



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

OBTENCIÓN DE AGENTES ANTIINFLAMATORIOS Y CITOTÓXICOS A PARTIR DE
MODIFICACIONES QUÍMICAS A LOS ÁCIDOS MASTICADIENOICO Y 3-EPIMASTICADIENOLICO

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

IBETH OVIEDO CHÁVEZ



TUTOR: DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ

AÑO: 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio 1-4 del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, al cargo del Dr. Mariano Martínez Vázquez.

Se agradecen los apoyos financieros otorgados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través del Programa de becas para estudios de Posgrado pertenecientes al Padrón de Excelencia. También a la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) mediante el Programa de becas para estudios de Posgrado en la UNAM, y el Programa de apoyo a proyectos de investigación de Tesis doctoral 2003, PAEP, número 208320.

DEDICATORIAS

A mi esposo Jorge y a mi hija Ivette Danitza (Glorioso primer rayo de luz).

A mi padres Guillermina Chávez y Francisco Oviedo.

A mi madrina Felisa Chávez.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Mariano Martínez Vázquez, tutor de esta investigación.

A la M. en C. Teresa Ramírez Apan, con especial gratitud por su colaboración en los ensayos farmacológicos, y por sus comentarios en el enriquecimiento de esta investigación.

A los miembros de mi Comité tutelar, los doctores Rafael Castillo Bocanegra, Enrique Hong Chong e Ignacio Méndez Ramírez por su disposición y apoyo otorgados durante la investigación.

Al M. en C. Alfonso Lira Rocha, por su apoyo en la realización de los estudios de relación estructura-actividad.

A los sinodales, por sus valiosos comentarios, y en especial por su paciencia durante la revisión del escrito de tesis.

Al personal técnico del Instituto de Química.

CONTENIDO

ABSTRACT	xiii
RESUMEN	xv
I. MARCO TEÓRICO	1
1. <i>INTRODUCCIÓN</i>	2
2. <i>INFLAMACIÓN</i>	3
2.1. Inflamación aguda	3
2.2. Mediadores moleculares de la inflamación aguda	4
2.2.1. Derivados del ácido araquidónico	5
2.2.1.1. Prostaglandinas	7
2.2.1.2. Leucotrienos	8
2.2.2. Óxido nítrico	9
2.2.3. Factor de activación nuclear tipo κ B	10
2.3. Reparación del daño tisular en la inflamación aguda	11
2.4. Inflamación crónica	12
2.5. Terapéutica de la inflamación	12
2.5.1. Fármacos antiinflamatorios esteroidales	13
2.5.2. Fármacos antiinflamatorios no esteroidales	14
3. <i>AMPHIPTERYGIUM ADSTRINGENS</i>	16
3.1. Descripción de la especie	16
3.2. Usos etnomédicos	17
3.3. Estudios fitoquímicos	18
3.4. Estudios farmacológicos	19
4. <i>TRITERPENOS</i>	21
4.1. Biogénesis	21
4.2. Actividad biológica	24
4.3. Ácidos masticadienoico y 3α -hidroximasticadienoico	25
5. <i>MÉTODOS PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA</i>	29
5.1. Ensayos <i>in vivo</i>	29
5.1.1. Modelo de edema inducido por TPA	29
5.1.2. Modelo de edema inducido por carragenina	31
5.2. Ensayos <i>in vitro</i>	33
5.2.1. Producción de nitritos en macrófagos peritoneales de ratón	34
5.2.2. Determinación del leucotrieno B ₄ en leucocitos polimorfonucleares de rata	35
5.3. Ensayo de citotoxicidad <i>in vitro</i>	36

6. ESTUDIO DE RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD	37
II. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	39
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	42
IV. SECCIÓN EXPERIMENTAL	45
1. QUÍMICA	46
1.1. Material y equipo	46
1.2. Obtención de los ácidos masticadienoico y 3 α -hidroximasticadienoico	47
1.2.1. Material vegetal	47
1.2.2. Preparación de los extractos	48
1.2.3. Fraccionamiento del extracto orgánico	48
1.3. Obtención de los derivados del ácido masticadienoico	49
1.3.1. Ácido masticadienólico (3)	50
1.3.2. Ácido 24-25S-dihidromasticadienoico (4)	50
1.3.3. Ácido 24-25S-dihidromasticadienoico (5)	51
1.3.4. Masticadienoato de metilo (6)	51
1.3.5. Masticadienolato de metilo (7)	52
1.3.6. 24-25S-dihidromasticadienoato de metilo (8)	53
1.3.7. 24-25S-dihidromasticadienolato de metilo (9)	53
1.3.8. Isomasticadienoato de etilo (10)	54
1.3.9. Isomasticadienolato de etilo (11)	54
1.3.10. 3-oxo-7R-8R-epoxi-tirucal-24Z-en-26-ato de metilo (12)	55
1.3.11. Ácido 3-oxo-7R-8R-epoxi-tirucal-24Z-en-26-ico (13)	56
1.3.12. 3S-hidroxi-7R-8R-epoxi-tirucal-24Z-en-26-ato de metilo (14)	56
1.3.13. Lactona del ácido 4-hidroxi-7R-8R-epoxi-3, 4-seco-tirucal-24Z-en-26-ico (15)	57
1.3.14. Lactona del 4-hidroxi-7R-8R-epoxi-3, 4-seco-tirucal-24Z-en-26-ato de metilo (16)	58
1.3.15. Ácido 3 β -acetoxi-tirucala-7E, 24E-dien-26-ico (17)	59
1.3.16. 3 β -acetoxi-tirucala-7E, 24Z-dien-26-ato de metilo (18)	60
1.3.17. Ácido 3-hidroxiimino-masticadienoico (19)	60
1.3.18. 3-hidroxiimino-masticadienoato de metilo (20)	61
1.3.19. Mezcla isomasticadienoato de metilo / 3-oxodamara-13-17E, 24Z-dien-26-ato de metilo	61
1.4. Obtención de los derivados del ácido 3 α -hidroximasticadienoico	62
1.4.1. Ácido 24-25S-dihidro-3-epimasticadienólico (21)	62
1.4.2. 3-epimasticadienolato de metilo (22)	63
1.4.3. 24-25S-dihidro-3-epimasticadienolato de metilo (23)	63

1.4.4. 3-epiisomasticadienolato de etilo (24)	64
1.4.5. 24-25S-dihidro-3-epimasticadienolato de etilo (25)	64
1.4.6. Ácido 3 <i>R</i> -hidroxi-7 <i>R</i> -8 <i>R</i> -epoxi-tirucal-24 <i>Z</i> -en-26-ico (26)	65
1.4.7. 3 <i>R</i> -hidroxi-7 <i>R</i> -8 <i>R</i> -epoxi-tirucal-24 <i>Z</i> -en-26-ato de metilo (27)	65
1.4.8. Ácido 3 α -acetoxi-tirucala-7 <i>E</i> , 24 <i>E</i> -dien-26-ico (28)	66
1.5. Análisis cristalográfico de rayos X	67
2. ACTIVIDAD BIOLÓGICA	71
2.1. Métodos <i>in vivo</i>	71
2.1.1. Modelo de edema inducido por TPA	71
2.1.1.1. Condiciones generales	71
2.1.1.2. Procedimiento	73
2.1.1.3. Resultados	74
2.1.2. Modelo de edema inducido por carragenina	80
2.1.2.1. Condiciones generales	80
2.1.2.2. Procedimiento	81
2.1.2.3. Resultados	82
2.2. Métodos <i>in vitro</i>	85
2.2.1. Producción del óxido nítrico en macrófagos peritoneales de ratón	85
2.2.1.1. Condiciones generales	85
2.2.1.2. Procedimiento	86
2.2.1.2.1. Aislamiento y cultivo primario de macrófagos	86
2.2.1.2.2. Producción del óxido nítrico	87
2.2.1.2.3. Determinación de la concentración del óxido nítrico	87
2.2.1.2.4. Viabilidad celular	88
2.2.1.3. Resultados	89
2.2.2. Producción del leucotrieno B ₄ en leucocitos polimorfonucleares de rata.	91
2.2.2.1. Condiciones generales	91
2.2.2.2. Procedimiento	91
2.2.2.2.1. Aislamiento y cultivo primario de leucocitos polimorfonucleares	92
2.2.2.2.2. Producción del leucotrieno B ₄	92
2.2.2.2.3. Determinación de la concentración del leucotrieno B ₄	93
2.2.2.3. Resultados	95
2.3. Ensayo de citotoxicidad en líneas celulares de cáncer humano	96
2.3.1. Condiciones generales	96
2.3.2. Procedimiento	97
2.3.3. Resultados	98
3. ESTUDIO DE RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD	100
3.1. Análisis comparativo de potenciales de interacción	101
3.1.1. Condiciones generales	101
3.1.2. Procedimiento	101

3.1.3. Resultados	102
V. DISCUSIÓN	106
1. REACCIONES QUÍMICAS	107
1.1. Reducción con NaBH ₄	107
1.2. Hidrogenación catalítica	109
1.3. Esterificación	110
1.4. Epoxidación	114
1.5. Acetilación	119
1.6. Formación de oximas	121
2. ACTIVIDAD BIOLÓGICA	123
2.1. Modelo de edema inducido por TPA	123
2.1.1. Actividad de los extractos y de los triterpenos 1 y 2	123
2.1.2. Actividad de los derivados producidos a partir de 1 y 2	124
2.2. Modelo de edema inducido por carragenina	128
2.2.1. Actividad de los extractos y de los triterpenos 1 y 2	128
2.2.2. Actividad de los derivados producidos a partir de 1 y 2	129
2.3. Modelo de producción de óxido nítrico	130
2.3.1. Actividad de los extractos y de los triterpenos 1 y 2	130
2.3.2. Actividad de los derivados producidos a partir de 1 y 2	131
2.4. Modelo de producción de leucotrieno B ₄	132
2.5. Citotoxicidad en líneas celulares	133
3. ANÁLISIS CRISTALOGRAFICO Y SU RELACIÓN CON LA PLA ₂	135
4. ESTUDIO DE RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD	136
4.1. Análisis comparativo de potenciales de interacción	137
VI. CONCLUSIONES	140
BIBLIOGRAFÍA	144
ANEXOS	153
A. Reacciones químicas	153
B. Triterpenos en estudio	157
C. Publicaciones	162

ÍNDICE DE CUADROS

1	Datos cristalográficos y estructurales de los compuestos 1 , 5 , 15 y 16	67
2	Tratamientos en el modelo de edema inducido por TPA.	72
3	Efectos de los extractos y triterpenos constituyentes de <i>A. adstringens</i> en el modelo de edema inducido por TPA.	74
4	Efectos de los derivados del ácido masticadienoico en el modelo de edema inducido por TPA	75
5	Efectos de los derivados del ácido 3 α -hidroximasticadienoico en el modelo de edema inducido por TPA.	77
6	Dosis efectiva media de los triterpenos originales 1 y 2 y sus derivados en el modelo de edema inducido por TPA.	78
7	Efectos de los extractos de <i>A. adstringens</i> y los triterpenos 1 y 2 en el modelo de edema inducido por carragenina	82
8	Efectos de los derivados 3 , 6 , 7 y 21 en el modelo de edema inducido por carragenina.	83
9	Efectos de los extractos de <i>A. adstringens</i> y los triterpenos 1 y 2 , en el modelo de producción de óxido nítrico por macrófagos sensibilizados con lipopolisacárido	89
10	Efectos de los triterpenos 1 y 2 , y algunos derivados en el modelo de producción de óxido nítrico por macrófagos sensibilizados y no sensibilizados con lipopolisacárido	90
11	Procedimiento del ensayo inmunoenzimático para la cuantificación del leucotrieno B ₄	93
12	Efectos de los triterpenos 1 y 2 , y los epóxiderivados 12 y 16 en el modelo de producción de LTB ₄ en leucocitos polimorfonucleares estimulados por ionóforo de calcio	95
13	Efectos citotóxicos del extracto hexánico de <i>A. adstringens</i> y algunos triterpenos en líneas tumorales	99
14	Efectos citotóxicos de algunos derivados en líneas tumorales	100
15	Descriptores fisicoquímicos de 15 moléculas analizadas mediante el método CoMFA.	103
16	Matriz de correlación <i>r</i> de los logaritmos del inverso de las dosis efectivas medias obtenidas en el modelo de edema inducido por TPA, y los descriptores fisicoquímicos	103
17	Predecibilidad y linealidad del sistema de datos analizados mediante el método CoMFA.	104
18	Valores de DE ₅₀ en el modelo de edema inducido por TPA y las dimensiones estructurales de los compuestos 1 , 5 , 15 y 16	136

ÍNDICE DE FIGURAS

1	Metabolismo del ácido araquidónico	7
2	Estructura del óxido nítrico	10
3	Algunos fármacos antiinflamatorios esteroideos	14
4	Algunos fármacos antiinflamatorios no esteroideos	15
5	<i>Amphipterygium adstringens</i> Schiede Schlecht	16
6	Triterpenos aislados a partir de <i>A. adstringens</i>	19
7	Propuesta biogenética para la formación del 3 <i>R</i> -tirucalol	23
8	Estructuras de los ácidos masticadienoico (1) y 3 α -hidroximasticadienoico (2)	26
9	Estructura química del TPA	30

10	Mecanismos involucrados en el edema inducido por TPA.	31
11	Estructura química de la carragenina tipo kappa	32
12	Mecanismos involucrados en el edema inducido por carragenina	33
13	Metabolismo del óxido nítrico durante la inflamación	35
14	Estructura química del leucotrieno B ₄	36
15	Estructura del ácido 24-25S-dihidromasticadienólico (5)	69
16	Estructura de la lactona del ácido 4-hidroxi-7R-8R-epoxi-3, 4-seco-tirucal-24Z-en-26-ico (15)	69
17	Estructura de la lactona del 4-hidroxi-7R-8R-epoxi-3, 4-seco-tirucal-24Z-en-26-ato de metilo (16)	70
18	Modelo de edema inducido por TPA en la oreja de ratón	74
19	Modelo de edema inducido por carragenina en la pata de la rata	82
20	Curso temporal de las respuestas de los extractos de <i>A. adstringens</i> y los triterpenos 1 y 2 en el modelo de edema inducido por carragenina	84
21	Efectos de los triterpenos 1 y 2, y los derivados 3, 6, 7 y 21 en el modelo de edema inducido por carragenina	85
22	Producción del óxido nítrico en macrófagos peritoneales de ratón	89
23	Producción de leucotrieno B ₄ en leucocitos polimorfonucleares peritoneales de rata	95
24	Ensayo de citotoxicidad en líneas celulares de cáncer humano	98
25	Mapas de los contornos de interacciones estérica (A) y electrostática (B) del compuesto 12	105
26	Esquema general de modificaciones estructurales a los ácidos 1 y 2	107
27	Obtención del ácido masticadienólico (3)	108
28	Mecanismo propuesto para la formación de 3β-hidroxiderivados	108
29	Obtención de 3β-hidroxiderivados	109
30	Obtención de dihidroderivados	110
31	Obtención de ésteres metílicos	111
32	Obtención de ésteres etílicos	112
33	Mecanismo propuesto para la formación de ésteres etílicos	114
34	Obtención de epoxiderivados con <i>m</i> -CPBA	115
35	Obtención de epoxiderivados con CH ₃ CO ₃ H	115
36	Mecanismo de epoxidación	117
37	Transposición de tipo Baeyer-Villiger	117
38	Productos de degradación de los epoxiderivados	118
39	Obtención de los acetatoderivados	119
40	Obtención del compuesto 18	120
41	Mecanismo propuesto para la formación de acetatos	121
42	Obtención de los 3-hidroximinoderivados	122
43	Representación gráfica de los contornos de interacciones estérica (A) y electrostática (B) del compuesto 12	139

ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico	MHz	Megahertz
ABC	Área bajo la curva	M, mmol	
ADN	Ácido desoxiribonucleico	mmol	Unidades molares: molar, milimoles, micromoles
AINES	Fármacos antiinflamatorios no esteroideos	MOPAC	Programa de orbitales moleculares (Acrónimo del inglés Molecular Orbital Package)
ar	Absorbancia relativa	MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
cc	Cromatografía en columna	NDGA	Ácido nordihidroguaiarético (Acrónimo del inglés nordihydroguaiaretic acid)
ccf	Cromatografía en capa fina	NF-κB	Factor nuclear tipo kappa B (Acrónimo del inglés nuclear factor kappa-B)
CoMFA	Análisis comparativo de potenciales de interacción (Acrónimo del inglés comparative molecular field analysis)	NO	Óxido nítrico (Acrónimo del inglés nitric oxide)
COX	Ciclooxigenasa	NOS	Sintasas de óxido nítrico: inducible (<i>i</i>), endotelial (<i>e</i>) y neuronal (<i>n</i>)
d, m, f	Asignaciones para señales de IR: débil, mediana, fuerte	O	Ovalidad
DO	Densidad óptica	PAF	Factor activador de plaquetas
DM	Dipolo molecular	PBS	Disolución amortiguadora de fosfatos
DMEM	Medio de cultivo modificado Dulbecco's (Acrónimo del inglés Dulbecco's modified essential medium)	Pf	Punto de fusión en grados celsius
E	Electronegatividad de la molécula	PGs	Prostaglandinas
eem	Error estándar de la media	PKC	Proteína cinasa C (Acrónimo del inglés protein kinase C)
ELISA	Análisis inmunoenzimático (Acrónimo de inglés enzyme-linked immunosorbent assay)	PLA₂	Fosfolipasa A ₂ (Acrónimo del inglés phospholipase A ₂)
ERN	Especies reactivas de nitrógeno	LPMN	Leucocitos polimorfonucleares
ERO	Especies reactivas de oxígeno	Pol b	Polimerasa de ADN tipo β
EMIE	Espectrometría de masas por impacto electrónico	Pol	Polarizabilidad
eV	Electrón volts	REA	Relación estructura - actividad
FNT	Factor de necrosis tumoral	RMN ¹³C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
GCs	Glucocorticoides	RMN ¹H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno 1
HBSS	Disolución salina balanceada de Hanks (Acrónimo del inglés Hanks' balanced salt solution)	RX	Difracción de Rayos X
HOMO	Orbital molecular más alto ocupado (Acrónimo del inglés highest occupied molecular orbital)	s, d, t, c, dd, dt, td, cd, m	Asignaciones para señales de RMN ¹ H: simple, doble, triple, cuarteto, doble de doble, doble triple, triple doble, cuarteto doble, múltiple
IE	Inhibición del edema	SBF	Suero bovino fetal
IR	Infrarrojo	SRB	Sulforrodamina B
J	Constante de acoplamiento en Hertz	SOD	Dismutasa del superóxido
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginina metil ester	SSF	Disolución salina fisiológica
LO	Lipooxigenasa	TMS	Tetrametilsilano
log P	Índice de lipofiliidad	TPA	Acetato de tetradecanoilforbol (Acrónimo del inglés 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate)
LPS	Lipopolisacárido	TXs	Tromboxanos
LTB₄	Leucotrieno B ₄	UV	Ultravioleta
LTs	Leucotrienos	VM	Volumen molecular
LUMO	Orbital molecular más bajo no ocupado (Acrónimo del inglés lowest unoccupied molecular orbital)		
m/z	Relación de masa y carga		
M⁺·	Ión molecular		

d ppm	Desplazamiento químico en partes por millón
e	Coefficiente de extinción
l	Longitud de onda en nanómetros
Ac₂O	Anhídrido acético
AcOEt	Acetato de etilo
AcONa	Acetato de sodio
CaCl₂	Cloruro de calcio
Ce₂SO₄	Sulfato cérico
C₆D₆	Benceno hexadeuterado
CDCl₃	Cloroformo deuterado
CH(OCH₃)₃	Ortoformiato de metilo
CH₂Cl₂	Cloruro de metileno
CH₃CO₃H	Ácido peroxiacético
DMSO-d₆	Dimetilsulfóxido hexadeuterado
DMSO	Dimetilsulfóxido
EtOH	Etanol
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
KOH	Hidróxido de potasio
m-CPBA	Ácido <i>m</i> -cloroperóxibenzoico (Acrónimo del inglés <i>m</i> -chloroperoxibenzoic acid)
MeOD	Metanol deuterado
MeOH	Metanol
N₂	Nitrógeno molecular
Na₂CO₃	Carbonato de sodio
Na₂SO₃	Sulfito de sodio
Na₂SO₄ anh	Sulfato de sodio anhidro
NaBH₄	Borohidruro de sodio
NaHCO₃	Bicarbonato de sodio
NaNO₂	Nitrito de sodio
Py	Piridina (Acrónimo del inglés pyridine)

ABSTRACT

Despite the fact that *Amphipterygium adstringens* (usually known as "cuachalalate") is used intensively in traditional medicine throughout México, there are, to our knowledge, no previous studies concerning the actual therapeutic, anti-inflammatory and anti-cancer properties of this species. This lack of data prompted us to evaluate the aqueous (**AE**) and hexane (**HE**) extracts from *A. adstringens* in two models of acute inflammation: 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced ear edema and carrageenan-induced paw edema. Also, the cytotoxic activities of the extract **HE**, as well as both **1** and **2** on five human cancer cell lines, were determined.

Based on the promising biological activity of **1** and **2**, we structurally modified them to identify new active anti-inflammatory triterpenoids. So, 26 derivatives were obtained. Then, on the TPA-induced ear edema, 20 compounds were tested. The results showed that the 7,8-epoxy derivatives **12**, **16** and **26** were the most active, showing ten times activity than their parent compounds. Also, it was identified different biological effects in compounds **12**, **16** and **26**, with respect to **1**, **2** and **3**.

On the other hand, masticadienolic acid (**3**) showed a similar inhibitory response when compared with those of **1** and **2** on carrageenan-induced local inflammation. Derivatives **6**, **7** and **21** are inactive on carrageenan-induced edema. However, on the TPA-induced ear edema these compounds were more active than **1** and **2**.

To identify an *in vitro* marker predictive for the anti-inflammatory *in vivo* activity of **1**, **2** and their derivatives, two assays were implemented. Only **1** and **2** shown inhibitory effects on the leukotriene B₄ production from ionophore-stimulated polymorphonuclear leukocytes test. And, in nitric oxide generation in lipopolysaccharide (LPS)-activated peritoneal macrophages, the results showed that **1** presented the highest activity, followed by **2**, while **AE** and **HE** showed the lowest; however **1** and **2** were very cytotoxic. We also found that **1**, **2**, **6**, **12** and **16** elicited an increment in NO release from resting cells.

Results suggest that **1** and **2** may act as NO production modulators. On inflammation, acids **1** and **2** act as anti-inflammatory agents. And, both acids act as pro-inflammatory substances on normal conditions. An appropriate demonstration to this assumption was required.

On the other hand, it was proved that the dimensions and conformations of both **1** and **2** are crucial requirements to inhibit the enzyme phospholipase A₂ (PLA₂), which is involved in the inflammation induced by the TPA, then a comparative crystallographic structural analysis of **1**, **5**, **15** and **16** was performed. It might be assumed that **5**, **15** and **16** have not the structural requirements to inhibit the PLA₂, therefore their anti-inflammatory activities may not be due to the inhibition of PLA₂.

Additionally, CoMFA study was performed to know which structural parameters of these triterpenes are important for the activity. The information about the relationships between steric / electrostatic property and biological activity was very interesting for this study. The results allowed us to know that the effectivity of **12**, **16** and **26** was associated with their nucleophilicity. And, the electrophilicity may determine a lack of activity on TPA-induced edema.

Finally, compound **12** was proposed as starting point for the development of new anti-inflammatory molecules.

RESUMEN

El objetivo principal de esta tesis es contribuir con el desarrollo de fármacos antiinflamatorios y citotóxicos a partir de productos naturales. En especial de los ácidos masticadienoico (**1**) y 3-epimasticadienólico (**2**), principales componentes del cuachalalate (*A. adstringens*).

La corteza del cuachalalate se utiliza frecuentemente en el tratamiento de úlceras gástricas, cáncer de estómago, gastritis y algunas lesiones cutáneas. Sin embargo, no existen estudios previos acerca de las propiedades antiinflamatorias y citotóxicas de esta especie. Por lo tanto, como paso inicial, se investigaron las propiedades antiinflamatorias de los extractos acuoso (**EA**) y hexánico (**EH**) de la especie, y de los ácidos **1** y **2** mediante los modelos de edema inducidos por TPA y carragenina. Asimismo, mediante el ensayo de citotoxicidad en líneas tumorales se determinaron los efectos del extracto **EH** y de los ácidos **1** y **2**.

Posteriormente, los ácidos **1** y **2** se usaron como estructuras base y se obtuvieron 26 derivados. Las actividades biológicas *in vivo* e *in vitro* de los derivados obtenidos permitieron distinguir datos interesantes.

Los epoxiderivados **12**, **16** y **26** fueron los compuestos más activos de los 18 compuestos evaluados en el modelo de edema inducido por TPA. En tanto, en el modelo de edema inducido por carragenina en la pata de la rata, el ácido masticadienólico (**3**) mostró una respuesta inhibitoria similar a los ácidos **1** y **2**. Por su parte, los derivados **6**, **7** y **21** evaluados en el ensayo de carragenina no presentaron efectos significativos. Sin embargo, estos compuestos mostraron una actividad superior a los triterpenos **1** y **2**, en el edema inducido por el forbol.

En el ensayo *in vitro* de producción de leucotrieno B₄, de los compuestos evaluados únicamente los triterpenos **1** y **2** inhibieron el efecto de forma equivalente. En tanto, el modelo de producción *in vitro* de óxido nítrico en macrófagos activados, los ácidos **1** y **2** mostraron respuestas inhibitorias. Sin embargo, en macrófagos en reposo, los compuestos **1**, **2**, **6**, **12** y **16** promovieron la producción del óxido nítrico. El comportamiento de **1** y **2** sugirió una probable acción antiinflamatoria en un cuadro inflamatorio, en donde existe gran generación de óxido nítrico. En tanto que en condiciones normales, probablemente

ambos ácidos se comportan como agentes proinflamatorios. Lo anterior es una suposición, por lo tanto, su comprobación requerirá de estudios apropiados.

Por otro lado, se ha demostrado que los ácidos **1** y **2** son inhibidores específicos competitivos de la enzima fosfolipasa A_2 (Jain *et al.*, 1995). Al respecto se indicó que las dimensiones y conformación moleculares de los triterpenos **1** y **2** son elementos esenciales en la inhibición de la PLA₂. Los datos generados a partir del análisis de difracción de rayos X indicaron que **5**, **15** y **16** no semejaban las características estructurales de **1** y **2**. Por lo tanto, se sugirió que las acciones biológicas de **5**, **15** y **16** no incluían efectos sobre la fosfolipasa A₂.

Adicionalmente, un análisis de relación estructura-actividad permitió sugerir que la efectividad de los derivados **12**, **16** y **26** se relaciona con sus propiedades nucleofílicas. Y se propuso el compuesto **12** como molécula «cabeza de serie» para desarrollar nuevas moléculas antiinflamatorias.

I. MARCO TEÓRICO

1. INTRODUCCIÓN

La inflamación es un mecanismo fisiológico de defensa en respuesta a la presencia de un agente xenobiótico. El proceso comprende una serie de eventos que inician con el aumento en la permeabilidad vascular, la salida de fluidos y proteínas sanguíneas y la infiltración preferente de leucocitos. Estas células en coordinación con otras producen una variedad de moléculas que regulan, mantienen y concluyen la inflamación tras la remoción del agente causal (Cirino, 1998).

No obstante, algún mal funcionamiento de cualquiera de los mecanismos implicados en la inflamación puede conducir a la perpetuación del daño. Esta situación es el origen de una variedad de enfermedades crónicas con importantes índices de morbilidad y mortalidad.

La terapéutica de la inflamación comprende el uso de fármacos de tipo esterooidal y no esterooidal. Los glucocorticoides, cuya naturaleza es esterooidal, inhiben la transcripción de genes proinflamatorios y suprimen la respuesta inmune (Adcock, 2000). En tanto, los fármacos no esterooidales inhiben la enzima ciclooxigenasa (COX); sin embargo, se asocian con complicaciones de tipo gastrointestinal y renal (Fung *et al.*, 1999).

La medicina tradicional constituye una modalidad terapéutica desde hace mucho tiempo. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, aproximadamente tres cuartas partes de la población mundial recurre a los remedios tradicionales, principalmente de especies vegetales, para la recuperación de su salud. El impacto de los productos naturales ha sido tan importante, que suelen ser la materia prima o los constituyentes activos de casi un 30 % del arsenal farmacéutico actual. Algunos ejemplos son la aspirina, la atropina, la efedrina, la digoxina, la morfina, la quinina, la reserpina, la tubocurarina y el taxol (Anwarul y Atta-ur-Rahman, 2005).

En la búsqueda de principios activos con acción antiinflamatoria, los triterpenos atraen la atención por sus propiedades farmacológicas y se incluyen además de la antiinflamatoria (Safayhi *et al.*, 1997), la antimicrobiana (Cantrell *et al.*, 1996), la citotóxica (Gan *et al.*, 1998) y la inmunomoduladora (Çalis *et al.*, 1997), entre otras.

La corteza del cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*), tradicionalmente se ha utilizado en el tratamiento de diversas patologías asociadas con la inflamación. La especie es una fuente de triterpenos, principalmente. Sin embargo, también sintetiza ácidos anacárdicos y cardanoles.

2. INFLAMACIÓN

La inflamación se desarrolla como parte de los mecanismos de defensa del organismo en respuesta a estímulos de naturaleza diversa. Estos pueden ser externos, como traumatismos mecánicos y productos químicos; o internos, como lesiones provocadas por procesos isquémicos, patogénicos (virus, parásitos y bacterias) y autoinmunes.

La inflamación se localiza generalmente en el tejido conectivo, en donde ocurre la degeneración de las paredes de los vasos sanguíneos y se produce un incremento en la permeabilidad. Estos eventos conducen a una extensa salida de plasma y células, que luego penetran en el espacio intersticial y emigran hacia la zona dañada.

A nivel macroscópico, el proceso se manifiesta por la presencia de eritema, edema, calor y dolor. Estas expresiones clínicas fueron distinguidas por Celso (siglo I *d. C*) como signos cardinales de la inflamación. Virchow (siglo XIX *d. C*) sumó un signo más, refiriendo la pérdida de la función tisular (Nathan, 2002).

El proceso de inflamación puede ser agudo o crónico. La inflamación aguda es inmediata, de corta duración y los signos clínicos son sustanciales. El estado crónico es permanente y la sintomatología suele ser poco evidente.

2.1. Inflamación aguda

La inflamación aguda contribuye con la eliminación de células muertas, la neutralización de infecciones locales y la promoción de la acción del sistema inmune.

La respuesta aguda se controla por mediadores celulares y moleculares. Los componentes celulares incluyen células endoteliales, eosinófilos, neutrófilos, monocitos-macrófagos, mastocitos-basófilos, linfocitos y plaquetas. En tanto, los mediadores de la inflamación comprenden las proteasas plasmáticas, incluidas dentro de los sistemas de complemento, de cininas y de coagulación; los mediadores lipídicos, como las prostaglandinas, los leucotrienos y el factor activador de plaquetas; los neuropéptidos y las aminas vasoactivas; las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno; y las citocinas (Espinós *et al.*, 2004).

2.2. Mediadores moleculares de la inflamación aguda

Desde que la histamina se sugirió como mediador, se ha descrito un sinnúmero de moléculas de naturaleza y orígenes diversos, quienes son responsables de las distintas fases y manifestaciones de la inflamación (Espinós *et al.*, 2004).

La inflamación inicia con fenómenos vasculares y de reclutamiento celular. Durante las primeras horas (6 a 24 h), los leucocitos polimorfonucleares (LPMN), en especial los neutrófilos se encuentran en permanente actividad. Después, son reemplazados por los monocitos, que al diferenciarse en macrófagos actúan en la fagocitosis y digestión de cuerpos extraños y residuos celulares. Lo anterior a través de la liberación de una variedad de productos tóxicos, como enzimas hidrolíticas y proteolíticas y, especies reactivas de oxígeno (ERO) y de nitrógeno (ERN) (Lawrence *et al.*, 2002).

