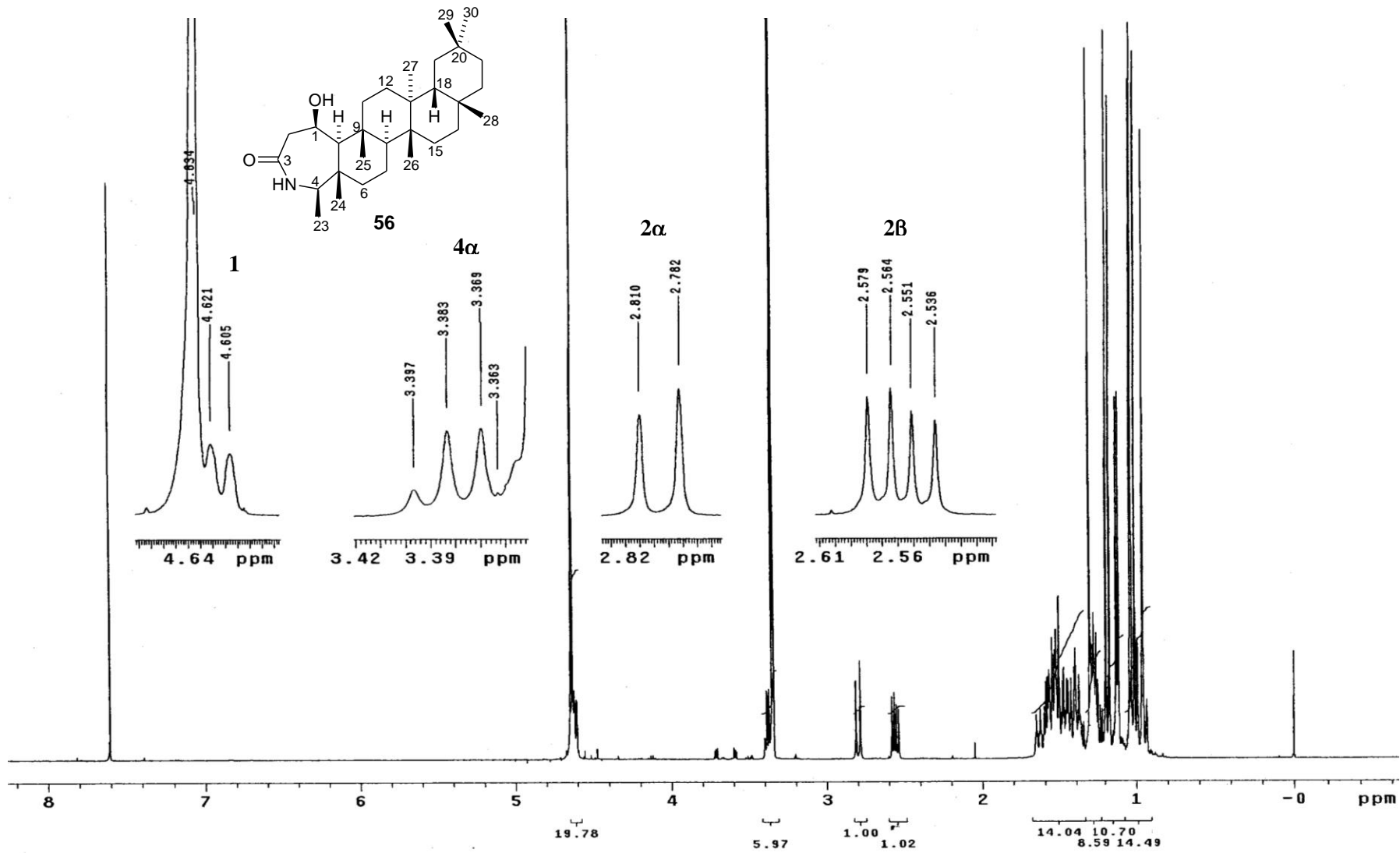
Espectro 22. RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 -DMSO- d_6 , 3:1) de 55



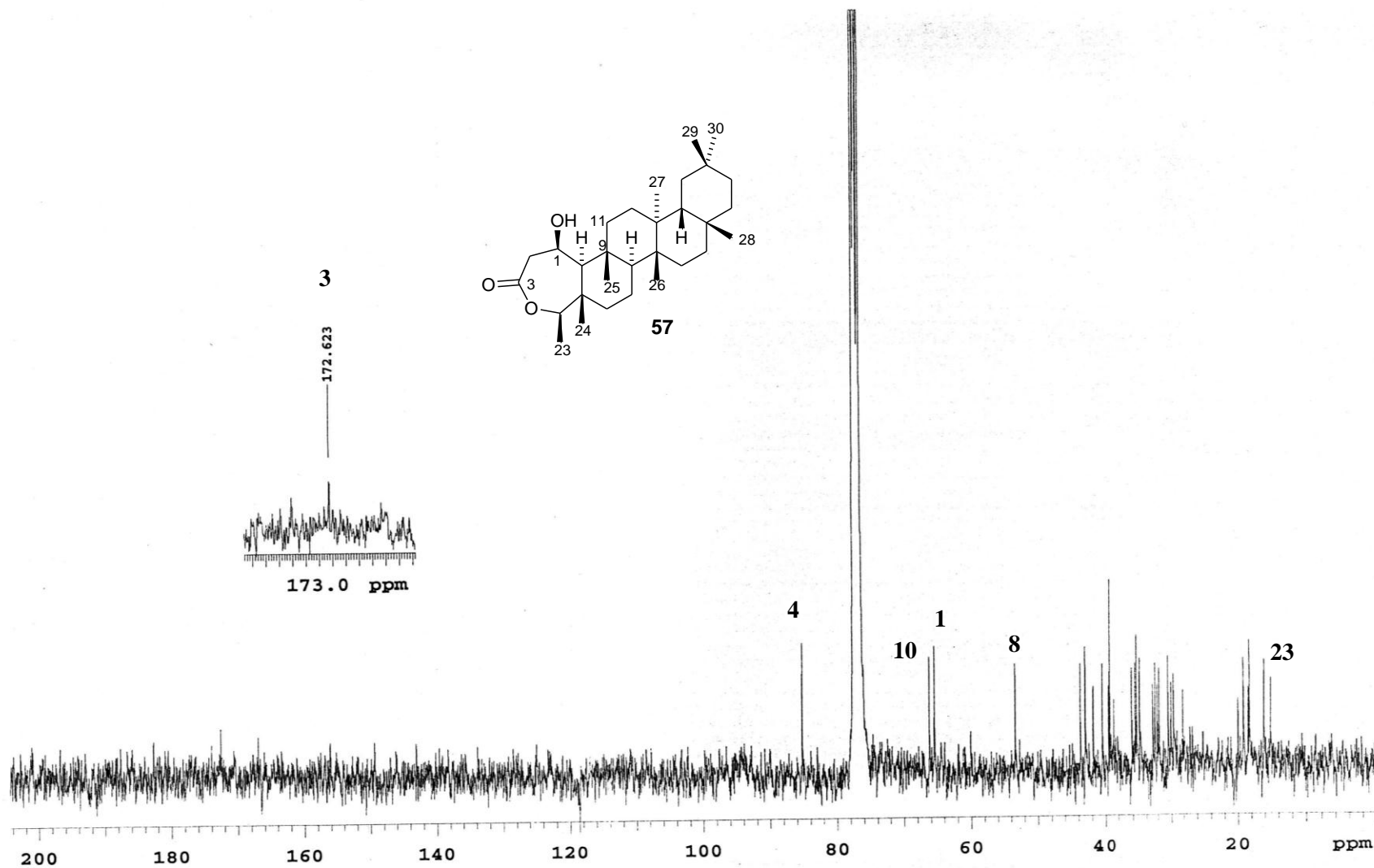
Espectro 23. RMN ^1H (500 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-DMSO-}d_6$, 3:1) de 55