Cuando el endotelio vascular se dilata, aumenta la permeabilidad, el flujo sanguíneo y la afluencia de componentes plasmáticos y celulares hacia la zona afectada. Las aminas vasoactivas (histamina y serotonina) participan en la regulación del tono vasomotor endotelial.

Por su parte, las citocinas controlan los mecanismos de proliferación, diferenciación y activación de las células que las producen, como linfocitos y macrófagos activados. En especial, las citocinas como el factor de necrosis tumoral tipo alfa (FNT- α) y la interleucina 1 tipo beta (IL-1 β) activan las vías de señalización que regulan la expresión de moléculas de adhesión celular en el endotelio vascular. Estas citocinas de acción quimiotáctica facilitan la salida de leucocitos y su desplazamiento hacia el tejido

(Shanley *et al.*, 1995). También, las citocinas regulan la producción de inmunoglobulinas (Espinós *et al.*, 2004).

Las proteínas plasmáticas de los sistemas de complemento, de cininas y de coagulación, participan en la promoción y el control de las respuestas inflamatoria e inmune. El complemento interviene en la opsonización, la quimiotaxis y la formación del complejo de ataque contra la membrana del agente xenobiótico. Las cininas producen la liberación de bradicinina, que a su vez contribuye en el aumento de la permeabilidad vascular, la vasodilatación, la contracción del músculo liso, el dolor y la síntesis de prostaglandinas (Espinós *et al.*, 2004). Por su parte, el sistema de coagulación y la inflamación son procesos que se regulan entre sí. La inflamación promueve la cascada de la coagulación y la activación plaquetaria por diversos mecanismos, uno de ellos es la presencia de un factor en la membrana de los monocitos activados, el cual une los factores VII y VIIa de la coagulación. Asimismo, la coagulación induce la activación de células endoteliales, los cuales estimulan a los leucocitos. La autoamplificación del ciclo inflamación-coagulación se controla por moléculas como la proteína C (España *et al.*, 2004).

Otro grupo de mediadores son los neuropéptidos, quienes se encargan de inducir la producción y liberación de histamina, óxido nítrico y cininas. El factor activador de plaquetas (PAF) es un mediador responsable de la agregación plaquetaria y también de la estimulación de células proinflamatorias (Espinós *et al.*, 2004).

Son muchas las moléculas que intervienen en la inflamación; sin embargo, las prostaglandinas, los leucotrienos y el óxido nítrico han sido considerados como las moléculas más activas durante el proceso. La producción de estas moléculas se promueve por el factor de activación nuclear tipo kappa B (NF- κ B). Los mecanismos y funciones biológicas que desempeñan estos mediadores, así como la importancia de NF- κ B en la inflamación se describen en los siguientes párrafos.

2.2.1. Derivados del ácido araquidónico

Los eicosanoides son moléculas poliinsaturadas de 20 átomos de carbono y provienen del ácido araquidónico (AA). Dentro de este grupo se incluyen las prostaglandinas (PGs), los tromboxanos (TXs),

las prostaciclina, los leucotrienos (LTs) y las lipoxinas. El AA se almacena en la membrana como glicerofosfolípido y se libera por la acción de las fosfolipasas A₂ (PLA₂) y C (PLC) (Tithof *et al.*, 1998).

Hasta el momento se han encontrado tres isoformas de la PLA₂; la de secreción (PLA_{2s}), la independiente de calcio (PLA_{2i}) y, la citosólica dependiente de calcio (PLA_{2c}). Los subtipos PLA_{2c} y PLA_{2i} liberan el AA intracelular; en tanto que la PLA_{2s} actúa a nivel extracelular. Mientras las isoformas de secreción y la citosólica se involucran en la inflamación; la PLA_{2i} se encarga de la homeostasis celular y reconstrucción de las membranas. Se sabe que diferentes formas de PLA₂ pueden generar cáncer; no obstante, los mecanismos aún no se conocen con precisión (Laye y Gill, 2003).

Las características estructurales del AA y, en particular, la presencia de cuatro dobles enlaces Z, determinan su reactividad con el oxígeno. Este evento puede ser espontáneo o enzimático (fig. 1). La vía espontánea involucra la intervención de radicales libres, que generan los isoprostanos, los cuales participan en el estrés oxidativo (Montuschi *et al.*, 2004).

La vía enzimática comprende tres oxigenasas: ciclooxigenasa (COX), lipooxigenasa (LO) y epoxigenasa o citocromo P450. Los productos correspondientes son las PGs y los TXs; los ácidos hidroxieicosatetraenoicos (HETEs) y los LTs; y, los ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs), isómeros de los HETEs. En la figura 1 se muestran las vías de metabolización del AA.

Por último, el AA intacto se reincorpora a la membrana mediante la acción de la acetiltransferasa de lisofosfatidilo (Smith *et al.*, 2000; Titos, 2004).

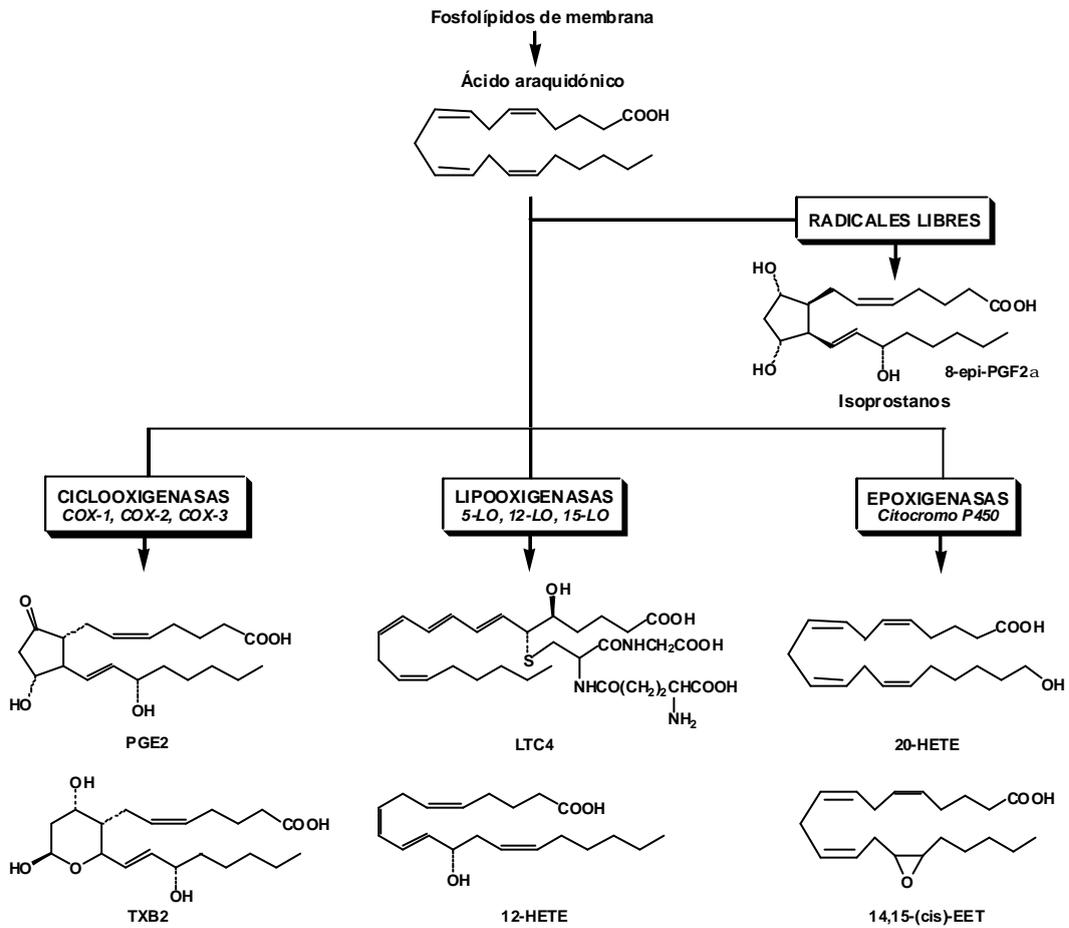


Figura 1
Metabolismo del ácido araquidónico
(Tomada de Titos, 2004)

2.2.1.1. Prostaglandinas

Las prostaglandinas son los autacoides más abundantes y se encuentran prácticamente en todos los tejidos y fluidos del organismo. Su producción se incrementa por una variedad de estímulos y su espectro de acción es muy variado. Desde hace años se ha visto que la inhibición de su síntesis es una opción terapéutica antiinflamatoria muy interesante (Espinós *et al.*, 2004).

Las ciclooxigenasas (COX) son las enzimas responsables de la producción de prostaglandinas. Se ubican en las membranas microsomal y nuclear y catalizan tanto la ciclación del AA a prostaglandina G₂

(PGG_2), como su conversión inmediata en prostaglandina H_2 (PGH_2). Este endoperóxido es sustrato de varias isomerasas específicas (Fung y Kirschenbaum, 1999). La sintasa de prostaciclina convierte a PGH_2 en prostaciclina PGI_2 , la cual participa en la vasodilatación y en la inhibición de la agregación plaquetaria. En tanto, la sintasa de tromboxano transforma a PGH_2 en tromboxano A_2 ; que posee acciones opuestas a las de PGI_2 . También, a partir de la PGH_2 y por la acción de tres sintasas, se originan las prostaglandinas D_2 , E_2 y $\text{F}_{2\alpha}$. En procesos alérgicos, los mastocitos liberan la PGD_2 , este mediador posee funciones similares a la prostaciclina PGI_2 , además actúa en los receptores del dolor. La PGE_2 activa a los leucocitos y las plaquetas, produce broncoconstricción por su acción sinérgica junto con bradicinina, IL-1 e histamina y promueve la fiebre, el edema y el eritema. La $\text{PGF}_{2\alpha}$ posee su acción principal en la vasoconstricción (Malgor y Valsecia, 2000; Smith *et al.*, 2000).

Existen dos isoformas de ciclooxigenasa COX-1 y COX-2. La COX-1 está presente en casi todas las células del organismo, con excepción de los hematíes. Esta enzima constitutiva es responsable de la producción permanente de prostaciclina PGI_2 . Las prostaglandinas derivadas de COX-1 controlan el flujo y la distribución sanguínea renal, la reabsorción de sodio y agua y la liberación de renina (Malgor y Valsecia, 2000; Smith *et al.*, 2000; Espinós *et al.*, 2004).

En tanto, la COX-2 no está presente en condiciones normales, no obstante, se sospecha su existencia en el cerebro. Esta enzima se induce únicamente en la inflamación, como respuesta a citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6 y FNT- α); algunos factores de crecimiento; y el lipopolisacárido (LPS). Su expresión se inhibe por citocinas antiinflamatorias y fármacos esteroidales (Malgor y Valsecia, 2000; Espinós *et al.*, 2004).

2.2.1.2. Leucotrienos

Reciben este nombre porque se forman en los leucocitos y tienen en su molécula, de 20 átomos de carbono, tres dobles uniones conjugadas. Al igual que las prostaglandinas, derivan del AA, por la acción enzimática de la 5-lipooxigenasa (Espinós *et al.*, 2004).

Las lipooxigenasas (LO) son enzimas citosólicas que incorporan una molécula de oxígeno en la estructura del AA. Dependiendo de la posición en la cual producen la oxigenación, existen tres formas de LOs: 5-LO, 12-LO y 15-LO. Los productos correspondientes son los hidroperóxidos (HPETEs): 5-HPETE, 12-HPETE y 15-HPETE (Titos, 2004).

La 5-LO es la enzima más importante, se localiza principalmente en los neutrófilos, los eosinófilos, los macrófagos y los mastocitos. La enzima inactiva se transloca hacia la membrana nuclear, en donde interacciona con su proteína activadora, posteriormente, produce el 5-HPETE. Este nuevamente es sustrato de 5-LO y, se transforma en un epóxido inestable y muy reactivo, el leucotrieno A_4 (LTA_4). Este intermediario puede convertirse en LTB_4 ; o conjugarse con una molécula de glutatión, originando el LTC_4 . Este último, por la pérdida sucesiva de residuos de aminoácidos, se transforma en LTD_4 y LTE_4 . Alternativamente, el 5-HPETE por la acción de una peroxidasa de glutatión, se convierte en 5-HETE, de acciones quimiotáctica y mitogénica (Titos, 2004).

El LTB_4 estimula la quimiotaxis, adhesión celular, producción del ión superóxido y liberación de enzimas hidrolíticas de neutrófilos. Los LTs G_4 , D_4 y E_4 se conocen como cisteinil-LTs y tienen acción en la constricción de vasos sanguíneos (Malgor y Valsecia, 2000; Espinós *et al.*, 2004).

2.2.2. Oxido nítrico

El NO es un radical sin carga con un electrón no apareado (fig. 2), la ausencia de carga permite su libre difusión a través de las membranas y en particular, el electrón solo confiere una gran reactividad y rápida conversión *in vivo* en especies reactivas derivadas de nitrógeno (ERN). Estas moléculas lipofílicas poseen gran capacidad de difusión y, por lo tanto, interaccionan con una variedad de moléculas y de enzimas.

El óxido nítrico (NO) es un importante regulador endógeno de diferentes procesos fisiológicos, como el control de la presión sanguínea, la neurotransmisión, la agregación plaquetaria y la acción citostática de los macrófagos (Wink y Mitchell, 1998; Davis *et al.*, 2001).

Las sintasas de óxido nítrico (NOS) catalizan la reacción entre oxígeno y el aminoácido *L*-arginina y producen el NO y la citrulina. Existen tres isoformas de esta enzima: la neuronal (NOS_n), la inducible (NOS_i) y la endotelial (NOS_e). Las formas constitutivas (NOS_e y NOS_n) se encuentran en células endoteliales y en algunas neuronas, respectivamente. Sin embargo, también se localizan en plaquetas, LPMN y células de músculo cardíaco. Estos subtipos se encargan de la producción basal del NO responsable de la integridad endotelial, la función vascular normal y la comunicación interneuronal. En tanto, la NOS_i se expresa en procesos de inflamación por macrófagos y fagocitos y, se inhibe por los glucocorticoides (Moncada *et al.*, 1991). El NO producido por esta vía es un vasodilatador potente, promueve la permeabilidad vascular y la producción de prostaglandinas, asimismo, posee acción tóxica contra bacterias, hongos, parásitos y otros agentes patógenos. Sin embargo, el NO y sus metabolitos también regulan mecanismos de defensa y promueven la reconstrucción del tejido dañado. Por lo anterior, el NO es una molécula moduladora de la inflamación (Wink y Mitchell, 1998; Wu, 2004).

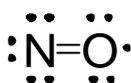


Figura 2
Estructura del óxido nítrico

2.2.3. Factor de activación nuclear tipo kB

El factor de transcripción NF- κ B se encuentra en todas las células del organismo, está constituido por proteínas de la familia REL, en especial p65, p50, REL c, REL B y p52. El heterodímero p50-p65 es el mejor conocido.

Este complejo se encuentra inactivo en el citoplasma, unido a la molécula I κ B. La activación del péptido ocurre después de la fosforilización de I κ B, la cual se produce por estímulos diversos, como radicales libres, mediadores proinflamatorios, carcinógenos, promotores de tumores, endotoxinas, radiación gamma, luz ultravioleta y rayos X. Una vez activado se dirige hacia el núcleo y se une al ácido desoxirribonucleico (ADN). El NF- κ B participa en la expresión de aproximadamente 400 genes, quienes se involucran en la supresión de la apoptosis, la inducción de eventos celulares como transformación,

proliferación, invasión y metastasis, la inflamación, la replicación viral, la angiogénesis, el estrés oxidativo y la formación de osteoclastos (Aggarwal y Shishodia, 2004).

En relación con la inflamación, el NF- κ B promueve la expresión de moléculas proinflamatorias, como FNT- α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, PAF, NO, PGs y LTs (Hayden y Ghosh, 2004); también moléculas de adhesión celular, como las selectinas E y P, ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular) y VCAM-1 (molécula de adhesión entre células y el endotelio vascular) (Espinós *et al.*, 2004).

La forma activa de NF- κ B se ha encontrado en el cáncer, la aterosclerosis, el infarto al miocardio, la diabetes, la alergia, el asma, la artritis, la enfermedad de Crohn, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Alzheimer, la osteoporosis, la psoriasis, el choque séptico y el sida (Aggarwal y Shishodia, 2004). En especial, el factor NF- κ B se ha hallado en tumores de mama, ovario, colon, páncreas, tiroides, próstata, pulmón, cabeza y cuello, vejiga, piel y médula ósea, en linfomas y leucemias (Aggarwal *et al.*, 2006).

Muchos de los agentes que previenen la inflamación y el cáncer actúan suprimiendo la activación de NF- κ B (Yamamoto y Gaynor, 2001; D'Acquisto *et al.*, 2002; Karin & Greten, 2005).

2.3. Reparación del daño en la inflamación aguda

Con la acción de los mediadores celulares y moleculares proinflamatorios se logra controlar el estímulo, de manera que comienzan a operar los mecanismos de reparación de los tejidos dañados. Las fases de regeneración y cicatrización están al cargo principalmente de macrófagos y neutrófilos, quienes además producen y liberan los factores de crecimiento tisular (Lawrence *et al.*, 2002).

La estructura y la función normal del tejido se restablecen por la presencia de células nuevas. La reconstrucción del tejido dañado se caracteriza por el recubrimiento de células del tejido conectivo (fibroblastos y células endoteliales). El mecanismo comprende cuatro etapas: la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis); la migración y la proliferación de fibroblastos; la exudación y el depósito de fibrina en la matriz extracelular; y el desarrollo y la organización del tejido fibroso (Lawrence *et al.*, 2002).

2.4. Inflamación crónica

La inflamación crónica es una respuesta prolongada con evidentes signos de inflamación activa y notable destrucción tisular. De manera simultánea y descontrolada funcionan los mecanismos de aislamiento, destrucción y eliminación del xenobiótico y de reparación del tejido dañado.

La inflamación crónica puede ser consecuencia de una respuesta aguda, por la permanencia del xenobiótico, la disfuncionalidad de alguno de los medios antiinflamatorios endógenos. Otras causas pueden ser las infecciones persistentes, la exposición constante a agentes tóxicos y la autoinmunidad.

La evolución persistente e incontrolada de la inflamación constituye el origen de una variedad de enfermedades, como el reumatismo, el asma, la esclerosis múltiple, la aterosclerosis, la osteoporosis, el cáncer y otras. Por lo tanto, la regulación de los mecanismos celulares y moleculares de la inflamación resulta de gran interés terapéutico (Nathan, 2002).

2.5. Terapéutica de la inflamación

Las estrategias terapéuticas de la inflamación se han abordado considerando la diversidad de mediadores celulares y moleculares. Desde hace algunos años se tenía la esperanza en la manipulación farmacológica de las citocinas proinflamatorias, como el factor FNT- α ; las interleucinas IL-1, IL-6, IL-8, quimiocinas y otras. Sin embargo, la modulación de estas moléculas no ha solucionado el problema.

El descubrimiento de ciertas citocinas de acción antiinflamatoria (como la IL-4 y la IL-10) ha permitido conocer los mecanismos de acción de algunos fármacos antiinflamatorios. También se ha dirigido la atención hacia las enzimas fosfolipasa A_2 , ciclooxigenasa, lipooxigenasa y sintasa de óxido nítrico de activa participación en la inflamación. Los estudios acerca de las isoformas inducibles de la COX y la NOS han ampliado las expectativas de encontrar fármacos antiinflamatorios eficaces.

Aunque el control terapéutico de la inflamación no se ha logrado por completo y aún es un reto por conquistar, hoy en día en la clínica se utilizan principalmente los fármacos antiinflamatorios esteroidales y no esteroidales (AINES) (Espinós *et al.*, 2004).

2.5.1. Fármacos antiinflamatorios esteroidales

Los glucocorticoides (GCs) representan un grupo de sustancias esteroidales de acción antiinflamatoria endógena. Los GCs son hormonas de acción endocrina producidas en la corteza suprarrenal. Estos se encargan del mantenimiento de la glucemia y la tensión arterial normal, asimismo modulan procesos de inmunidad, inflamación y de adaptación por el estrés (Borne, 1995; Adcock, 2000; Newton, 2000).

Ciertos receptores hormonales citoplasmáticos específicos reconocen y se unen con los GCs. Posteriormente, el complejo receptor-GC se dirige hacia el núcleo y antagoniza la transcripción de genes para moléculas proinflamatorias. También, los GCs inducen la expresión de anexina-1 (o lipocortina-1), quien inhibe la producción de prostaglandinas e impide la migración de neutrófilos y de monocitos. Otras acciones de los GCs son el efecto inmunosupresor de linfocitos T y la inhibición de la mitosis celular (Adcock, 2000; Newton, 2000).

Sin embargo, los GCs producen una variedad de efectos secundarios, como la exacerbación de los niveles sanguíneos de glucosa, insulina y lípidos; la inhibición de la acción de la hormona antidiurética, con incremento en la eliminación de agua; la acción mineralocorticoide con retención de sodio y eliminación de potasio y la producción de hipertensión arterial (Espinós *et al.*, 2004).

El cortisol es un glucocorticoide prototipo precursor de fármacos muy activos, como la betametasona, la dexametasona y la triamcinolona (fig. 3). Estos GCs no producen efectos mineralocorticoides (Borne, 1995).

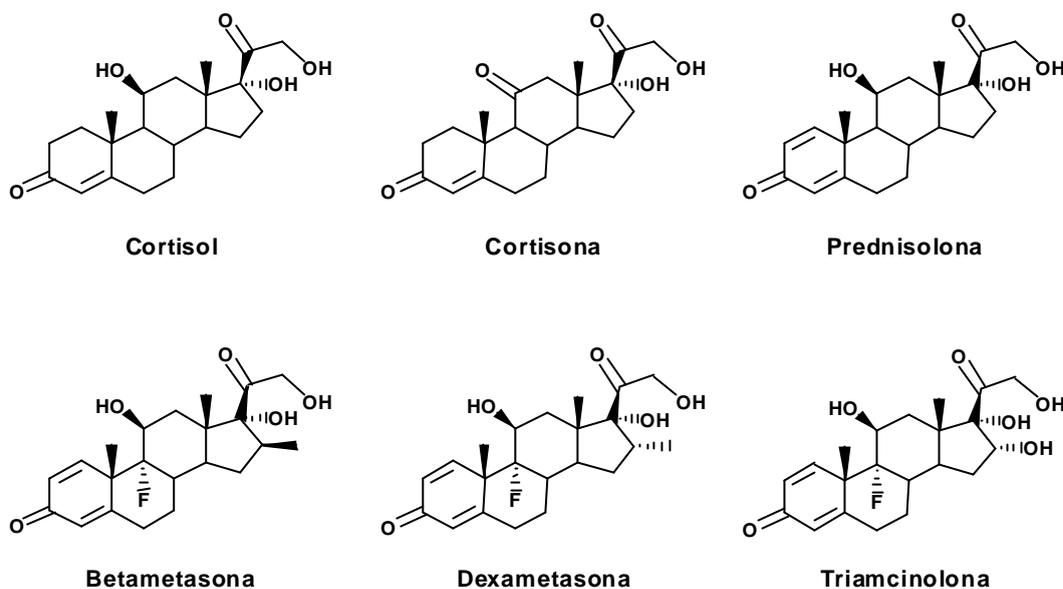


Figura 3

Algunos fármacos antiinflamatorios esteroidales

(Tomada de Borne, 1995)

2.5.2. Fármacos antiinflamatorios no esteroidales

Los AINES constituyen un grupo de fármacos químicamente heterogéneo (fig. 4) con acciones analgésica, antipirética y antiinflamatoria. También pueden ser antiagregantes plaquetarios y uricosúricos. Los AINES son ampliamente utilizados en la terapéutica general, incluyendo patologías del aparato locomotor como artrosis, artritis reumatoide, trastornos músculoesqueléticos; así como fiebre, cólicos nefríticos y biliares, cefaleas, dismenorrea, traumatismos, entre otras.

El mecanismo de acción principal de los AINES clásicos consiste en la inhibición de la COX. Sin embargo, se han asociado con complicaciones como la enfermedad ulcerosa péptica, la hemorragia digestiva y la insuficiencia renal (Espinós *et al.*, 2004).

Dependiendo de su selectividad por las dos isoformas de COX, los AINES se han clasificado en 4 grupos: a) selectivos a COX-1, se incluye solamente la aspirina, en dosis bajas; b) no selectivos a COX, abarcan los fármacos AINES clásicos, como ibuprofeno, indometacina, piroxicam, entre otros; c)

selectivos moderadamente a COX-2, como salicilatos y meloxicam; y d) muy selectivos a COX-2, como celecoxib y rofecoxib.

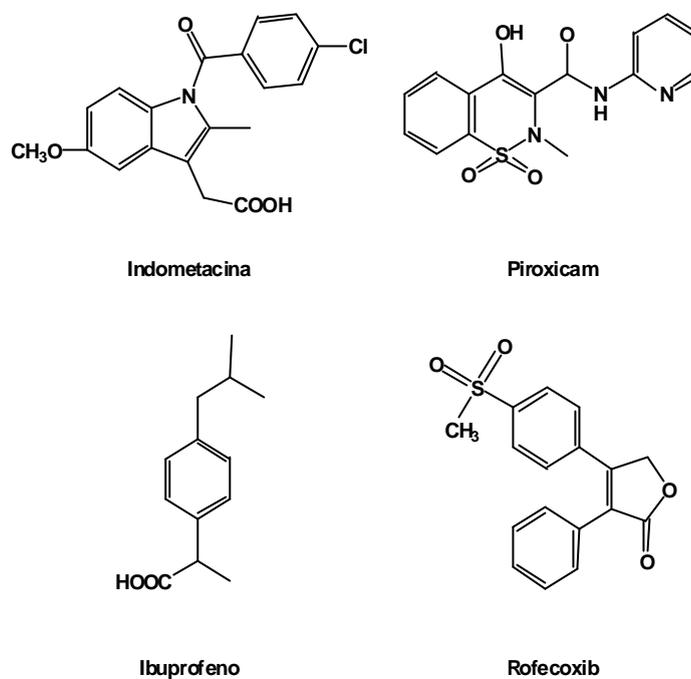


Figura 4
Algunos fármacos antiinflamatorios no esteroideos
(Tomada de Fung y Kirschenbaum, 1999)

3. AMPHIPTERYGIUM ADSTRINGENS

3.1. Descripción de la especie

Amphipterygium adstringens Schiede Schlecht (sinonimia *Juliania adstringens*, familia Julianaceae), es un árbol medicinal de aproximadamente 5 a 10 m de altura, generalmente de tronco retorcido y cuya corteza, color gris parduzco, es extremadamente astringente y de olor aromático (fig. 5). En la República Mexicana se localiza principalmente en los estados de Nayarit, Jalisco, Michoacán, Oaxaca, Puebla y Morelos (Argueta *et al.*, 1994).



Figura 5
Amphipterygium adstringens Schiede Schlecht

Existe una variedad de nombres atribuibles a la especie. En las zonas nahuas del altiplano central que comprenden los estados de México, Morelos, Tlaxcala, Puebla, Hidalgo y Distrito Federal, la especie se conoce como cuachalalate, cuachalalatl o cuachalalá. En Michoacán, como matixerán, macerán y pacheco. En Oaxaca como cuachinalá y en Puebla la gente la conoce como volador (Argueta *et al.*, 1994).

Sin embargo, cuachalalate es la denominación más habitual. Cuachalalate es la hispanización de «cuauchachalatli», palabra de origen náhuatl. El análisis gramatical del vocablo cuauchachalatli, compuesto por «cuáhuil» que significa árbol y «chachalatli», nombre que designa a cierto pájaro hablador, mejor conocido como chachalaca, sugiere que la palabra cuachalalate significa «árbol de la chachalaca».

3.2. Usos etnomédicos

Desde tiempos prehispánicos, el cuachalalate ha formado parte importante de la cultura y medicina tradicional de los estados que comprenden el altiplano mexicano. Esta circunstancia ha favorecido que la especie sea una de las plantas medicinales mejor conocidas y más utilizadas (Argueta *et al.*, 1994). Hasta el momento, se conocen cerca de 40 usos terapéuticos tradicionales del cuachalalate; no obstante, es muy frecuente su disposición para el tratamiento de úlceras gástricas, cáncer de estómago, gastritis y algunas lesiones cutáneas (Olivera *et al.*, 1999).

Por lo general, las infusiones o los cocimientos de la corteza son las preparaciones medicinales habituales. Se aplican en algunas afecciones femeninas, como la infección vaginal, la fiebre puerperal, el flujo vaginal anormal, la inflamación y la caída de la matriz y de los ovarios. También se emplean en el tratamiento de padecimientos asociados con el estómago, como la estomatitis, el cáncer digestivo, los dolores gástricos y la pesadez estomacal.

El efecto astringente de la corteza confiere propiedades como desintoxicante sanguíneo, por lo cual se dispone para algunas enfermedades asociadas con el flujo sanguíneo, como várices y úlceras varicosas.

La corteza también se utiliza contra infecciones bucales, como estomatitis herpética y aftosa; dolor de muelas y para endurecer las encías. También se ha referido su uso en enfermedades del hígado y de la vesícula; para el tratamiento de la tifoidea; padecimientos respiratorios como tos, amigdalitis, resfriados, tuberculosis y enfermedades pulmonares; para la infección e inflamación renales y en la terapéutica de dolores en general. Las fiebres intermitentes, el paludismo, la caída de cabello, las manchas en la piel,

la gangrena y la diabetes son padecimientos que también se han tratado con la corteza (Martínez, 1992; Hersch-Martínez, 1995; Argueta *et al.*, 1994; Olivera *et al.*, 1999).

3.2. Estudios fitoquímicos

Los estudios fitoquímicos de la corteza de *A. adstringens* han demostrado la presencia de triterpenos tetracíclicos y pentacíclicos (fig. 6), así como ácidos anacárdicos y cardanoles.

Dentro de los triterpenos tetracíclicos se mencionan a los ácidos 3α -hidroxi-6-oxo-7, 24Z-tirucaladien-26-oico (1.1.), 3, 7-dioxo-8, 24Z-tirucaladien-26-oico (1.2.), 3α -hidroxi-7-oxo-8, 24Z-tirucaladien-26-oico (1.3.), 7, 11-dioxo- 3α -hidroxi-8, 24Z-tirucaladien-26-oico (1.4.), 3, 8-dioxo- 7β -hidroxi-7, 9-cicro-7, 8 seco-24Z-tirucaladien-26-oico (1.5.), 3β -hidroximasticadienoico (1.7.), masticadienoico (1.8.) (Soriano-García *et al.*, 1987), isomasticadienoico, instipolinasico (Dominguez *et al.*, 1983), cuachalálico (Watson *et al.*, 1987), 7, 11-dioxo- 3α -hidroxieufa-8, 24-dien-26-oico, *schinol* (1.6.) y β -fitoesterol (1.13.) (Argueta *et al.*, 1994; Navarrete *et al.*, 1989; Olivera *et al.*, 1999; Makino *et al.*, 2004).

En tanto, los ácidos oleanólico (1.9.), oleanoico (1.10.) y 3-epioleanólico, 3α -hidroxi- 11α , 12α -epoxi-oleanan-28, 13β -olido (1.11.), 3β -hidroxi- 11α , 12α -epoxi-oleanan-28, 13β -olido (1.12.) y ocotilona (1.14.) (Makino *et al.*, 2004) forman parte del conjunto de triterpenos pentacíclicos.

También se han aislado algunos aldehídos alquilfenólicos (Mata *et al.*, 1991) y tres derivados del ácido salicílico con sustituyentes pentadecilo, heptadecilo y nonadecilo en la posición C-6. Estos compuestos se conocen como ácidos anacárdicos (Navarrete *et al.*, 1989). Recientemente, se indicó la presencia de un componente de tipo naftaleno, el ácido 3-dodecil-1, 8-dihidroxi-2-naftoico (Rivero-Cruz *et al.*, 2005).