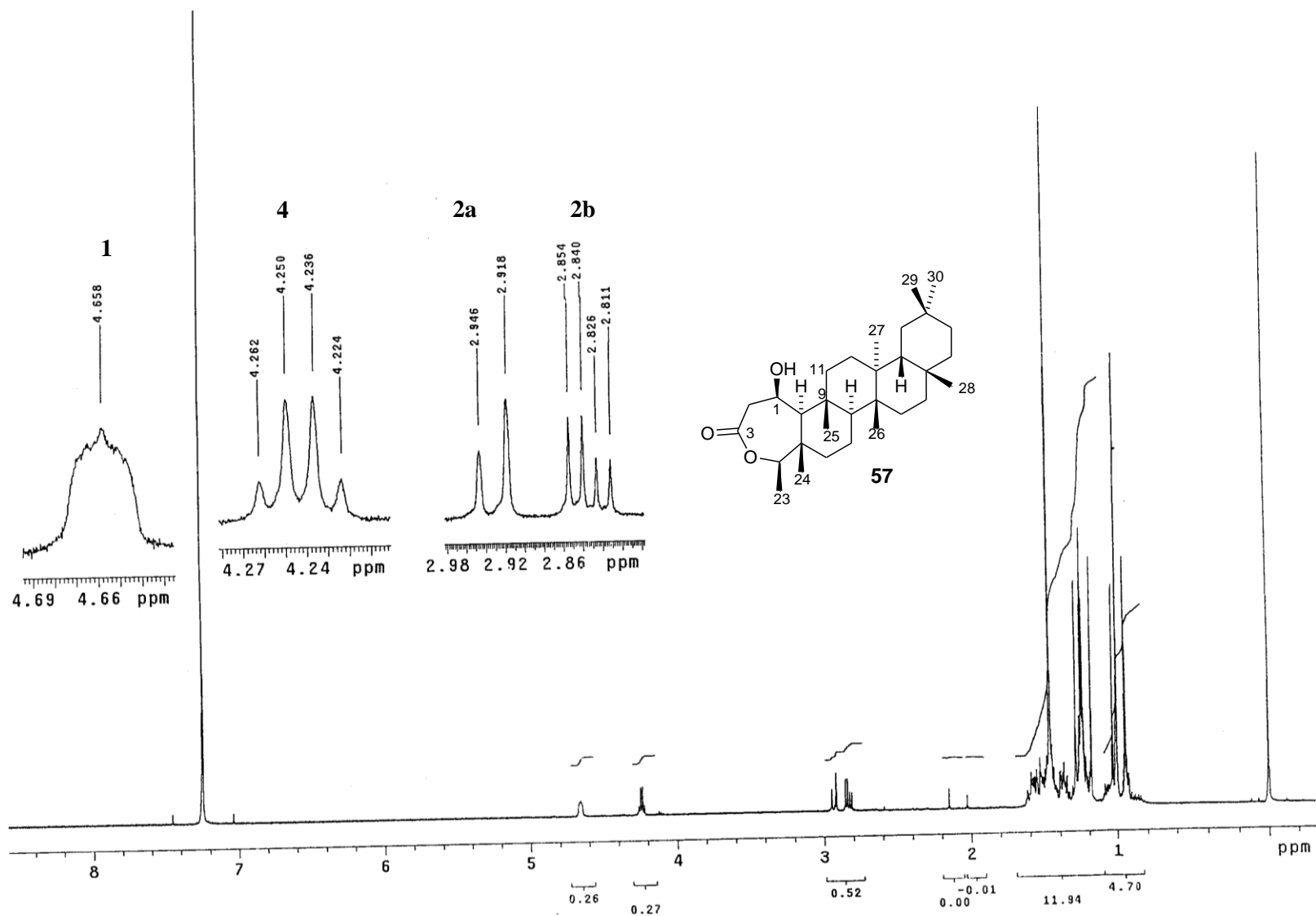
Espectro 24. RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$, 1:1) de **56**



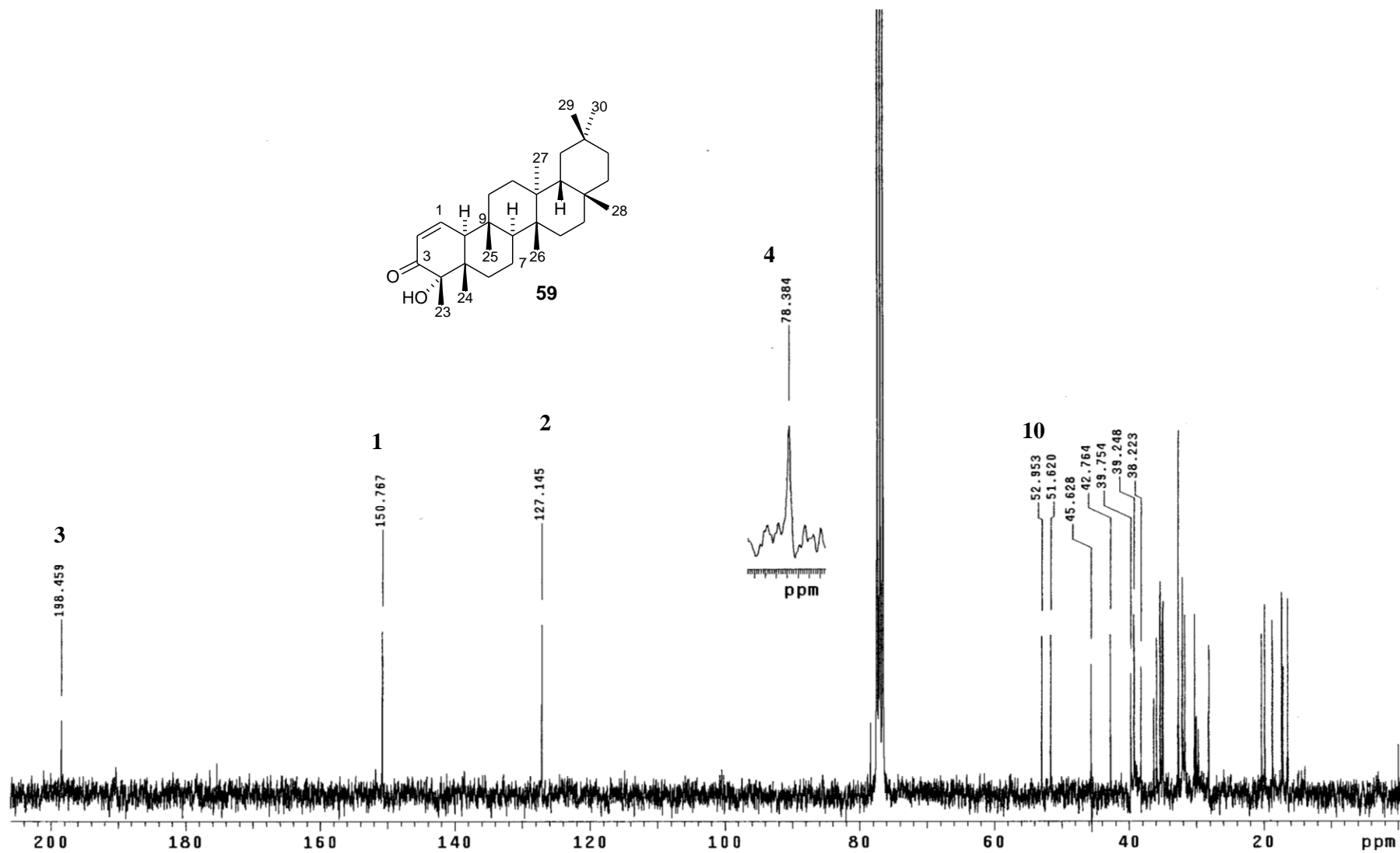
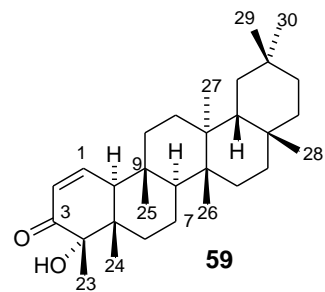
Spectro 25. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃-CD₃OD, 1:1) de 56



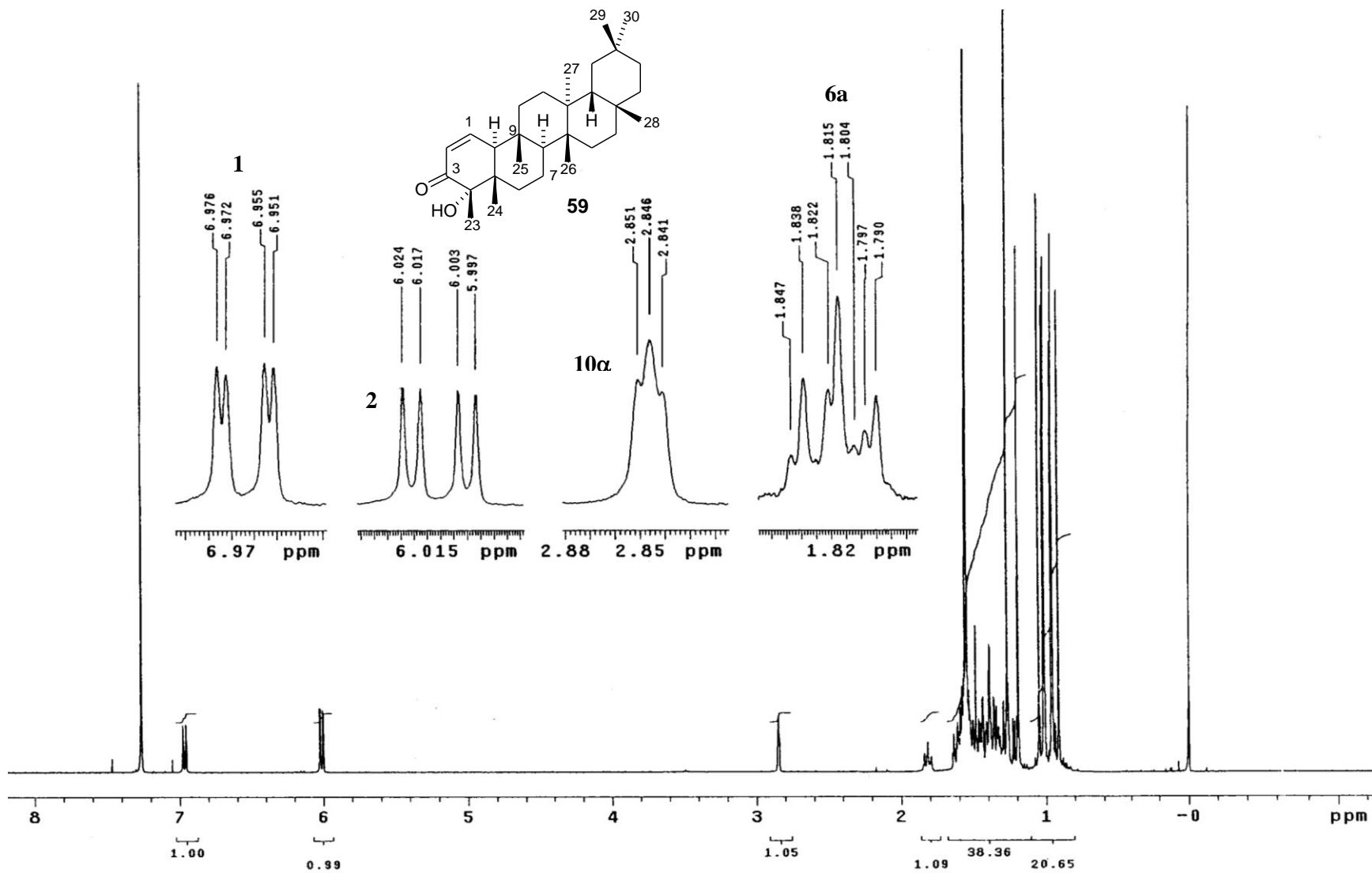
Espectro 26. RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de 57