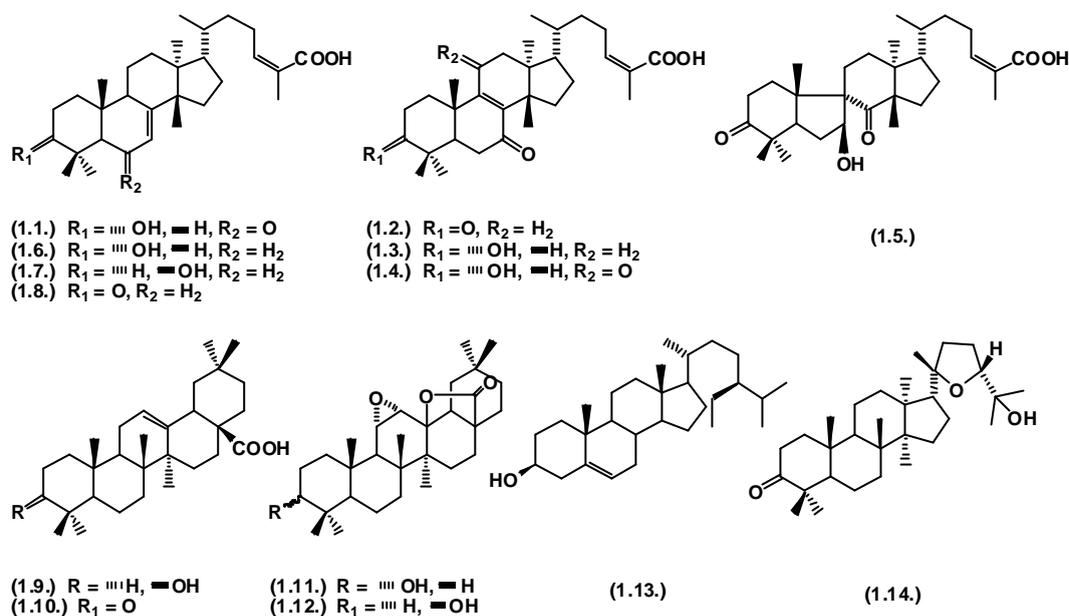


Figura 6
 Triterpenos aislados a partir de *A. adstringens*
 (Tomada de Makino *et al* 2004)

3.3. Estudios farmacológicos

Los principales usos etnomédicos de cuachalalate como agente citotóxico, antiulceroso, cicatrizante, hipocolesterolémico y antimicrobiano se han reconocido científicamente. Algunas de estas propiedades se atribuyen a la presencia de triterpenos.

Uno de los informes más remotos que se tienen en relación señala la actividad antitumoral de la especie. En esa investigación se utilizó un ensayo *in vivo* con ratones portadores de adenocarcinoma mamario. Los extractos metanólicos de la corteza presentaron una significativa actividad, no así la saponina esteroideal, propuesta como sustancia responsable de la actividad (González *et al.*, 1962). La investigación presenta algunos errores en la sección experimental y los resultados no reflejan lo señalado por los autores.

El interés por la actividad antitumoral de la especie se retomó hasta fechas recientes. Actividades citotóxicas moderadas se han descrito para un extracto etanólico y algunos componentes triterpénicos contra la línea de leucemia murina L-1210 (Makino *et al.*, 2004).

Otra investigación demostró que un extracto hexánico de la corteza poseía propiedad antígenotóxica y no inducía daño cromosómico (Martínez y Flores, 2003).

Por otro lado, existen diversas aportaciones acerca de las propiedades antiulcerosa y gastroprotectora del cuachalalate. Se informó que el cocimiento de la corteza y un extracto de acetato de etilo (AcOEt) presentaban efectos antiulcerogástricos en ratas: las muestras inhibían la secreción de jugo gástrico y además, contribuían con la rápida cicatrización del epitelio y de la mucosa gástrica (Argueta *et al.*, 1994).

Otro estudio señaló los significativos efectos gastroprotector y antiulceroso de un extracto metanólico de *A. adstringens* y los ácidos 3-epioleanólico, 3 α -hidroximasticadienólico y β -fitosterol. En tanto, el ácido masticadienoico, también aislado de esa fracción orgánica, no mostró actividad (Navarrete *et al.*, 1998; Arrieta *et al.*, 2003). Por lo anterior, se sugirió que los triterpenos constituyentes eran los responsables de la actividad antiulcerosa, gastroprotectora y cicatrizante de la especie (Arrieta *et al.*, 2003). Los autores propusieron un mecanismo de acción de los triterpenos para la protección de la mucosa gástrica, a través de la participación de óxido nítrico endógeno y su interacción con prostaglandinas y con proteínas ricas en grupos sulfidrilos.

También se demostró que el extracto metanólico de la especie administrado junto con diclofenaco, disminuía el daño gástrico provocado por el fármaco sin alterar sus efectos farmacológicos ni su farmacocinética (Navarrete *et al.*, 2005).

Por otro lado, un estudio sobre la acción hipocolesterolemica de la especie informó que un extracto hexánico reducía en un 31 % el nivel de colesterol sanguíneo en roedores. De esa fracción orgánica se obtuvieron dos mezclas, una de ácidos anacárdicos y la otra de aldehídos alquilfenólicos. Ninguna porción mostró el efecto esperado (Mata *et al.*, 1991). Por su parte, los ácidos masticadienoico y 3 α -hidroximasticadienoico administrados a una dosis de 17 mg/kg disminuyeron en 45 y 27 %, respectivamente, las concentraciones de colesterol en ratas (Navarrete, 1982).

También el ácido masticadienoico (**1**), aislado de *Celaenodendron mexicanum*, fue tóxico para artemia salina, *Leishmania donovani* y *Trypanosoma brucei brucei*. Por su parte el ácido 3 α -hidroximasticadienoico (**2**), también aislado de la especie, fue inactivo (Del Rayo *et al.*, 2000).

Un estudio reciente demostró la acción antibacteriana de ciertos extractos orgánicos de *A. adstringens* y de sus constituyentes triterpénicos. Se observó que el hidroxiácido **2** mostró mayor actividad que **1** contra *Micobacterium tuberculosis* (Rivero-Cruz *et al.*, 2005).

4. TRITERPENOS

Los triterpenos comprenden un grupo de metabolitos secundarios ampliamente distribuido en la naturaleza. Están constituidos por 30 átomos de carbono y se han designado de acuerdo con la estereoquímica presente en los núcleos estructurales. Entre ellos se mencionan a los triterpenos tetracíclicos, a los cuales convencionalmente se les han otorgado nombres triviales, como protostano, lanostano, cicloartano, damarano, eufano y tirucalano. Por su parte, los compuestos pentacíclicos pueden ser de tipo ursano, oleanano, friedelano, gamacerano, taraxastano, lupano y hopano (Patocka, 2003). Existen también otros tipos de esqueletos como el isomalabaricano, el limonoide, el quasinoide y el saponinoide (Connolly y Hill, 2005).

4.1. Biogénesis

La variedad de esqueletos policíclicos son producidos a partir del 2, 3-oxidoescualeno a través de una sucesión de reacciones, como transposiciones, ciclaciones y una apertura del grupo epóxido. El cicloartenol es el intermediario biosintético común de los triterpenos tetracíclicos y pentacíclicos sintetizados por el reino vegetal. Su equivalente en el reino animal es el lanostano. El mecanismo postulado para la biosíntesis de cicloartenol involucra una serie de pasos concertados, similares a aquellos involucrados en la formación de lanosterol.

Inicialmente, la batería enzimática en la planta debe reconocer las conformaciones de pre-bote o pre-silla para el 2, 3*S*-oxidoescualeno. Con ello se inicia la apertura del anillo de oxirano y con la participación de los dobles enlaces se produce la ciclación en cascada, que lleva a la formación del catión protosterilo. Esta estructura experimenta una serie de transformaciones, como rearreglos 1, 2 o adiciones catiónicas 1, 2-antiperiplanares y se producen carbocationes de tipo Markonikov. Al final, se efectúa una eliminación 1, 2 del protón en C-19 y, en consecuencia, ocurre el cierre del anillo 9 β ,19-ciclopropano. De esta manera, se origina la estructura del cicloartenol (Abe *et al.*, 1993; Wendt *et al.*, 2000).

Los esqueletos tetracíclicos se caracterizan por presentar cuatro anillos fusionados, en donde los tres primeros son de seis miembros y el anillo D es un ciclopentano; además poseen una cadena lateral con una configuración *R* en la posición C-20. Su estructura proviene de un acomodo conformacional del polieno, en el cual el sistema π del doble enlace terminal se encuentra lo suficientemente distante de la cadena que originará al anillo D, de manera que ese sistema sp^2 no participa en la ciclación (Abe *et al.*, 1993).

La mayoría de las especies vegetales poseen las enzimas necesarias para convertir al 3*S*-oxidoescualeno en 3 β -triterpenoles. En tanto, es menos frecuente la transformación del 3*R*-oxidoescualeno en los correspondientes compuestos α -axiales, probablemente porque los complejos enzimáticos indispensables están restringidos para ciertas especies. Los estudios biogénéticos sugieren la formación de los derivados 3 β a partir de 3*S*-oxidoescualeno con una conformación pre-silla del anillo A. Por el contrario, el enantiómero 3*R* deriva de una conformación pre-bote del primer anillo en la estructura correspondiente (Abe *et al.*, 1993; Assimopoulou y Papageorgiou, 2005; Wendt *et al.*, 2000).

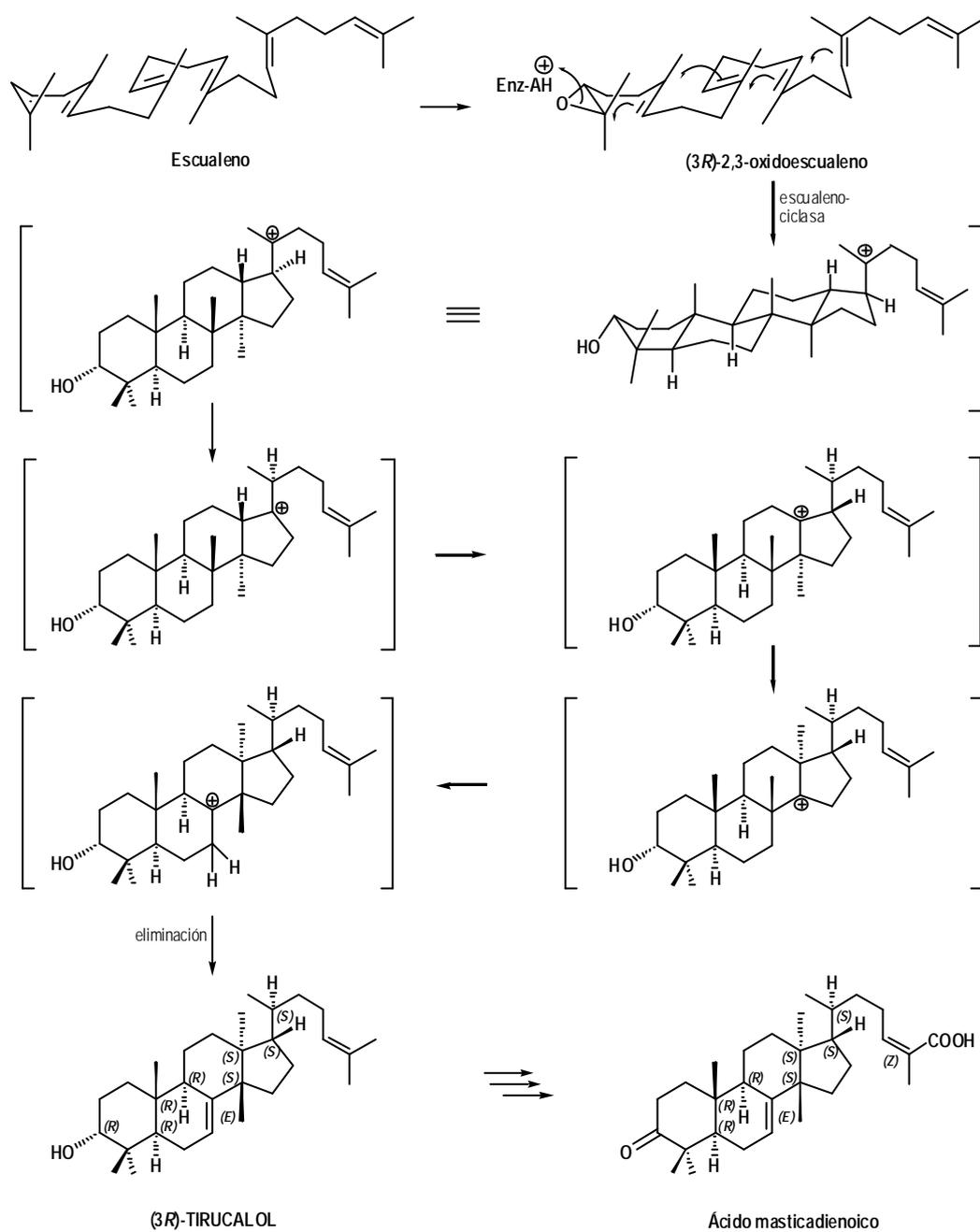


Figura 7

Propuesta biogénica para la formación del 3R-tirucalol

(Basada en Abe *et al.*, 1993; Assimopoulou y Papageorgiou, 2005; Wendt *et al.*, 2000)

El ácido 3 α -hidroximasticadienoico es uno de los metabolitos mayoritarios aislados de *A. adstringens* no así el enantiómero 3S. La especie debe incluir el complejo enzimático necesario para efectuar sus

transformaciones metabólicas. En la figura 7 se muestra una propuesta biogénica para la formación del esqueleto 3*R*-tirucalol, precursor de los ácidos 3 α -hidroximasticadienoico y masticadienoico.

4.2. Actividad biológica

La diversidad estructural de los triterpenos es, quizá, la responsable de sus efectos biológicos y farmacológicos. La mayoría de ellos se encuentran en grandes cantidades en el látex y en la resina de ciertas plantas, en donde constituyen un mecanismo de defensa contra patógenos y herbívoros. Los triterpenos poseen una variedad de actividades biológicas, como la bactericida, la fungicida, la antiviral, la citotóxica, la analgésica, la antiinflamatoria, la anticancerígena, la hipocolesterolémica, la espermicida, la cardiovascular, la antialérgica, entre otras (Mahato y Sen, 1997; Patocka, 2003). La naturaleza hidrofóbica de los triterpenos es una característica importante en relación con sus propiedades biológicas (Abe *et al.*, 1993; Mahato y Sen, 1997).

En la literatura se han señalado las acciones antiinflamatorias de los triterpenos, abarcando desde experimentos *in vivo* hasta *in vitro*. Los efectos son referidos principalmente a su interferencia con diversas moléculas o mecanismos del proceso de inflamación (Mahato y Sen, 1997; Calixto *et al.*, 2003; Rao y Reddy, 2004).

Los triterpenos son capaces de inhibir y modular la acción y la expresión de diversas moléculas y complejos enzimáticos como la ciclooxigenasa, la lipooxigenasa y la sintasa inducible de óxido nítrico (NOS). Por ejemplo, su acción antiprostanoide se asocia con la inhibición de la expresión de COX-2 y de NOS. Al respecto, el ácido ursólico puede inhibir la acción de AMPc (Monofosfato cíclico de adenosina) sobre las proteínas cinasas, estas enzimas promueven la expresión de COX-2 al interactuar sobre la región promotora del gen de la enzima. Por otro lado, algunos triterpenos poseen cierta especificidad en su acción antiprostanoide. Por ejemplo, el lupeol es capaz de disminuir la producción de PGE₂ sin afectar la de LTC₄. Por el contrario, ciertos triterpenos inhiben la acción de la enzima 5-LO. Al respecto, se sugirió que el tipo de núcleo policíclico era el responsable de su actividad (Calixto *et al.*, 2003).