Espectro 27. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **57**



Espectro 28. RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **59**



Espectro 29. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **59**

PUBLICACIÓN

Triterpenes from *Garcia parviflora*. Cytotoxic Evaluation of Natural and Semisynthetic Friedelanes

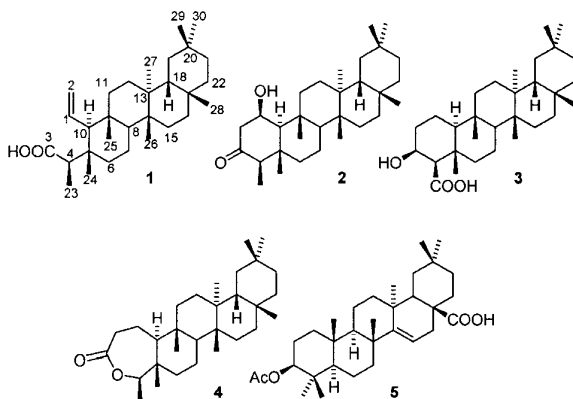
Blanca M. Reyes, María Teresa Ramírez-Apan, Rubén A. Toscano, and Guillermo Delgado*

Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Circuito Exterior, Coyoacán 04510, México D. F.

Received July 12, 2010

Three new friedelane-type triterpenes, 1,2-dehydro-2,3-secofriedelan-3-oic acid (**1**), 1 β -hydroxyfriedelin (**2**), and 3 β -hydroxyfriedelan-23-oic acid (**3**), and the known compounds friedelin-3,4-lactone (**4**), acetyl aleuritic acid (**5**), 4-hydroxy-5-propionyl-1,3-di-*O*-methylpyrogallol, elemicin, and (–)-syringaresinol were isolated from the leaves of *Garcia parviflora*. The structures of **1–3** were elucidated by spectroscopic methods, including 1D and 2D NMR, HREIMS, X-ray, and CD analysis. Some derivatives of **2** (**6–14**) were prepared via oxidation, reduction, and esterification. The natural triterpenes and the semisynthetic friedelane derivatives were tested for cytotoxic activity against human cancer cell lines U251, PC-3, K562, HCT-15, MCF-7, and SKLU-1. Compound **5** was cytotoxic against U251 cells.

Members of the plant family Euphorbiaceae have provided various bioactive metabolites,¹ including pro-inflammatory,² anti-inflammatory,³ antiviral,⁴ and cytotoxic⁵ compounds, represented by cytotoxic triterpenes,^{6,7} diterpenes,⁸ and sesquiterpenes.^{7,9} *Garcia parviflora* Lundell (Euphorbiaceae) is a tree endemic to Mexico,¹⁰ and its chemical constituents have not been investigated previously. Three new friedelanes (**1–3**) have been isolated and characterized from this material, together with some known compounds. Previous publications^{11,12} have reported the preparation of several compounds by modifying the A ring of friedelane triterpenes, which afforded derivatives with cytotoxic activity. Therefore, we prepared some selected derivatives of **2** (**6–14**) via oxidation, reduction, and esterification. The natural triterpenes and the semisynthetic friedelane derivatives were tested for cytotoxicity against breast (MCF-7), leukemia (K562), central nervous system (U251, Glia), prostate (PC-3), colon (HCT-15), and lung (SKLU-1) cancer cell lines.



Results and Discussion

The hexane, ethyl acetate, and methanol extracts obtained from the aerial parts of *G. parviflora* were evaluated in a cytotoxicity assay using the sulforhodamine B colorimetric method.¹³ In this assay, the hexane and ethyl acetate extracts inhibited growth of cells in the U251, PC3, K562, SKLU-1, and MCF-7 cancer cell lines (between 60% and 100% at 50 μ g/mL), which encouraged us to investigate their bioactive principles. Fractionation of the hexane

extract led to the isolation and characterization of the new triterpene 1,2-dehydro-2,3-secofriedelan-3-oic acid (**1**) and the known compounds friedelin-3,4-lactone (**4**),¹⁴ acetyl aleuritic acid (**5**),^{15,16} and β -sitosterol. The new natural products 1 β -hydroxyfriedelin (**2**) and 3 β -hydroxyfriedelan-23-oic acid (**3**) and the known compounds 4-hydroxy-5-propionyl-1,3-di-*O*-methylpyrogallol¹⁷ and elemicin^{18,19} were isolated from the ethyl acetate extract. The methanol extract yielded the known compounds (–)-syringaresinol^{20,21} and β -sitosterol- β -D-glucopyranoside.

Compound **1** was obtained as a white solid. Its molecular formula was established as C₃₀H₅₀O₂ from the HRFABMS (m/z 443.3886 [M + H]⁺), indicating six degrees of unsaturation. The IR spectrum showed absorptions indicating OH (3375 cm⁻¹) and carbonyl (1693 cm⁻¹) groups. Analysis of the ¹³C NMR (Table 1) spectrum, with the aid of DEPT and HSQC experiments, revealed the presence of 30 signals involving eight methyl (δ_C 34.9, 32.1, 31.8, 20.8, 20.3, 18.9, 18.7, and 11.7), nine sp³ methylene (δ_C 39.3, 36.6, 36.0, 35.3, 34.3, 32.8, 32.3, 30.3, and 17.7), one sp² methylene (δ_C 118.7), four sp³ methine (δ_C 60.6, 52.4, 47.8, and 42.8) with one sp² (δ_C 135.2), and seven quaternary carbons including the carbonyl group of a carboxylic acid (δ_C 179.5, 39.7, 38.6, 38.5, 37.0, 30.0, and 28.2). The ¹H NMR spectrum (Table 1) showed seven tertiary methyl singlets and one secondary methyl doublet; these data were in agreement with the structure of a friedelane skeleton, ascribing the signal at δ_H 1.09 ($J = 7.0$ Hz) to H-23. The signals at δ_H 5.74 (ddd, $J = 10.0, 10.5, 17.0$ Hz), 5.13 (dd, $J = 10.0, 2.5$ Hz), and 4.98 (dd, $J = 17.0, 2.5$ Hz) indicated a terminal double bond, attributed to H-1, H-2a, and H-2b, respectively, in agreement with the assignments from the HSQC spectrum for the signals at δ_C 135.2 (C-1) and 118.7 (C-2). The olefinic hydrogens exhibited HMBC correlations with a methine carbon at δ_C 60.6 (C-10) and its corresponding hydrogen exhibited a resonance at δ_H 1.72 (d, $J = 10.5$ Hz, H-10 α), confirming that the vinylic residue was at C-10. The ¹H NMR spectrum revealed a quartet at δ_H 2.48 ($J = 7.0$ Hz), which corresponded to the hydrogen attached to C-4 (δ_C 47.8), and this signal showed HMBC correlations with the quaternary carbons at δ_C 179.5 (C-3) and 38.6 (C-5), with a methylene carbon at δ_C 34.3 (C-6), with a methine carbon at δ_C 60.6 (C-10), and with the methyl carbons at δ_C 11.7 (C-23) and 20.8 (C-24). The H-23 methyl protons (δ_H 1.09) showed HMBC correlations with the carboxylic acid carbon C-3 (δ_C 179.5) and with the quaternary carbon C-5 (δ_C 38.6). These correlations confirmed the location of the carboxylic group, and the additional ¹H and ¹³C NMR signals (Table 1) were similar to those of friedelin. Thus, **1** was 1,2-dehydro-2,3-secofriedelan-3-oic acid, and the configuration at C-4 was proposed as *R* considering analogy with other naturally occurring friedelanes.

* Corresponding author. Tel: (+52-55)-5622-4446. Fax: (+52-55)-5616-2217. E-mail: delgado@servidor.unam.mx.

Table 1. ^1H and ^{13}C NMR Spectroscopy Data for **1–3** (δ in ppm)

position	1		2		3	
	δ_{C} , mult.	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} , mult.	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C} , mult.	δ_{H} (J in Hz)
1	135.2, CH	5.74, ddd (17.0, 10.5, 10.0)	71.4, CH	4.84, br s	16.0, CH ₂	1.50 ^e
2a	118.7, CH ₂	5.13, dd (10.0, 2.5)	52.7, CH ₂	2.66, dd (14.0, 4.5)	33.5, CH ₂	1.94, m
2b		4.98, dd (17.0, 2.5)		2.38, dd (14.0, 2.5)		1.50 ^e
3	179.5, qC		211.3, qC		68.2, CH	4.15, ddd (2.5, 2.5, 2.5)
4	47.8, CH	2.48, q (7.0)	59.1, CH	2.30, q (6.5)	59.5, CH	2.20, d (2.5)
5	38.6, qC		43.9, qC		38.5, qC	
6a	34.3, CH ₂	1.64, ddd (13.5, 3.5, 3.0)	34.3, CH ₂	1.78, ddd (13.5, 3.5, 3.5)	42.9, CH ₂	1.76, br d (12.5)
6b		1.53 ^c				1.37 ^c
7	17.7, CH ₂	1.47 ^c	18.8, CH ₂		18.0, CH ₂	1.45 ^c
8	52.4, CH	1.20 ^c	53.9, CH	1.33 ^c	53.7, CH	1.36 ^c
9	37.0, qC		38.6, qC		37.9, qC	
10	60.6, CH	1.72, d (10.5)	61.6, CH	1.47, br s	61.0, CH	0.98, br s
11a	36.6, CH ₂	1.19 ^c	35.7, CH ₂	1.64, ddd (13., 3.0, 3.0)	36.0, CH ₂	1.45 ^c
11b		1.14, m				
12a	30.3, CH ₂	1.28, m	30.4, CH ₂	1.39, m	31.0, CH ₂	1.34, m
12b						
13	39.7, qC		39.8, qC		40.2, qC	
14	38.5, qC		38.5, qC		38.8, qC	
15a	32.3, CH ₂	1.50 ^c	32.7, CH ₂	1.55 ^c	32.8, CH ₂	1.52, m
15b		1.30 ^c		1.29, m		1.31, m
16a	36.0, CH ₂	1.55 ^c	36.2, CH ₂		36.5, CH ₂	1.57 ^c
16b		1.36 ^c				1.36 ^c
17	30.0, qC		30.1, qC		30.5, qC	
18	42.8, CH	1.53 ^c	43.0, CH	1.58, dd (11.0, 6.0)	43.4, CH	1.57, dd (11.0, 6.0)
19a	35.3, CH ₂	1.36 ^c	35.5, CH ₂		35.8, CH ₂	1.38 ^c
19b		1.19 ^c				1.22, dd (14.0, 6.0)
20	28.2, qC		28.2, qC		28.5, qC	
21a	32.8, CH ₂	1.46 ^c	33.0, CH ₂	1.50 ^c	33.3, CH ₂	1.50 ^c
21b		1.25 ^c				1.28, m
22a	39.3, CH ₂	1.49, m	39.3, CH ₂	1.50, m	39.7, CH ₂	1.49 ^c
22b		0.93 ^c				0.94 ^c
23	11.7, CH ₃	1.09, d (7.0)	6.9, CH ₃	0.94, d (6.5)	177.8, qC	
24	20.8, CH ₃	1.11, s	17.4, CH ₃	1.08, s	18.40, CH ₃	1.19, s
25	18.9, CH ₃	0.95, s	19.2, CH ₃	1.31, s	18.43, CH ₃	0.89, s
26	20.3, CH ₃	0.995, s	20.2, CH ₃	1.04, s	20.4, CH ₃	1.01, s
27	18.7, CH ₃	1.02, s	18.7, CH ₃	1.05, s	18.9, CH ₃	1.04, s
28	32.1, CH ₃	1.17, s	32.2, CH ₃	1.19, s	32.2, CH ₃	1.19, s
29	31.8, CH ₃	0.990, s	31.8, CH ₃	1.01, s	32.4, CH ₃	1.00, s
30	34.9, CH ₃	0.94, s	34.9, CH ₃	0.96, s	35.2, CH ₃	0.95, s

^a Recorded in CDCl₃ (**1**, **2** [50 °C]), CDCl₃-CD₃OD (1:1) (**3**) at 500 MHz. ^b Recorded in CDCl₃ (**1**, **2** [50 °C]), CDCl₃-CD₃OD (1:1) (**3**), at 125 MHz (**1**, **3**) and 75 MHz (**2**). ^c Overlapping signals.

Compound **2** was isolated as colorless needles. Its IR spectrum exhibited bands for OH (3370 cm⁻¹) and carbonyl (1703 cm⁻¹) groups. The molecular formula was established as C₃₀H₅₀O₂ from the HRFABMS ion at m/z 443.3884 [M + H]⁺, indicating six degrees of unsaturation. The ^{13}C NMR spectrum (Table 1) had 30 resonances, and the DEPT spectra showed the presence of eight methyl, 10 methylene, five methine including one carbinol (δ_{C} 71.4), and seven quaternary carbons with one carbonyl group at δ_{C} 211.3. The ^1H NMR spectrum (Table 1) showed eight methyl signals, seven singlets (δ_{H} 1.31, 1.19, 1.08, 1.05, 1.04, 1.01, and 0.96), and a doublet at δ_{H} 0.94 ($J = 6.5$ Hz), similar to those described for **1**. This last signal was ascribed to H-23 since it showed a HSQC correlation with the shielded methyl carbon resonance at δ_{C} 6.9 and HMBC correlations with a methine carbon at δ_{C} 59.1 (C-4) and with the quaternary carbons at δ_{C} 43.9 (C-5) and 211.3 (C-3), establishing a ketone group at C-3. A secondary OH group was evident in the ^1H NMR spectrum by a broad signal located at δ_{H} 4.84, which corresponded to the carbinol methine proton H-1. The existence of this group was supported by the signal of an oxygenated carbon at δ_{C} 71.4 in the ^{13}C NMR spectrum. Two doublets of doublets [δ_{H} 2.66 ($J = 14.0, 4.5$ Hz) and 2.38 ($J = 14.0, 2.5$ Hz)] were assigned to methylene protons H-2a and H-2b, respectively, attached to C-2 (δ_{C} 52.7). The quartet signal at δ_{H} 2.30 ($J = 6.5$ Hz) corresponded to the axial proton H-4 α . The OH group was assigned a β -orientation from the NOESY experiments, which exhibited interactions of equatorial proton H-1 α with H-10 α , H-8 α , and H-2a and H-2b. The additional ^1H and ^{13}C NMR signals were

similar to those reported for friedelane triterpenes. The structure of **2** was confirmed by X-ray diffraction analysis of crystals grown from ethyl acetate (Figure 1). Its absolute configuration was determined as depicted in **2** from a circular dichroism spectrum that showed a negative Cotton effect at 295 nm ($\Delta\epsilon -50.41$) due to the $n \rightarrow \pi^*$ transition of the carbonyl group.²² This configuration is characteristic for naturally occurring friedelanes.

Compound **3** was obtained as white crystals. Its molecular formula, C₃₀H₅₀O₃ (HRFABMS, m/z 459.3841 [M + H]⁺), indicated six degrees of unsaturation. IR absorptions at 3508 and 1717 cm⁻¹ and the ^{13}C signals at δ_{C} 68.2 and 177.8 established the presence of OH and carbonyl groups. The ^{13}C NMR and DEPT spectra exhibited 30 signals involving seven methyl, 11 methylene, five methine, and seven quaternary carbons. The ^1H NMR spectrum showed six tertiary methyl singlets, of which two were overlapping methyls (H₃-24 and H₃-28). The signal at δ_{H} 4.15 (ddd, $J = 2.5, 2.5, 2.5$ Hz, H-3 α) placed a secondary OH at C-3 in **3**, supported by an oxygenated carbon at δ_{C} 68.2 in the ^{13}C NMR spectrum that correlated with H-1 (δ_{H} 1.50) in the HMBC spectrum. The doublet at δ_{H} 2.20 ($J = 2.5$ Hz) was assigned to the hydrogen attached to C-4 (δ_{C} 59.5), since it showed HMBC correlations with the carboxylic acid group at C-23 (δ_{C} 177.8), with C-5 (δ_{C} 38.5), and with C-24 (δ_{C} 18.4), and a COSY correlation with H-3 α . The coupling constant between H-3 and H-4 (2.5 Hz) established the β -orientation of the OH and carboxylic groups, and this was confirmed by NOESY interactions of H-4 α with H-3 α and H-10 α .

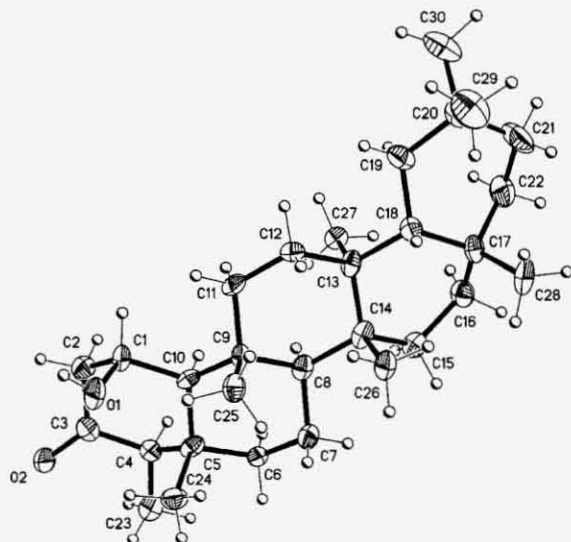


Figure 1. ORTEP drawing of **2** with atom labeling.

The additional ^1H and ^{13}C NMR (Table 1) signals were similar to those reported for friedelane triterpenes, verifying structure **3**.