Es preciso recordar que el factor de activación nuclear κ B regula la transcripción de una variedad de moléculas moduladoras de la inflamación. Recientemente, se ha informado de la acción de ciertos triterpenos sobre este complejo. Ejemplos de ellos son los ácidos ursólico (Shishodia *et al.*, 2003), oleanólico (Choi *et al.*, 2001) y betulínico (Yogeeswari y Sriram, 2005).

Existen varios estudios sobre la actividad antiinflamatoria y citotóxica de los triterpenos. Algunos de ellos indican que la actividad biológica se relaciona con la estructura química. En una revisión realizada por Mahato y Sen (1997) se distinguen varias aportaciones al respecto. Otro estudio señaló la importancia del grupo carboxilo en el C-28 del ácido ursólico para la inhibición de la enzima elastasa de leucocitos. También, se propuso que un grupo metilo en el C-4 de una serie de derivados del esteroles es esencial para la actividad citotóxica. Por otro lado, se informó la actividad antiinflamatoria de 10 triterpenos de tipo lupano, oleanano y ursano en el modelo de edema producido por TPA. Del mismo modo, se sugirió que el esqueleto triterpénico no influye en la actividad; por el contrario, la presencia de un grupo carboxilo en el C-28 o C-30 y de un alcohol en el C-28 incrementan la actividad en los modelos de edema inducidos por carragenina y propiolato de etilfenilo. Además, se propuso que la presencia de ciertos sustituyentes en la posición C5 de los esqueletos pentacíclicos aumentaba la selectividad y la potencia de la acción deseada.

4.3. Ácidos masticadienoico y 3 α -hidroximasticadienoico

Los ácidos masticadienoico (**1**) y 3-epimasticadienoico (**2**) (fig. 8) son los constituyentes mayoritarios de la corteza de *A. adstringens* (Olivera *et al.*, 1999). Ambos triterpenos también se han aislado de especies de la familia Anacardiaceae, como *Pistacia lentiscus* (Barton y Seoane, 1956; Papageorgiou *et al.*, 1997), *Pistacia terebinthus* (Monaco *et al.* 1974; Giner-Larza *et al.*, 2002), *Pistacia mexicana* (Domínguez *et al.*, 1974), *Schinus terebinthifolius* (Jain *et al.*, 1995), *Schinus molle* (Pozzo-Balbi *et al.*, 1978) y *Dysoxylum peltigrewianum* (Mulholland y Nair, 1994) y de *Celaenodendron mexicanum* (Del Rayo *et al.*, 2000). Ambos ácidos son, en parte, responsables de las propiedades biológicas de las especies que los sintetizan (Navarrete *et al.*, 1998; Giner-Larza *et al.*, 2002; Arrieta *et al.*, 2003; Makino *et al.*, 2004; Oviedo-Chávez *et al.*, 2004, 2005; Rivero-Cruz *et al.*, 2005).

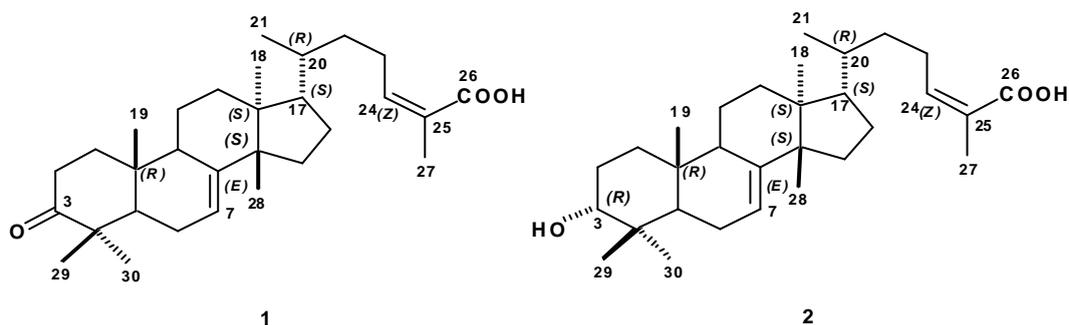


Figura 8
Estructuras de los ácidos masticadienoico (1) y 3 α -hidroximasticadienoico (2)

El ácido masticadienoico (1) se aisló por primera vez a partir de *Pistacia lentiscus* L. variedad *Chia*, mejor conocida como «goma mástica» (Barton y Seoane, 1956). El triterpeno posee un esqueleto tetracíclico de tipo tirucalano y se denomina como ácido 3-oxotirucala-7, 24Z-dien-26-oico. También se conoce comúnmente como terebintona (Kier *et al.*, 1963), su número de registro CAS es 514-49-8; su fórmula molecular de C₃₀H₄₈O₃ corresponde con un peso fórmula de 454.692 uma. Por su parte, ácido 3 α -hidroxi-tirucala-7, 24Z-dien-26-oico, 3 α -hidroximasticadienoico o *schinol* son las designaciones para el ácido 3-epimasticadienoico (2).

Estos ácidos poseen efectos farmacológicos interesantes. Un estudio bioquímico demostró que ambos triterpenos, aislados de *Schinus terebinthifolius*, son inhibidores específicos de tipo competitivo de la enzima fosfolipasa A₂ de secreción (PLA_{2s}). Los compuestos impiden la alquilación de un residuo de histidina en el sitio activo y, además inhiben la acción de la enzima. Se señaló a las características moleculares de estos triterpenos como responsables de la unión con la enzima; la cadena lateral accede a la región catalítica de la enzima; en tanto, el esqueleto triterpénico, dada su voluminosidad e hidrofobicidad, se mantiene en la región de reconocimiento interfacial. En la formación del complejo enzimático participa el grupo NH del imidazol en el residuo 48 de histidina (His48), el cual se une al anión carboxilato del triterpeno mediante una interacción tipo puente de hidrógeno. En esta interacción el catión de calcio funciona como cofactor. También se demostró que además de los ácidos 1 y 2, los respectivos derivados amida mostraron una notable actividad, no así los compuestos con un residuo terminal de éster metílico (Jain *et al.*, 1995).

Es importante recordar la participación de PLA₂ en la generación de mediadores de la inflamación, como prostaglandinas, leucotrienos, PAF y el anión superóxido y, en la liberación de enzimas lisosomales (Nevalainen *et al.*, 2000). Las diferentes isoformas de PLA₂ se han involucrado en el cáncer, por tanto, es un blanco molecular interesante para la farmacología y la terapéutica (Laye y Gill, 2003). Por lo anterior, resulta de gran importancia farmacológica la inhibición específica de la isoforma de secreción por parte de los triterpenos en cuestión.

Las actividades antiinflamatorias de los ácidos masticadienoico y masticadienolico se han demostrado en varios experimentos *in vivo*, como los modelos de edema inducido por aplicaciones repetidas de TPA en la oreja del ratón y PLA₂ en la pata de la rata; asimismo, en modelos *in vitro*, como los ensayos histológicos y la determinación de LTB₄ en LPMN. Para ambos ácidos, los resultados fueron similares en la mayoría de estos ensayos, con excepción del último, en donde el hidroxiácido **2** inhibió completamente la producción de LTB₄ y no afectó la viabilidad de las células, por el contrario, el cetoácido no mostró efecto sobre el LTB₄, e impidió la proliferación de las células LPMN (Giner-Larza *et al.*, 2002).

Otro estudio informó los resultados de un análisis preliminar, en el cual el ácido 3epimasticadienolico aislado del cuachalalate, presentaba un importante efecto inhibitorio en el modelo de edema inducido por carragenina (Olivera *et al.*, 1999).

Por otro lado, se ha reconocido la relación que existe entre los procesos de inflamación crónica y el desarrollo de cáncer. Se ha mencionado que los mediadores de la inflamación, los cuales cubren una función específica dentro del proceso fisiológico, pueden actuar de manera descontrolada y con ello progresar hacia una fase procarcinogénica (Coussens y Werb, 2002).

El ácido masticadienoico es un inhibidor de la enzima polimerasa de ADN tipo β (Pol β) (Boudsocq *et al.*, 2005). La proteína participa en la reparación de daños en el ADN. También existen evidencias de la participación de Pol β en el cáncer, debido a que un mal funcionamiento de la enzima contribuye en el desarrollo de algunas neoplasias, sobre todo de aquellas relacionadas con el envejecimiento (Hübscher *et al.*, 2002). También, se ha demostrado que la gran expresión de Pol β produce inestabilidad genética

y promueve el cáncer. Por último, la Pol β constituye un mecanismo de tolerancia de las células tumorales ante la acción del cisplatino, fármaco anticancerígeno (Albertella *et al.*, 2005).

El ácido masticadienoico inhibe específicamente la acción de Pol β sobre la síntesis de ADN *in vitro* (Boudsocq *et al.*, 2005). Mediante un estudio computacional *in silico* de simulación de interacciones ligando-receptor (*docking*), los autores sugirieron la unión específica entre el triterpeno y la Pol β a través de la región de adosamiento al ADN de una hélice. El ácido masticadienoico interacciona con los grupos amino terminales de los residuos de lisina Lis-35, Lis-60 y Lis-68. El aminoácido 60 forma un enlace tipo puente de hidrógeno con el carbonilo-3, en tanto, los residuos 35 y 68 se unen con el carboxilo del triterpeno a través enlaces iónicos. Los aminoácidos 35 y 68 de Pol β constituyen los sitios de unión al ADN (Prasad *et al.*, 1998). El ácido masticadienoico también interviene en la tolerancia de las células tumorales tratadas con cisplatino. El ácido masticadienoico se propuso como adyuvante en la terapia anticancerígena con dicho fármaco; también, se consideró como antimutagénico por su acción en la prevención de algunos efectos colaterales del cisplatino (Boudsocq *et al.*, 2005).

La inhibición de Pol β puede constituir un mecanismo importante en la acción antitumoral del ácido masticadienoico.

5. MÉTODOS PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA

5.1. Ensayos *in vivo*

Actualmente existe una diversidad de modelos experimentales aplicables al estudio de fármacos y principios activos antiinflamatorios. Entre ellos, los métodos *in vivo* constituyen una herramienta de uso frecuente, en especial porque los experimentos son sencillos y reproducibles, de corta duración, no precisan instrumental costoso o sofisticado y, además se realizan en animales disponibles habitualmente, como la rata y el ratón. Por lo anterior, forman parte del grupo de ensayos de cribado.

Los estudios *in vivo* valoran los principales signos de la inflamación, como el tumor (edema subplantar, pulmonar y auricular), el color (intensidad de eritema cutáneo), el dolor (contracciones abdominales, respuesta a la aplicación de presión), el calor (piresis), el aumento de la permeabilidad capilar (extravasación de colorante), la formación de exudado (pleuritis), la migración leucocitaria (pleuritis, fagocitosis) y la proliferación celular (fibroma, granuloma) (Willoughby, 2003). Para fines de la presente investigación se utilizaron los modelos de edema.

Los ensayos de edema se caracterizan por inducir una respuesta local y, la inhibición del edema es un indicativo del efecto antiinflamatorio de la sustancia que se evalúa. Dentro de las sustancias que promueven el edema se mencionan a los ésteres de forbol (por ejemplo, el acetato de tetradecanoilforbol, TPA), la carragenina tipo kappa, el propiolato de etilfenilo, el ácido araquidónico y la fosfolipasa, entre otras. Por último, los mecanismos por los cuales estas sustancias promueven el edema son muy diversos (Willoughby, 2003).

5.1.1. Modelo de edema inducido por TPA

El modelo de edema agudo inducido por TPA (fig. 9) en la oreja del ratón (De Young *et al.*, 1989) comprende la aplicación del TPA en el pabellón auditivo del animal. La respuesta inflamatoria es local y consiste en eritema, edema e infiltración de LPMN; además se liberan mediadores de tipo eicosanoide y

se induce la degranulación de mastocitos. Por lo tanto, las sustancias que inhiben la biosíntesis de prostaglandinas y de leucotrienos producen resultados considerables en este estudio.

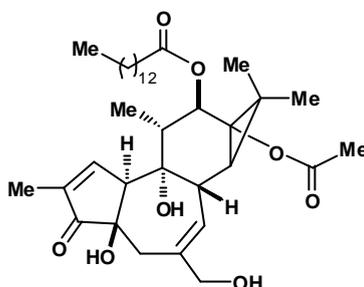


Figura 9
Estructura química de TPA

Los ésteres de forbol son diterpenos aislados de especies de la familia *Euphorbiaceae*, de acción procarcinogénica (Hecker, 1968). La respuesta biológica del TPA es multifactorial (fig. 10), sin embargo algunos mecanismos no se conocen con precisión. La estereoquímica de los ésteres de forbol los hace análogos conformacionales al diacilglicerol y en consecuencia se desencadena una cascada de eventos bioquímicos vinculados con la proteína cinasa C (PKC) dependiente de calcio.

La acción mitogénica de los ésteres de forbol involucra la activación de las enzimas descarboxilasa de ornitina y ATPasa, del factor activador de plasminógeno, un intercambio iónico de Na^+ / H^+ a través de las membranas, la inhibición de la unión entre células alteradas, la fosforilación de ciertos receptores para factores de crecimiento y las modificaciones en el esqueleto celular (Tardón-García, 2001).

Por otro lado, el TPA estimula la activación de PLA_2 (Nam *et al.*, 1990) y con ello la consecutiva liberación de ácido araquidónico. Sin embargo, el TPA favorece de manera especial, la translocación de 5-LO hacia la membrana nuclear (Werz *et al.*, 2001). El TPA también participa en la inducción de quimiotaxis y en la diferenciación e infiltración de granulocitos y monocitos; estos últimos son responsables de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y citocinas (Fürstenberger *et al.*, 1989). Existen evidencias de la participación del factor activador de plaquetas (PAF) (Ricupero *et al.*, 1992) y de radicales libres ERN (Thannickal y Fanburg, 2000) en la respuesta de TPA.

Recientemente, se ha sugerido una relación entre la activación del factor nuclear κ B y la acción de TPA (Hayakawa *et al.*, 2003; Bowden, 2004).

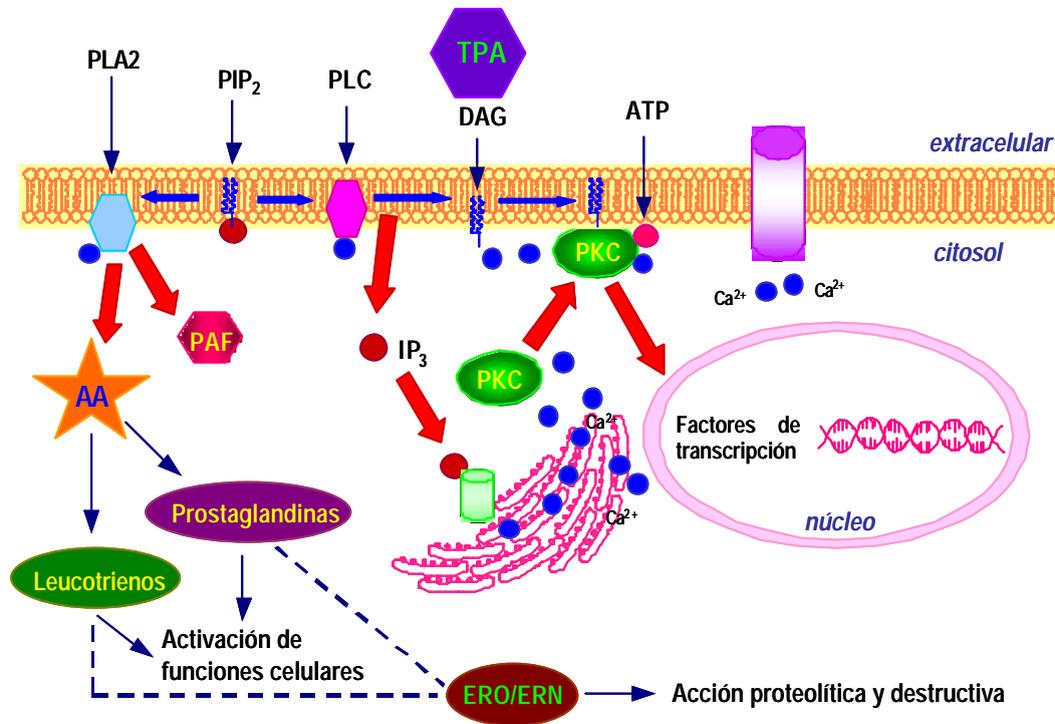


Figura 10
Mecanismos involucrados en el edema inducido por TPA

5.1.2. Modelo de edema inducido por carragenina

El modelo de edema agudo inducido por carragenina en la pata de la rata (Winter *et al.*, 1962) consiste en la administración subcutánea de una disolución de carragenina en la aponeurosis plantar de la rata; con ello se genera únicamente una reacción inflamatoria local, que no se modifica por factores ajenos.