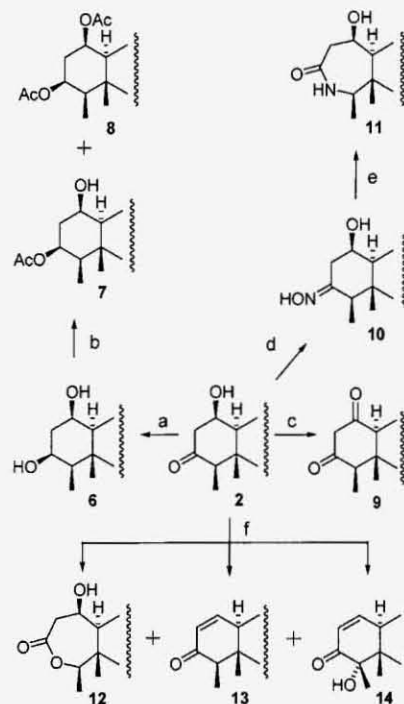
Friedelanes functionalized at ring A possess a variety of biological activities,²³ and we considered that compound **2** offered the possibility of various structural modifications. Therefore, some derivatives were prepared in order to explore the cytotoxic potential of the resulting semisynthetic friedelane derivatives. Reduction of **2** with NaBH_4 in $\text{THF-H}_2\text{O}$ ²⁴ under reflux afforded $1\beta,3\beta$ -dihydroxyfriedelane (**6**) in good yield, which was subjected to acetylation with Ac_2O -pyridine, yielding the monoacetyl (**7**) and diacetyl (**8**) derivatives. Oxidation of **2** by Jones's reagent²⁵ at room temperature produced the previously reported 1,3-diketone **9** in moderate yield.^{26,27} Reaction of **2** with hydroxylamine chloride²⁸ afforded oxime **10**, which was treated with *p*-TsCl,²⁸ producing the lactam **11**. Treatment of **2** with *m*-CPBA in CHCl_3 ²⁹ under reflux afforded **12–14**. Compound **13** has been reported previously.³⁰ The structures of the compounds obtained by these transformations (Scheme 1) were determined by conventional spectroscopic analyses (Tables 2 and 3).

The cytotoxicity of compounds **1–14** was tested against six human tumor cell lines. Compound **5** was cytotoxic against the U251 cell line, with IC_{50} 8.4 μM . Compounds **1**, **4**, and **6** exhibited weak activity in the same cell line, with IC_{50} 36.8, 17.1, and 22.8 μM , respectively, when compared to the positive control adriamycin (IC_{50} 0.3 μM). Compound **14** exhibited weak cytotoxicity against the HCT-15 cell line (IC_{50} 41.8 μM compared with adriamycin (IC_{50} 0.23 μM). Friedelin-3,4-lactone (**4**) and acetyl aleuritic acid (**5**) were more cytotoxic than 1,2-dehydro-2,3-secofriedelan-3-oic acid (**1**). All other compounds were noncytotoxic against the tested cell lines.

Experimental Section

General Experimental Procedures. Melting points were determined on a Fisher Johns apparatus and are uncorrected. Optical rotations were measured in CHCl_3 on a Perkin-Elmer 341 polarimeter using a sodium lamp at the wavelength 589 nm. UV data were measured on a Shimadzu UV-160 spectrophotometer. The CD spectrum was measured with a JASCO J-720 spectrometer. IR spectra were recorded on a Nicolet Magna FT-IR 750 spectrometer. ^1H (500 MHz), ^{13}C (125.0 MHz), and 2D NMR spectra (in CDCl_3 , DMSO, and CD_3OD) were obtained on a Varian Inova 500, and ^{13}C NMR (75.0 MHz) were obtained on a Varian Unity 300 spectrometer. Chemical shifts were expressed in parts per million (δ) relative to TMS as internal standard. EI and HRFAB mass spectra were measured on JEOL JMS-AX 505 HA and JEOL JMX-

Scheme 1. Friedelane Derivatives^a



^a Reagents: (a) NaBH_4 ; (b) Ac_2O , Py; (c) Jones reagent; (d) NH_2OH ; (e) *p*-TsCl, Py; (f) *m*-CPBA.

SX 102 A mass spectrometers, respectively. Analytical TLC was carried out on precoated silica gel 60 F₂₅₄ sheets (Merck). Column chromatography (CC) was performed using silica gel (230–400). All solvents were dried and distilled before use.

Plant Material. Aerial parts of *G. parviflora* were collected in Zacatal, Veracruz, México, during April 2003, and identified by Francisco Ramos Marchena. A voucher specimen was deposited at the National Herbarium (MEXU, voucher 1104455), Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México.

Extraction and Isolation. The air-dried plant material (leaves and branches, 5.7 kg) was powdered and extracted at room temperature consecutively with *n*-hexane (24 L \times 3), ethyl acetate (24 L \times 3), and methanol (24 L \times 2), and the extracts were concentrated to dryness in vacuo to obtain 27.7, 57.4, and 54.0 g of residues, respectively. The hexane extract was chromatographed on a silica gel (90 g) column with a gradient solvent system of hexane–EtOAc. The fractions (100 mL each) were monitored by TLC and pooled into seven main fractions. Fraction 3 (38.0 mg) was separated by preparative TLC using benzene–EtOAc (9:1) to yield 1,2-dehydro-2,3-secofriedelan-3-oic acid (**1**, 25 mg) and acetyl aleuritic acid (**5**, 8 mg). Fraction 4 was subjected to CC using mixtures of *n*-hexane and EtOAc of increasing polarity. Five subfractions were collected. Subfraction 3 (87 mg) was purified by preparative chromatography using benzene–EtOAc (98:2) to obtain compound **1** (50 mg), friedelin-3,4-lactone (**4**, 6 mg), and β -sitosterol (19 mg). The ethyl acetate extract was suspended in acetone, filtered, and washed with a mixture of hexane–ethyl acetate (1:1), yielding 1β -hydroxyfriedelin (**2**, 2.0 g). The filtrate was evaporated to dryness, and this residue (55.0 g) was chromatographed on a silica gel column eluted with mixtures of *n*-hexane, *n*-hexane–EtOAc, and *n*-EtOAc–MeOH of increasing polarity to afford 11 main fractions. Fraction 2 (1.48 g) was fractionated by silica gel CC eluted with *n*-hexane–EtOAc mixtures to give eight subfractions. (8.1–8.8). Subfraction 8.6 (82 mg) was purified by preparative TLC using toluene–EtOAc (7:3) to afford 63 mg of elemicin. Fraction 6 (3.7 g) was subjected to silica gel CC and eluted with a gradient of *n*-hexane–EtOAc to give 13 subfractions (13a–13m). Subfraction 13g (0.97 g) was subjected to CC over silica gel using an *n*-hexane–EtOAc mixture of increasing polarity to yield seven fractions. Fraction 13g-4 (46 mg) was purified by preparative

Table 2. ¹H NMR Data of Compounds 6–8, 10–12, and 14 (δ in ppm, J in Hz)^a

position	6	7	8	10	11	12	14
1	4.48, br s	4.38, br s	5.47, br s	4.66, s	4.61, d (8.0)	4.66, br s	6.96, dd (10.5, 2.0)
2a	2.21, ddd (15.0, 3.0, 2.5)	2.12, ddd (15.5, 2.5, 2.5)	2.21, ddd (16.0, 2.5, 2.0)	2.53, dd (13.0, 3.0)	2.79, d (14.0)	2.92, d (14.0)	6.01, dd (10.0, 3.0)
2b	1.69, ddd (15.0, 3.5, 3.0)	1.80, ddd (15.5, 4.0, 4.0)	1.71, ddd (16.0, 4.0, 4.0)	2.06, dd (13.0, 4.0)	2.56, dd (14.0, 7.5)	2.83, dd (14.0, 7.0)	
3	3.87, br s	5.15, ddd (3.0, 3.0, 3.0)	4.94, br s				
4	1.32, br s	1.45 ^b	1.44 ^b	2.26, q (6.5)	2.37, q (7.0)	2.24, q (6.0)	
6a	1.76, ddd (13.0, 3.5, 3.0)	1.77, ddd (13.0, 3.0, 3.0)	1.81, ddd (13.0, 3.0, 3.5)	1.75, ddd (13.0, 3.0, 3.0)	1.45, q (3.5)	1.45, m	1.81, m
6b	0.96 ^b	1.01 ^b	1.01 ^b	1.23 ^b	1.11 ^b	1.05, m	1.53 ^b
7a	1.41 ^b	1.49 ^b	1.45 ^b	1.48 ^b	1.52, m	1.51	1.58 ^b
7b		1.43, m					
8	1.21 ^b	1.21 ^b	1.21 ^b	1.25 ^b	1.26, m	1.21 ^b	1.42, dd (11.0, 4.00)
10	0.88, br s	0.88, br s	1.05, br s	1.18 ^b	0.99, br s	1.00 ^b	2.84, br s
11a	1.58, m	1.62, ddd (13.0, 3.5, 3.0)	1.45 ^b	1.61, br d (13.0)	1.64, ddd (13.0, 3.0, 3.0)	1.60, m	1.62, dd (13.0, 3.5, 3.0)
11b	1.19 ^b	1.37 ^b	1.34 ^b	1.31, br d (13.5)		1.34, m	1.32 ^b
12a	1.41 ^b	1.44 ^b	1.33 ^b	1.38 ^b	1.41 ^b	1.41, m	1.38 ^b
12b	1.35 ^b	1.35 ^b				1.37 ^b	
15a	1.49, m	1.49, m	1.49, m	1.50 ^b		1.50, m	1.32 ^b
15b	1.25 ^b	1.24 ^b	1.24 ^b	1.24 ^b		1.24 ^b	
16a	1.52, m	1.53, m	1.53, m	1.54, m	1.56 ^b	1.53 ^b	1.54 ^b
16b	1.34 ^b	1.35 ^b	1.35 ^b	1.35 ^b	1.37, br s	1.37 ^b	1.34, m
18	1.54 ^b	1.56, dd (12.0, 6.0)	1.54, dd (11.0, 6.0)	1.55, dd (11.0, 6.0)	1.58, dd (11.0, 6.0)	1.57, dd (11.0, 6.0)	1.57, dd (11.0, 6.0)
19a	1.35 ^b	1.37 ^b	1.34 ^b	1.37 ^b	1.40 ^b	1.38 ^b	1.38 ^b
19b	1.23 ^b	1.21 ^b	1.20 ^b	1.21, dd (14.0, 6.0)	1.23, dd (14.0, 6.0)	1.21 ^b	1.20, dd (13.5, 6.0)
21a	1.44, m	1.47 ^b	1.47, m	1.46 ^b	1.46 ^b	1.47 ^b	1.46, m
21b	1.26, m	1.26 ^b	1.23, m	1.25 ^b	1.25 ^b	1.26 ^b	1.27 ^b
22a	1.45 ^b	1.47 ^b	1.47 ^b	1.48 ^b	1.50, br s	1.49, m	1.47 ^b
22b	0.92, br s	0.91 ^b	0.93 ^b	0.93 ^b	0.93, br s	0.94 ^b	0.93, br d
23	1.04, d (7.0)	0.90, d (7.0)	0.91, d (7.0)	1.08, d (6.5)	1.12, d (7.0)	1.24, d (6.5)	1.26, s
24	1.28, s	1.27, s	1.28, s	1.09, s	1.17, s	1.25, s	0.91, s
25	1.29, s	1.32, s	1.07, s	1.27, s	1.30, s	1.29, s	0.96, s
26	1.03, s	1.03, s	1.00, s	1.01, s	1.037, s	1.03, s	1.01, s
27	0.99, s	0.99, s	0.98, s	1.02, s	1.031, s	1.00, s	1.04, s
28	1.17, s	1.18, s	1.17, s	1.17, s	1.19, s	1.18, s	1.19, s
29	1.00, s	1.00, s	0.99, s	1.00, s	1.00, s	1.00, s	1.00, s
30	0.94, s	0.94, s	0.94, s	0.95, s	0.95, s	0.95, s	0.95, s
OH-1	2.64, d (7.0)						
OH-3	2.32, d (6.0)						
OAc-1			2.00, s				
OAc-3		2.07, s	2.02, s				

^a Recorded in CDCl₃ (6–8, 12, 14), CDCl₃–DMSO (3:1) (10), CDCl₃–MeOH (1:1) (11) at 500 MHz. ^b Overlapping signals.

Table 3. ^{13}C NMR Data of Compounds^a 6–8, 10–12, and 14 (δ in ppm)

position	6	7	8	10	11	12	14
1	68.4	67.2	68.1	68.1	64.7	65.5	150.7
2	41.9	39.8	36.1	37.6	45.0	43.7	127.4
3	74.1	74.8	72.8	166.6	177.4	172.6	198.3
4	49.5	48.3	48.0	51.2	60.3	85.2	78.4
5	38.1	37.6	37.8	42.5	41.2	41.7	45.5
6	44.4	44.4	43.7	42.6	41.4	40.4	32.7
7	17.8	18.0	17.9	18.1	19.2	18.4	17.3
8	53.8	53.8	53.9	52.9	53.9	53.4	51.6
9	39.3	38.2	37.8	38.5	40.0	39.3	36.3
10	61.8	61.4	60.4	60.7	67.2	66.2	52.9
11	35.5	35.3	35.3	34.5	36.0	35.6	34.9
12	30.5	30.4	30.3	29.6	31.2	30.5	30.2
13	39.7	39.7	39.6	38.9	39.9	39.5	39.7
14	38.4	38.4	38.4	37.6	39.2	38.6	38.2
15	32.4	32.4	32.4	31.7	33.0	32.6	32.1
16	36.1	36.0	36.0	35.3	36.6	36.1	35.9
17	30.0	30.0	30.0	29.3	30.6	30.0	30.0
18	42.8	42.8	42.8	42.1	43.5	42.9	42.8
19	35.3	35.3	35.3	34.6	35.9	35.4	35.4
20	28.2	28.2	28.1	27.5	28.6	28.2	28.1
21	32.8	32.8	32.8	32.2	33.4	32.9	32.7
22	39.3	39.3	39.3	38.5	39.8	39.3	39.2
23	12.0	11.6	11.5	8.1	15.7	15.2	16.4
24	18.4	18.2	17.2	16.2	15.8	16.2	17.2
25	19.4	19.2	18.8	18.3	19.4	19.2	20.3
26	20.0	20.0	20.1	19.4	20.4	20.0	19.9
27	18.7	18.7	18.6	18.1	19.0	18.6	18.7
28	32.1	32.1	32.1	31.5	32.4	32.1	32.1
29	31.8	31.8	31.8	31.3	32.1	31.8	31.7
30	35.0	35.0	34.9	34.4	35.2	34.9	35.0
acetate-1							
C=O			170.0				
CH ₃			21.6				
acetate-3							
C=O	170.2	170.5					
CH ₃	21.3	21.2					

^a Recorded in CDCl₃ (6–8, 12, 14), CDCl₃–DMSO (3:1) (10), CDCl₃–MeOH (1:1) (11) at 125 MHz (6–8, 10–12) and 75 MHz (14).

TLC using *n*-hexane–EtOAc (6:4) to yield 36.8 mg of 4-hydroxy-5-propionyl-1,3-di-*O*-methylpyrogallol. Subfraction 13i (0.38 g) was suspended in a mixture of hexane–CH₂Cl₂ (1:1), the suspension was filtered, and the solids were washed with hexane–CH₂Cl₂ (1:1) and crystallized from CHCl₃–MeOH to obtain 7.8 mg of compound 3. The methanol extract of *G. parviflora* (54 g) was chromatographed on a silica gel column with mixtures of *n*-hexane–EtOAc and EtOAc–MeOH of increasing polarity, yielding 15 main fractions. The 13th fraction (152 mg) was purified by preparative chromatography using *n*-hexane–EtOAc–MeOH (40:55:5) to afford 43 mg of a yellow oil, which was further purified by analytical TLC using CH₂Cl₂–EtOAc–MeOH (80:15:5) to yield (–)-syringaresinol (21 mg). The last fraction from chromatography of the MeOH extract yielded β -sitosterol- β -*D*-glucopyranoside (10 mg).

1,2-Dehydro-2,3-secofriedelan-3-oic acid (1): white solid (from CHCl₃); mp 205–208 °C; $[\alpha]_D^{25} +16.8$ (c 0.095, CHCl₃); IR (KBr) ν_{max} 3375, 2928, 2860, 1693, 1463, 1388, 1231, 1079, 1007, 919, 674 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR, see Table 1; EIMS m/z 442 [M]⁺ (31), 427 (32), 245 (39), 205 (96), 191 (55), 163 (49), 137 (53), 109 (79), 95 (100), 69 (81), 57 (61), 43 (40), 29 (7); HRFABMS m/z [M + H]⁺ 443.3886 (calcd for C₃₀H₅₁O₂, 443.3889).

1 β -Hydroxyfriedelin (2): colorless needles (from EtOAc) relatively insoluble in solvents such as acetone, ethyl acetate, THF, and CH₂Cl₂. This limited solubility could be explained by two intermolecular hydrogen bonds (identified by X-ray analysis) between the carbonyl and OH groups that enhance the crystalline stability.³¹ Mp >300 °C; $[\alpha]_D^{25} -38.0$ (c 0.1, CHCl₃); UV (CHCl₃) λ_{max} (log ϵ) 243 (2.42) nm; CD (CHCl₃) λ_{max} $\Delta\epsilon_{295} -50.41$; IR (KBr) ν_{max} 3370, 2938, 2865, 1704, 1454, 1384, 1235, 1174, 1121, 1024, 917, 651 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR, see Table 1 (the spectra were recorded at 50 °C due to the low solubility of 2 in CDCl₃ at rt); EIMS m/z 442 [M]⁺ (5), 424 (4), 344 (100), 289 (7), 258 (41), 230 (14), 205 (11), 193 (77), 184 (22), 135 (39), 129

(27), 90 (33), 77 (20), 57 (50), 18 (57); HRFABMS m/z [M + H]⁺ 443.3884 (calcd for C₃₀H₅₁O₂, 443.3889).

3 β -Hydroxyfriedelan-23-oic acid (3): white crystals (from CH₂Cl₂: MeOH), mp 237–240 °C; $[\alpha]_D^{25} +37.7$ (c 0.13, CHCl₃); IR (KBr) ν_{max} 3508, 2934, 2867, 1717, 1453, 1385, 1235, 1188, 1002, 687 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR, see Table 1; FABMS m/z 459 [M + H]⁺ (2), 441 (3), 391 (4), 307 (11), 289 (13), 165 (22), 154 (80), 136 (72), 107 (40), 77 (100), 63 (56), 39 (62), 27 (32), 14 (8); HRFABMS m/z [M + H]⁺ 459.3841 (calcd for C₃₀H₅₁O₃, 459.3838).