La carragenina tipo kappa es un mucopolisacárido constituido por unidades alternadas de α - y β -D-galactopiranosas (fig. 11), aislado de una especie de alga marina *Chondrus crispus*. El ensayo es reproducible y su respuesta biológica alcanza la plenitud en un tiempo de 3 a 5 h. El modelo se usa en

la evaluación de los fármacos AINES, debido a que los resultados del ensayo son comparables con aquellos observados en la clínica (Di Rosa y Willoughby, 1971; Willoughby, 2003).

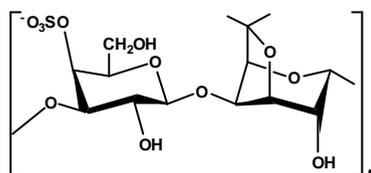


Figura 11
Estructura química de carragenina tipo kappa

El edema inducido por carragenina involucra la liberación de diversos autacoides y se amplifica por algunos factores del complemento (fig. 12). La respuesta deriva de un evento bifásico. La etapa temprana (0-1 h) se regula por histamina, serotonina, bradicinina y 5-hidroxitriptamina. La última fase, comprendida hasta la sexta hora, está mediada por prostaglandinas E₁, E₂ y F_{2α} (Di Rosa *et al.*, 1971; Di Rosa, 1972), producidas por la acción de COX-2 (Siebert *et al.*, 1994). La salida de proteínas plasmáticas sucede durante todo el período. La migración celular, principalmente de LPMN, se produce en la segunda hora.

Otro mediador importante en la respuesta por carragenina es el óxido nítrico (NO) (Salvemini *et al.*, 1996; Omote *et al.*, 2001; Posadas *et al.*, 2004). El NO incrementa la permeabilidad vascular y modifica el flujo sanguíneo local, en consecuencia induce el edema (Moncada *et al.*, 1991). La infiltración de neutrófilos hacia la zona de daño y su activación originan radicales derivados de oxígeno. También, el NO reacciona con el anión superóxido para formar peroxinitrito, molécula que produce la peroxidación de lípidos, la oxidación de grupos tiónicos, la nitrosación y nitración de aminoácidos y, por lo tanto, genera daño celular (Fantone y Ward, 1982; Rubbo *et al.*, 1994).

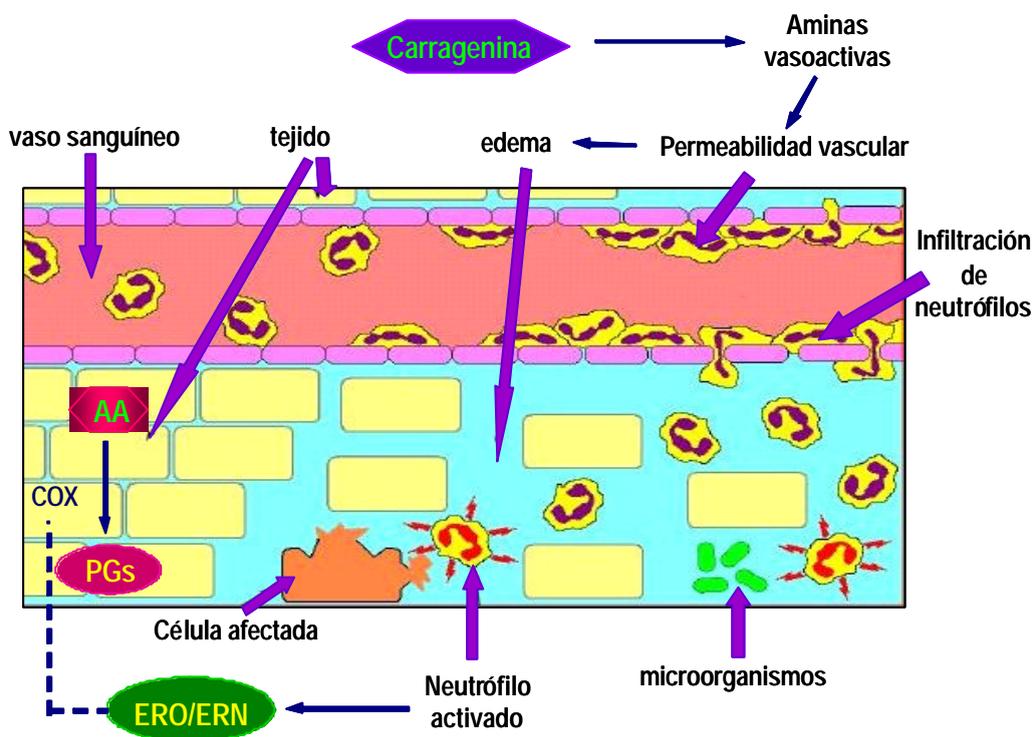


Figura 12
Mecanismos involucrados en el edema inducido por carragenina

5.2. Ensayos *in vitro*

Los adelantos tecnológicos de nuestros días y la tendencia para reducir, mejorar o reemplazar los experimentos con animales han favorecido el desarrollo de una variedad de ensayos *in vitro*. Mediante estos métodos es posible determinar los modos de acción de las sustancias.

Algunos triterpenos poseen efectos inhibitorios contra las enzimas lipooxigenasa y sintasa inducible del NO. Entre ellos, se ha demostrado que los ácidos masticadienoico (1) y masticadienólico (3), aislados de *Pistacia terebinthus*, inhiben la producción de LTB₄. Por otro lado, el LTB₄ y el NO participan en las respuestas inducidas en los ensayos *in vivo* descritos en párrafos anteriores. Por lo anterior, se realizó el estudio de los efectos farmacológicos de 1 y 2 y algunos derivados en los modelos de producción de leucotrieno B₄ (LTB₄) y de óxido nítrico en cultivos celulares.

5.2.1. Producción de óxido nítrico en macrófagos peritoneales de ratón

El ensayo de producción de óxido nítrico se efectúa en macrófagos peritoneales de ratón. Los macrófagos estimulados sintetizan y liberan un gran número de moléculas, como las especies reactivas de oxígeno, las enzimas lisosomales de acción fagocítica, los mediadores lipídicos, los factores de complemento, de coagulación, de crecimiento y de diferenciación y, las citocinas. Los agentes estimulantes pueden ser el TPA, el zimosán y el lipopolisacárido (LPS).

El modelo consiste en la obtención de una población de macrófagos del abdomen de ratones con peritonitis inducida por tioglicolato. Las células aisladas se estimulan con LPS y el NO producido se determina mediante la presencia de nitritos, productos finales del metabolismo del NO en fase acuosa. Por último, el método de Griess permite la cuantificación de nitritos (Dirsch *et al.*, 1998).

Durante el ensayo de producción de óxido nítrico se determinan los efectos de las sustancias sobre la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolio) (Mossman, 1983). El ensayo consiste en la reducción del MTT (color amarillo) por la acción de las enzimas mitocondriales (deshidrogenasas de succinato o lactato) presentes en las células viables. El formazán producido al final se cuantifica mediante un espectrofotómetro, el compuesto es de color violeta, insoluble en agua y soluble en dimetilsulfóxido (DMSO). El método constituye una medida de la respiración celular y, la cantidad de formazán es proporcional al número de células vivas.

El NO regula diversos mecanismos en la inflamación (fig. 13). En el endotelio vascular, el NO producido constitutivamente inhibe las interacciones del leucocito al endotelio. En tanto, en la inflamación, el NO producido excesivamente es tóxico para los microorganismos y las células tumorales y, también causa un severo daño tisular. Esto último a través de la oxidación de grupos sulfidrilos de aminoácidos y de la promoción de especies reactivas como óxidos de nitrógeno y peroxinitrito, moléculas consideradamente reactivas y oxidantes. También, el NO puede actuar sobre el factor NF- κ B y coordinar la producción de prostanoïdes y la respuesta inmune (Connelly *et al.*, 2001; Feihl *et al.*, 2004).

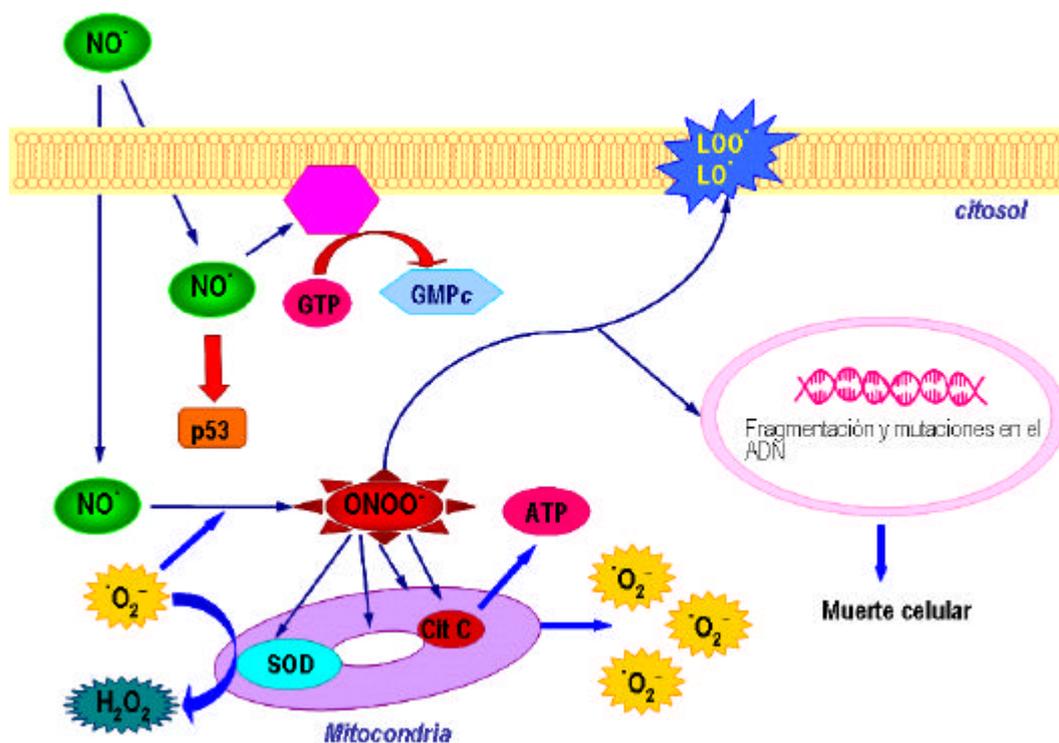


Figura 13

Metabolismo del óxido nítrico durante la inflamación

(Tomada de www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Life_Science/Cell_Signaling/Scientific_Resources/Pathway_Slides_Charts/Nitric_Oxide_Metabolism.html). ADN, ácido desoxiribonucleico; ATP, trifosfato de adenosina; Cit C, citocromo C; GMPc, monofosfato de guanosina cíclico; GTP, trifosfato de guanosina; H₂O₂, peróxido de hidrógeno; LOO· y LO·, radicales lipoperóxido y lipoóxido; NO, óxido nítrico; ONOO⁻, anión peroxinitrito; O₂⁻, anión superóxido; p53, proteína 53; SOD: dismutasa de superóxido.

5.2.2. Producción de leucotrieno B₄ en leucocitos polimorfonucleares de rata

El ensayo de producción de leucotrieno B₄ (LTB₄, estructura en la fig. 14) se efectúa en leucocitos PMN peritoneales de rata (Hoult *et al.*, 1994). Las células se estimulan por la presencia de calcio, tras la acción del ionóforo A23187, agente movilizador del calcio intracelular. La activación desencadena una serie de eventos relacionados con la PLA₂ dependiente de calcio, la liberación del AA y su exclusiva metabolización en eicosanoides derivados de la 5-LO (Tithof *et al.*, 1998; Albert *et al.*, 2003). El calcio catión se une a la porción N-terminal de la forma inactiva de 5-LO y simula el dominio G₂. Este complejo estimula la liberación y activación de la 5-LO (Albert *et al.*, 2003).

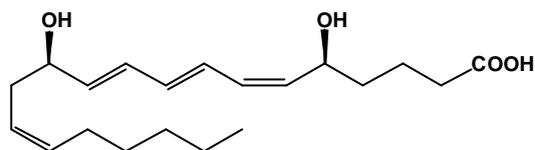


Figura 14
Estructura química del leucotrieno B₄

El modelo consiste en la obtención de una población de LPMN del abdomen de ratas con peritonitis inducida por una dosis de almidón. Las células aisladas se tratan con el ionóforo y, la cuantificación de LTB₄ se realiza a través de un ensayo inmunoenzimático. El método se fundamenta en la competitividad por el anticuerpo del LTB₄ que existe entre el LTB₄ (presente en la muestra) y el LTB₄ unido a la enzima fosfatasa alcalina. Durante la incubación pueden ocurrir las dos uniones, es decir la del LTB₄ con el anticuerpo y la del conjugado con el anticuerpo. Después, se adiciona el sustrato de la enzima y se genera un producto, cuya intensidad de color es inversamente proporcional a la concentración de LTB₄ en la muestra.

5.3. Ensayo de citotoxicidad *in vitro*

Los ensayos de citotoxicidad *in vitro* establecen el índice de proliferación o viabilidad celular mediante el conteo de células vivas, los datos de inhibición indican la capacidad citotóxica de la sustancia evaluada.

El ensayo consiste en la incubación de cultivos celulares de líneas tumorales en presencia o ausencia de sustancias de prueba; posteriormente, las células se fijan y el efecto de viabilidad se determina mediante el ensayo colorimétrico de sulforrodamina B (SRB) (Skehan *et al.*, 1990). El método se fundamenta en la tinción de proteínas celulares totales con el colorante SRB, el cual es un aminoxanteno que contiene dos sustituyentes sulfónicos y en condiciones ligeramente ácidas, el carácter aniónico de la SRB forma enlaces electrostáticos exclusivamente con aminoácidos básicos (histidina, lisina, arginina) de células vivas. Por lo tanto, la intensidad del color es directamente proporcional a la viabilidad celular. El método es simple, seguro y genera resultados reproducibles (Skehan *et al.*, 1990; Monks *et al.*, 1991).

6. ESTUDIO DE RELACIÓN ESTRUCTURA -ACTIVIDAD

Los primeros intentos en el descubrimiento de fármacos activos, así como de nuevos cabeza de serie se basaron en encontrar correlaciones entre la estructura química de los compuestos en cuestión y su actividad biológica. De ahí surgieron los métodos cuantitativos de relación estructura-actividad (REA), que en la actualidad son de uso común tanto en el diseño de nuevos fármacos como en el conocimiento previo de las propiedades farmacológicas que presentarán un grupo de moléculas.

Los métodos REA se dividen en dos categorías, los de aproximación topológica y los de modelado molecular. Los topológicos consideran las estructuras de las moléculas en forma plana, y utilizan la estadística para reconocer los grupos funcionales que se relacionan con la actividad. Por su parte, los métodos de modelado analizan las moléculas en tres dimensiones y, mediante el análisis conformacional, la mecánica cuántica, los campos de fuerzas y la termodinámica estadística producen gráficos moleculares. Estos últimos permiten la visualización y manipulación de las moléculas, y proporcionar información acerca de las posibles interacciones con un receptor (Langridge, 1981).