Preparation of 1 β ,3 β -Dihydroxyfriedelan (6). 1 β -Hydroxyfriedelin (2) (50.0 mg, 0.11 mmol) was suspended in THF–H₂O (3:0.1 mL), and NaBH₄ (9.4 mg, 0.25 mmol) was added. The resulting mixture was stirred under reflux and monitored by TLC (hexane–EtOAc, 7:3). After completion of the reaction (3 h), distilled water (3 mL) was added to the reaction mixture, and it was then stirred for an additional 5 min at rt. The mixture was extracted with CH₂Cl₂ (3 \times 10 mL) and dried over anhydrous Na₂SO₄. The crude material was purified by CC (silica gel, hexane–EtOAc, 8:2), affording compound 6 (47.8 mg, 95.2% yield).

1 β ,3 β -Dihydroxyfriedelan (6): white needles (CHCl₃–MeOH), mp 217–219 °C; $[\alpha]_D^{25} +7.0$ (c 0.1, CHCl₃); IR (KBr) ν_{max} 3428, 2937, 2867, 1459, 1385, 1145, 1055, 976, 848, 578 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR, see Tables 2 and 3, respectively; EIMS m/z 444 [M]⁺ (7), 429 (21), 291 (22), 260 (27), 220 (18), 205 (35), 191 (33), 163 (28), 137 (38), 123 (68), 95 (100), 83 (95), 69 (95), 55 (82), 43 (83), 18 (77); HRFABMS m/z 444.3973 [M]⁺ (calcd for C₃₀H₅₁O₂, 444.3967).

Acetylation of 1 β ,3 β -Dihydroxyfriedelan (6). Compound 6 (30.5 mg) was treated with Ac₂O (1.5 mL) in pyridine (1.0 mL) at room temperature for 72 h. The formation of products was monitored by TLC using *n*-hexane–CH₂Cl₂–EtOAc (8:1:1). The reaction mixture was worked up as usual, and the residue was subjected to CC over silica gel. Elution with an *n*-hexane–CH₂Cl₂–EtOAc solvent system afforded 7 (12.5 mg, 41%), 8 (3.6 mg, 9.9%), and recovered starting material (6, 10.7 mg, 35.1%).

3 β -Acetoxy-1 β -hydroxyfriedelan (7): colorless needles (CH₂Cl₂), mp 213–215 °C; $[\alpha]_D^{25} -5.45$ (c 0.11, CHCl₃); IR (CHCl₃) ν_{max} 2934, 2865, 1731, 1462, 1378, 1251, 1230, 1139, 1019, 978 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR, see Tables 2 and 3; EIMS m/z 486 [M]⁺ (3), 471 (10), 426 (9), 333 (8), 273 (14), 260 (18), 229 (15), 218 (31), 205 (21), 191 (26), 149 (27), 121 (60), 109 (73), 95 (100), 69 (82), 55 (62), 43 (45), 41 (27), 29 (6); HRFABMS m/z 486.4065 [M]⁺ (calcd for C₃₂H₅₃O₃, 486.4073).

1 β ,3 β -Diacetoxyfriedelan (8): colorless needles (CH₂Cl₂), mp 219–221 °C; $[\alpha]_D^{25} +9.2$ (c 0.13, CHCl₃); IR (CHCl₃) ν_{max} 2939, 2867, 1726, 1462, 1371, 1268, 1242, 1140, 1022, 977 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR, see Tables 2 and 3; EIMS m/z 528 [M]⁺ (6), 468 (4), 426 (9), 408 (8), 393 (9), 376 (11), 273 (17), 260 (26), 205 (48), 149 (40), 137 (44), 123 (90), 109 (97), 95 (100), 81 (75), 69 (98), 55 (52), 43 (68); HRFABMS m/z 528.4186 [M]⁺ (calcd for C₃₄H₅₅O₄, 528.4179).

Preparation of Friedelan-1,3-dione (9). 1 β -Hydroxyfriedelin (2) (14.0 mg, 0.03 mmol) was suspended in THF (5 mL). Jones reagent was added dropwise until the orange color remained. The reaction mixture was stirred (30 min) at room temperature, and then it was quenched with MeOH, producing a blue-green solution. The solvents were eliminated under vacuum, and water was added. The product was extracted with CHCl₃ (3 \times 3 mL), washed with aqueous NaHCO₃ and brine, and dried over anhydrous Na₂SO₄. The product was purified by CC (silica gel, hexane–EtOAc, 8:2) to afford 1,3-diketofriedelan (9) (9.0 mg, 64% yield) and recovered 1 β -hydroxyfriedelin (2) (2.0 mg, 14.3% yield). Compound 9 was identified by direct comparison with data reported in the literature,^{26,27} $[\alpha]_D^{25} -5.0$ (c 0.12, CHCl₃), lit.²⁷ $[\alpha]_D^{25} -4.2$.

Preparation of 1 β -Hydroxyfriedelin-3-oxime (10). Compound 2 (100 mg, 0.22 mmol) and hydroxylamine hydrochloride (39.3 mg) were dissolved in a mixture of anhydrous pyridine (1.5 mL) and absolute ethanol (1.5 mL), and the reaction mixture was refluxed for 30 min and cooled to rt.²⁸ Then, a solution of HCl (10%, 2 mL) was added, obtaining a precipitate, which was filtered. The solid was washed with EtOAc to obtain 10 (98.9 mg, 95.6%).

1 β -Hydroxyfriedelin-3-oxime (10): colorless crystals, mp 242–244 °C; $[\alpha]_D^{25} +18.4$ (c 0.10, CHCl₃); IR (KBr) ν_{max} 3611, 3289, 2933, 2867, 1674, 1460, 1385, 936 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR, see Tables 2 and 3; EIMS m/z 457 [M]⁺ (17), 439 (33), 422 (100), 408 (19), 205 (96), 191 (21), 166 (38), 138 (44), 123 (68), 109 (76), 95 (96), 69

(79), 55 (57), 41 (22), 18 (35); HRFABMS m/z [M + H]⁺ 458.3997 (calcd for C₃₀H₅₂O₂N, 458.3998).

Preparation of 1 β -Hydroxyfriedelin-3,4-lactam (11). Compound **10** (42.0 mg, 0.09 mmol) and *p*-toluenesulfonyl chloride (14.0 mg, 0.07 mmol) were dissolved in pyridine (1 mL), and the mixture was refluxed for 5 h. Then, the reaction mixture was cooled and diluted with water (3 mL), and the product was extracted with CHCl₃ (3 × 5 mL). The organic phases were combined, washed with HCl (10%) and brine, and dried over anhydrous Na₂SO₄. Concentration of the organic phase afforded **11** (39.4 mg, 93.8%).

1 β -Hydroxyfriedelin-3,4-lactam (11): white powder, mp 262–264 °C; [α]_D²⁵ –13.3 (*c* 0.10, CHCl₃); IR (KBr) ν_{\max} 3422, 3257, 3938, 2868, 1667, 1452, 1192 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR, see Tables 2 and 3; EIMS m/z 457 [M]⁺ (25), 439 (8), 424 (32), 218 (21), 205 (48), 191 (36), 163 (22), 137 (29), 123 (39), 109 (48), 95 (56), 81 (47), 69 (45), 55 (31), 44 (100), 28 (11); HRFABMS m/z [M + H]⁺ 458.4000 (calcd for C₃₀H₅₂O₂N, 458.3998).

Reaction of 1 β -Hydroxyfriedelin (2) with *m*-CPBA. Compound **2** (30 mg, 0.06 mmol) was dissolved in CHCl₃ (15 mL), and then *m*-CPBA²⁹ (29.3 mg, 0.16 mmol) was added. The mixture was refluxed for 6 h. The reaction mixture was diluted with CHCl₃, and the solution was washed successively with 5% Na₂SO₃(aq), saturated NaHCO₃, and brine and dried with Na₂SO₄. The solution was evaporated in vacuo, and the residue was separated by silica gel CC eluted with mixtures of *n*-hexane and EtOAc, to afford compounds **12** (4.2 mg, 13.5%), **13** (4.8 mg, 16.6%), and **14** (3.7 mg). Compound **13** was identified by direct comparison with data reported in the literature.^{12,30}

1 β -Hydroxyfriedelin-3,4-lactone (12): amorphous solid (CHCl₃); [α]_D²⁵ +17.1 (*c* 0.10, CHCl₃); IR (KBr) ν_{\max} 3364, 2939, 2867, 1720, 1447, 1384, 1306, 1265, 1183, 1076 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR, see Tables 2 and 3; EIMS m/z 458 [M]⁺ (1), 173 (12), 83 (100), 55 (35), 43 (7), 18 (5); HRFABMS m/z 459.3832 [M + H]⁺ (calcd for C₃₀H₅₀O₃, 459.3838).

4 α -Hydroxyfriedelin-1-en-3-one (14): white crystals (CHCl₃); mp 266–268 °C; [α]_D²⁵ –90 (*c* 0.10, CHCl₃); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 238 (3.84) nm; IR (CDCl₃) ν_{\max} 2931, 2866, 2867, 1674, 1463, 1388, 1235, 1172, 1073 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR, see Tables 2 and 3; EIMS m/z 440 [M]⁺ (43), 412 (12), 397 (13), 218 (13), 205 (26), 152 (30), 109 (31), 95 (73), 69 (100), 67 (42), 55 (29), 18 (87); HRFABMS m/z 440.3651 [M]⁺ (calcd for C₃₀H₄₈O₂, 440.3654).

Cytotoxic Assays. Human tumor cell lines leukemia (K562), central nervous system (U251, GliA), colon (HCT-15), breast (MCF-7), lung (SKLU-1), and prostate cancer (PC-3) were supplied by the National Cancer Institute. The cytotoxic activities of **1–14** and of the *n*-hexane and ethyl acetate extracts on tumor cells were determined using the protein-binding dye sulforhodamine B (SRB) in a microculture assay to measure cell growth.¹³ The cells were cultured in RPMI-1640 (Sigma Chemical Co., Ltd., St. Louis, MO), supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 μ M l-glutamine, 100 IU/mL penicillin G, 100 μ g/mL streptomycin sulfate, and 0.25 μ g/mL amphotericin B (Gibco). They were maintained at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere with 95% humidity. For the assay, 5 × 10⁴ cells/mL (K562, MCF-7), 7.5 × 10⁴ cells/mL (U251, PC-3, SKLU-1), and 10 × 10⁴ cells/mL (HCT-15) with 100 μ L/well of the cell suspensions were seeded in 96-well microtiter plates and incubated to allow cell attachment. After 24 h, 100 μ L of each test compound, extract, or positive control was added (all test substances were dissolved in DMSO). After 48 h, adherent cell cultures were fixed in situ by adding 50 μ L of cold 50% (w/v) aqueous trichloroacetic acid (TCA) and incubated for 60 min at 4 °C. The supernatant was discarded, and the plates were washed three times with H₂O and then air-dried. Cultures fixed with TCA were stained for 30 min with 100 μ L of 0.4% SRB solution. Protein-bound dye was extracted with 10 μ M unbuffered Tris base, and the optical densities were read on an Ultra microplate reader (E1, 808, Bio-Tek Instruments, Inc.), at a wavelength of 515 nm. Results were expressed as concentration giving 50% inhibition (IC₅₀). The data were calculated according to the protocol of Monks,¹³ where a dose–response curve was plotted for each compound; the IC₅₀ values were estimated from linear regression equations. The IC₅₀ values (mean \pm standard error) for **1, 4–6, 14**, and the positive control (adriamycin) are reported in the text.

X-ray Structure Determination of 1 β -Hydroxyfriedelin (2).³¹ The X-ray crystallographic data were measured on a Bruker Smart Apex

automatic diffractometer with a CCD area detector at 173(2) K using graphite-monochromated Mo K α radiation (λ = 0.71073 Å). The structure was solved by direct methods and refined by full-matrix least-squares on F^2 using the program SHELXS-97.³² The crystal data are summarized as follows: empirical formula C₃₀H₅₀O₂; formula weight 442.70 amu; crystal color and habit, colorless prism, orthorhombic, crystal size 0.268 × 0.056 × 0.038 mm, space group *P*2₁2₁, *Z* = 4, *a* = 6.230(3) Å, *b* = 14.029(8) Å, *c* = 29.261(16) Å, *V* = 2557(2) Å³; *D*_{calc} = 1.150 Mg/m³; *F*(000) = 984, μ = 0.069 mm⁻¹; 18 537 collected reflections (2.01° \leq θ \leq 25.44°), $-7 \leq h \leq 7$, $-16 \leq k \leq 16$, $35 \leq l \leq 35$; 2723 independent reflections (*R*_{int} = 0.0877); goodness-of-fit on F^2 is 1.020, final *R* indices for *I* > 2 σ (*I*), *R*₁ = 0.0877, *wR*₂ = 0.1724, *R* indices for all data *R*₁ = 0.1560, *wR*₂ = 0.2023; refining 301 parameters and no restraints; the largest difference peak and hole was 0.289 and -0.266 e Å⁻³; completeness to θ (25.44°) 99.2%, maximum transmission 0.9999, minimum transmission 0.9811.

Acknowledgment. We thank CONACyT (México) and Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas (UNAM) for financial support. We also thank E. M. Martínez (Instituto de Biología, UNAM), A. Cano, M. I. Chávez, R. Patiño, L. Velasco, and J. Pérez Flores (Instituto de Química, UNAM) for technical assistance.

Supporting Information Available: ¹H and ¹³C spectra of compounds **1–3, 6–8, 10–12**, and **14**, CD curve, and X-ray crystallographic data for **2** are provided. This information is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References and Notes

- Abdel-Fattah, M. R. *Bot. J. Linnean Soc.* **1987**, *94*, 293–326.
- Hohmann, J.; Evanics, F.; Berta, L.; Bartók, T. *Planta Med.* **2000**, *66*, 291–294.
- Mujumdar, A. M.; Misar, A. V. *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *90*, 11–15.
- Quian-Cutrone, J.; Huang, S.; Trimble, J.; Li, H.; Lin, P. F.; Alam, M.; Kloor, S. E.; Kadow, K. F. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 196–199.
- Hegazy, M. E. F.; Mohamed, A. E. H. H.; Aoky, N.; Ikeuchi, T.; Ohta, E.; Ohta, S. *Phytochemistry* **2010**, *71*, 249–253.
- Delgado, G.; Hernández, J.; Rios, M. Y.; Aguilar, M. I. *Planta Med.* **1994**, *60*, 389–390.
- García, A.; Delgado, G. *Helv. Chim. Acta* **2006**, *89*, 16–29.
- García, A.; Ramírez-Apan, T.; Cogordan, J. A.; Delgado, G. *Can. J. Chem.* **2006**, *84*, 1593–1602.
- García, A.; Delgado, G. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 1618–1621.
- Martínez, M.; Jiménez, J.; Cruz, R.; Juárez, E.; García, R.; Cervantes, A.; Mejía, R. *An. Inst. Biol. (UNAM), Ser. Bot.* **2002**, *73*, 155–281.
- Monteiro, C.; Manta, C.; Justino, F.; Tavares, R.; Curto, M. J. M.; Pedro, M.; Nascimento, M. S. J.; Pinto, M. J. *Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1193–1196.
- Monteiro, C.; Justino, F.; Tavares, R.; Curto, M. J. M.; Florencio, M. H.; Nascimento, M. S. J.; Pedro, M.; Cerqueira, F.; Pinto, M. M. M. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1273–1277.
- Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolf, A.; Gray-Goodrich, M.; Campbell, H.; Mayo, J.; Boyd, M. *J. Natl. Cancer Inst.* **1991**, *83*, 757–766.
- Patra, A.; Chaudhuri, S. K. *Indian J. Chem.* **1989**, *28B*, 376–380.
- Maciel, M. A. M.; Pinto, A. C.; Brabo, S. N.; Da Silva, M. N. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 823–828.
- Addae-Mensah, I.; Achenbach, H.; Thoithi, G. N.; Waibel, R.; Mwangi, J. W. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 2055–2058.
- Bellido, S. I.; Pollán, M. S.; Caballero, E.; González, M. S. *Phytochemistry* **1985**, *24*, 2758–2760.
- Lane, A. M.; Kubanek, J. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 1224–1231.
- Jayasinghe, L.; Mallika, B. M.; Nishantha, K. H. R.; Gayathri, N. W. M.; Ratnayake, B. M.; Hara, N.; Fujimoto, Y. *Phytochemistry* **2003**, *62*, 637–641.
- Choi, S. Z.; Yang, M. C.; Choi, S. U.; Lee, K. R. *Arch. Pharm. Res.* **2006**, *29*, 203–208.
- Ito, A.; Kasai, R.; Yamasaki, K.; Duc, N. M.; Nham, N. T. *Phytochemistry* **1994**, *37*, 1455–1458.
- Berova, N.; Nakanishi, K.; Woody, R. W. *Circular Dichroism. Principles and Applications*; Wiley: New York, 2000; Chapter 10.
- Bass, W. J. *Phytochemistry* **1985**, *24*, 1875–1889.
- Zeynizadeh, B.; Behyar, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2005**, *78*, 307–315.
- Hunter, A. C.; Priest, S. M. *Steroids* **2006**, *71*, 30–33.
- Klass, J.; Tinto, W. F.; McLean, S.; Reynolds, W. F. *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 1626–1630.
- Joshi, B. S.; Kamat, V. N.; Viswanathan, N. *Tetrahedron* **1973**, *29*, 1365–1374.

- (28) Moiteiro, C.; Curto, M. J. M.; Mohamed, N.; Bailén, M.; Martínez-Díaz, R.; González-Coloma, A. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 3566–3571.
- (29) Tori, M.; Matsuda, R.; Sono, M.; Kohama, Y.; Asakawa, Y. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1988**, *61*, 2103–2108.
- (30) Talapatra, B.; Lahiri, B.; Basak, A.; Pradhan, D. K.; Talapatra, S. K. *Indian J. Chem.* **1983**, *22B*, 741–745.
- (31) Crystallographic data for the structure of compound **2** reported in this paper have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data

Centre (CCDC No. 766372). Copies of the data can be obtained, free of charge, on application to the Director, CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK (fax: +44-(0)1223-336033 or e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk).

- (32) Sheldrick, G. M. *Acta Crystallogr., Sect. A* **2008**, *64*, 112–122.

NP100440P