El análisis comparativo de potenciales de interacción (CoMFA, Comparative Molecular Field Analysis) es una técnica cuantitativa tridimensional de relación estructura-actividad. El ensayo se aplica cuando se desconoce la diana farmacológica y considera que ciertas propiedades biológicas se explican por las interacciones estéricas y electrostáticas de las moléculas con un supuesto receptor. Sin embargo, el blanco farmacológico (receptor, enzima, canal iónico o molécula transportadora) debe ser el mismo para todas las moléculas en cuestión. El CoMFA supone que existe complementariedad estructural entre el receptor hipotético y las moléculas; también asume que el sitio receptor se mantiene sin cambio y que las distintas conformaciones estructurales de unión presentan un patrón estérico y electrónico semejante. Por último, que las interacciones responsables del efecto biológico son no covalentes (Cramer, 1988).

El receptor imaginario representado por un cúmulo de átomos sonda, junto con una serie de ligandos (o fármacos) sobrepuestos se posicionan dentro de una malla tridimensional estándar. Las aproximaciones de las moléculas con el receptor determinan las características estéricas y electrostáticas, cuyos valores se someten a un análisis estadístico y se obtienen exclusivamente los parámetros óptimos. La

visualización gráfica en forma de contornos de potenciales de interacción estéricos y electrostáticos permite establecer los requerimientos fisicoquímicos que las moléculas deben cubrir para unirse al blanco hipotético. Finalmente, el método permite diseñar nuevas moléculas activas a partir de los resultados obtenidos (Bradley y Waller, 2001).

II. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Las plantas medicinales y los extractos obtenidos de ellas representan una alternativa en el tratamiento de diversas enfermedades. En México gracias al amplio conocimiento folclórico de las miles de especies vegetales existentes, la población hace uso de la medicina tradicional.

Es tal el impacto de esta práctica terapéutica, que en la actualidad muchos tipos de fármacos incluyen una molécula de origen natural. La aspirina, la atropina, la efedrina, la digoxina, la morfina, la quinina, la reserpina y la tubocurarina son algunos ejemplos de estos fármacos (Anwarul y Atta-ur-Rahman, 2005).

Por otro lado, los triterpenos son productos naturales que generalmente se encuentran en las especies vegetales, además poseen una variedad de propiedades biológicas. Por ejemplo, los triterpenos tetracíclicos poseen propiedades antimicrobiana (Cantrell *et al.*, 1996), citotóxica (Gan *et al.*, 1998), inmunomoduladora (Çalis *et al.*, 1997), y antiinflamatoria (Safayhi *et al.*, 1997), entre otras. Otro dato interesante es que muchos triterpenos se han utilizado como moléculas prototipo para generar un número de derivados con una actividad farmacológica en especial.

La literatura señala que el cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) es una planta medicinal que produce triterpenos tetracíclicos, principalmente los ácidos **1** y **2**. La corteza es la porción medicinal de la especie, y se ha utilizado en el tratamiento de diversas patologías asociadas con la inflamación, como las infecciones cutáneas, las úlceras gástricas y el cáncer de estómago. Aunque son muchos los usos etnobotánicos atribuidos a la especie, solo algunos de ellos se han justificado científicamente. Así se han demostrado las propiedades antiulcerogástrica (Argueta *et al.*, 1994; Navarrete *et al.*, 1998; Arrieta *et al.*, 2003), hipocolesterolemica (Navarrete, 1982; Mata *et al.*, 1991), antibacteriana (Rivero-Cruz *et al.*, 2005), antiprotozoaria (Del Rayo *et al.*, 2000) y citotóxica (Makino *et al.*, 2004).

A pesar que el cuachalalate se ha utilizado como remedio antiinflamatorio y antitumoral, no se ha realizado un estudio apropiado que justifique estos usos etnobotánicos. Tomando en cuenta lo anterior se decidió efectuar el estudio de las propiedades antiinflamatoria y citotóxica de los extractos orgánico y acuoso del cuachalalate, así como de los ácidos **1** y **2** aislados de la especie.

Continuando con el estudio y con el fin de conocer los grupos funcionales indispensables para las propiedades antiinflamatorias y citotóxicas de los ácidos **1** y **2**, sus estructuras se modificarán por

métodos químicos. Los derivados obtenidos se evaluarán mediante diversos ensayos de actividad biológica.

La serie de ensayos de actividad antiinflamatoria se seleccionarán tomando en cuenta las siguientes contribuciones:

1. Los ácidos **1** y **2**, aislados de *Schinus terebinthifolius*, son inhibidores específicos de tipo competitivo de la enzima fosfolipasa A₂ de secreción (PLA₂s) (Jain *et al.*, 1995).
2. Los ácidos **1** y **3**, aislados de *Pistacia terebinthus*, fueron activos en los modelos de edema inducido por aplicaciones repetidas de TPA en la oreja de ratón y de edema inducido por PLA₂ en la pata de la rata. También, estos ácidos mostraron actividad en pruebas histológicas, y en la determinación de LTB₄ en LPMN estimulados por ionóforo de calcio (Giner-Larza *et al.*, 2002).

Adicionalmente, se realizará un análisis de relación estructura-actividad con los datos de dosis efectiva media. Mediante este estudio se reconocerán los grupos funcionales responsables de las actividades de las moléculas activas.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Teniendo como antecedentes que el cuachalalate es una especie medicinal muy recurrida por sus propiedades biológicas es apropiado considerar que si se realiza con el cuachalalate y sus componentes triterpénicos mayoritarios, un estudio para determinar las propiedades antiinflamatorias y antitumorales mediante los métodos de evaluación biológica adecuados, se demostrarán sus potenciales farmacológicos. Con el conocimiento de las propiedades antiinflamatorias y antitumorales de la especie y de los ácidos masticadienoico (**1**) y 3-epimasticadienolico (**2**), éstos podrían emplearse como moléculas cabezas de serie, y mediante variación molecular obtener un número de derivados.

Para contribuir con la comprobación de las propiedades antes mencionadas para el cuachalalate y con el desarrollo de fármacos antiinflamatorios y citotóxicos a partir de los ácidos **1** y **2** se establecieron los siguientes objetivos.

1. Evaluar la efectos biológicos de los extractos acuoso y hexánico de la especie, así como los ácidos **1** y **2** en los modelos de edema agudo inducido por TPA en la oreja del ratón y por carragenina en la pata de la rata.
2. Determinar los efectos de los extractos acuoso y hexánico de la especie, y de los ácidos **1** y **2** en el modelo de producción de óxido nítrico en macrófagos peritoneales activados por lipopolisacárido.
3. Evaluar la actividad de los extractos acuoso y hexánico de la especie, y de los ácidos **1** y **2** en el ensayo de citotoxicidad en líneas celulares de cáncer.
4. Proponer y efectuar diversas modificaciones estructurales a los ácidos **1** y **2** tomando en cuenta los grupos funcionales presentes.
5. Determinar los efectos de los derivados producidos en el modelo de edema inducido por TPA en la oreja de ratón.
6. Evaluar la actividad de algunos derivados en el modelo de edema inducido por carragenina.

-
7. Determinar los efectos de los ácidos **1** y **2**, y algunos derivados en el modelo de producción de óxido nítrico en macrófagos peritoneales de ratón no estimulados.
 8. Determinar los efectos de los ácidos **1** y **2**, y algunos derivados en el modelo de producción de leucotrieno B₄ en LPMN de rata estimulados con ionóforo de calcio.
 9. Evaluar la actividad citotóxica de algunos derivados de los ácidos **1** y **2** mediante el ensayo de citotoxicidad en líneas tumorales.
 10. Distinguir los grupos farmacofóricos en los triterpenos más activos en los diferentes ensayos de actividad antiinflamatoria y citotóxica.
 11. Realizar un estudio de relación estructura-actividad, mediante el método CoMFA, tomando en cuenta los datos de DE₅₀ de los compuestos en el modelo de edema inducido por TPA.

***IV. SECCIÓN
EXPERIMENTAL***

1. QUÍMICA

1.1. Material y equipo

La evaporación se realizó en un rotavapor Buchi 110.

Para las cromatografías en columna (cc) se utilizó sílice 60 Ahigram Sil G, kiesel, malla 70-230, (Merck), con indicador de fluorescencia UV 254. Las cromatografías en capa fina (ccf) se realizaron en cromatofolios de aluminio cubiertos de sílice DC Fertigplatten Sil G-200, UV (Merck), de 0.2 mm de espesor. Como reveladores se emplearon una disolución de sulfato cérico (Ce_2SO_4) al 1 % en ácido sulfúrico (H_2SO_4 , Bæker) 2 N; y una lámpara de luz UV de 254 y 365 nm (Cole Parmer 9815 series Lamps).

Los puntos de fusión se determinaron en un equipo Fisher Johns, y se informaron sin corrección.

La espectrofotometría en el ultravioleta (UV) visible se obtuvo en un espectrofotómetro Shimadzu modelo U160. Los resultados de longitud de onda máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) y coeficiente de extinción molar se expresaron en nanómetros (nm) y logaritmo base 10 ($\log \epsilon$), respectivamente.

Los espectros de absorción en la región infrarroja (IR) se obtuvieron en los espectrofotómetros Nicolet modelo Magna 750 y Nicolet FT-IR5-SX, con las técnicas de pastilla en KBr, y de disolución en CHCl_3 , respectivamente. Las absorbancias se presentaron en cm^{-1} , para estas se indicaron las siguientes abreviaturas: d (débil), m (mediana), f (fuerte).

Los experimentos de espectrometría de masas (EM) se realizaron en un espectrómetro JEOL JMS AX 505 HA mediante la técnica de impacto electrónico a 70 eV. Los resultados se presentaron como relación de masa respecto de la carga (m/z), junto con los porcentajes de abundancia relativa (% ar).

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) protónica (^1H) y de carbono 13 (^{13}C) se efectuaron en espectrómetros Varian Gemini 200, Varian VXR 300 y Bruker AS X 300, se utilizaron los siguientes disolventes deuterados (Aldrich): cloroformo (CDCl_3), sulfóxido de dimetilo ($\text{DMSO}-d_6$),

hexano (C_6D_6), metanol (CD_3OD) y acetona ($(CD_3)_2CO$). Se empleó tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los desplazamientos químicos (δ) se expresaron en partes por millón (ppm); las señales protónicas se indicaron con las siguientes abreviaturas: s (simple), d (doble), t (triple), q (cuádruple), dd (doble de doble), dt (doble triple), td (triple doble), qd (cuádruple doble), m (múltiple). Las constantes de acoplamiento (J) se indicaron en Hertz (Hz). Los experimentos adicionales de RMN incluyeron COSY-2D, DEPT ^{13}C y HETCOR.

Los datos de rayos X se adquirieron en un difractor Siemens D 5005 o Bruker Smart Apex CCD, con radiación de molibdeno.

El análisis de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) se realizó en un cromatógrafo Waters modelo Delta Prep 4000 acoplado con un detector de absorción UV Waters modelo 486. El equipo contenía una columna de sílice C-18 modelo Pegasil ODS (Senshu Scientific Co.) con dimensiones de 15 cm x 4.6 mm.

La mayoría de los disolventes empleados se destilaron previamente, y se almacenaron en recipientes de color ámbar. De esta manera se manipularon el cloruro de metileno (CH_2Cl_2) y el metanol (MeOH); el acetato de etilo (AcOEt) y el hexano se destilaron en presencia de $CaCl_2$; en tanto, el etanol (EtOH) se trató con hojuelas de magnesio en reflujo durante 18 h y se destiló.

1.2. Obtención de los ácidos masticadienoico y 3 α -hidroximasticadienoico

1.2.1. Material vegetal

La corteza de *Amphipterygium adstringens* se obtuvo de varios ejemplares recolectados en Barranca Honda, municipio de Tlaltizapán, estado de Morelos, México, en 1997. Una muestra vegetal se depositó en el Herbario de la especialidad de Botánica del Colegio de Postgraduados (Texcoco, Estado de México) con el número de registro 1531. La corteza se pulverizó y se dejó secar a temperatura ambiente.

1.2.2. Preparación de los extractos

Extracto acuoso. Una mezcla de 10 g de corteza en 90 mL de agua caliente se dejó hervir durante 2 min. Se dejó enfriar, y a continuación se filtró y liofilizó. Al término, se obtuvo un polvo fino (1.44 g rendimiento 14.4 %) de color rojo oscuro. Se colocó en un recipiente, se cerró herméticamente y se conservó en una cámara de desecación.

Extracto hexánico. El material seco (200 g) se trató con hexano (3 x 3 L) durante 12 h a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó a presión reducida y se obtuvo un concentrado de color café (12 g, rendimiento 6 %).

1.2.3. Fraccionamiento del extracto orgánico

El residuo orgánico se adsorbió en 100 g de sílice y se preparó la columna. La elución se realizó con un gradiente de hexano/AcOEt. Se colectaron 120 fracciones de 200 mL. Se reunieron las porciones con un comportamiento similar en *ccf* y resultaron 5 porciones (F1-F5): 0.5 g de F1 (fracciones 1-9, hexano), 1.2 g de F2 (fracciones 10-38, mezcla 9:1); 0.8 g de F3 (fracciones 39-45, mezcla 8:2); 0.6 g de F4 (fracciones 46-79, mezcla 7:3); y 2.9 g de F5 (fracciones 80-120, mezcla 1:1 y AcOEt al 100 %).

De la fracción F2, después de un proceso de recristalización con AcOEt se obtuvo un sólido blanco y se identificó como ácido masticadienoico (**1**) (0.98 g, rendimiento 0.49 %). En tanto, de la fracción F4 se obtuvo un sólido correspondiente al ácido 3 α -hidroximasticadienoico (**2**) (0.43 g, rendimiento 0.22 %). Las estructuras de **1** y **2** (fig. 8) se establecieron por comparación de sus datos físicos y espectroscópicos con aquellos publicados en la literatura (Barton y Seoane, 1956; Soriano-García *et al.*, 1987; Navarrete *et al.*, 1989; Mulholland y Nair, 1994; Papageorgiou *et al.*, 1997). La pureza de **1** y **2** se determinó por análisis de cromatografía de líquidos de alta resolución bajo las siguientes condiciones: acetonitrilo / agua 4:1 como fase móvil; velocidad de flujo de 1 mL/min, tiempo de corrida 25 min; longitud UV de medición 220 nm.

Ácido masticadienoico (1). Sólido cristalino de color blanco. Pf 164-172 °C. IR (KBr, cm^{-1}) 3328.6 (d); 2951.1 (m); 1705.8 (m); 1684.5 (m); 1631.8 (d); 1457.5 (d); 1381.2 (d); 1266.9 (m); 1242.6 (m). **EMIE** m/z (% ar) 454 (18) M^+ , 440 (32), 439 (100) $[\text{M}-\text{Me}]^+$, 421 (40) $[\text{M}-\text{Me}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 393 (8) $[\text{M}-\text{Me}-\text{HCOOH}]^+$, 95 (18) $[\text{C}_3\text{H}_{11}\text{O}_3]^+$. **RMN ^1H** (CDCl_3 , 200 MHz) 6.09 (td, 1H, H-24, $J = 1.3, 7.4$); 5.31 (c, 1H, H-7, $J = 3.2$); 2.76 (td, 1H, Hb-2, $J = 5.5, 14.5$); 2.25 (dt, 1H, Ha-2, $J = 3.6, 14.0$); 1.92 (d, 3H, Me-27, $J = 1.2$); 1.12 (s, 3H, Me-29); 1.05 (s, 3H, Me-19); 1.01 (s, 3H, Me-28); 1.01 (s, 3H, Me-30); 0.89 (d, 3H, Me-21, $J = 5.9$); 0.81 (s, 3H, Me-18). **RMN ^{13}C** (CDCl_3 , 50 MHz) 217.1 (C-3); 173.1 (C-26); 147.3 (C-24); 145.9 (C-8); 125.8 (C-25); 117.8 (C-7); 52.8 (C-5); 52.3 (C-17); 51.2 (C-14); 48.4 (C-9); 47.9 (C-4); 43.5 (C-13); 38.5 (C-1); 36.0 (C-20); 35.6 (C-22); 34.9 (C-2); 34.9 (C-10); 34.0 (C-15); 33.6 (C-12); 28.2 (C-16); 27.4 (C-30); 26.9 (C-23); 24.5 (C-28); 24.3 (C-6); 21.9 (C-18); 21.6 (C-29); 20.5 (C-27); 18.2 (C-11); 18.2 (C-21); 12.8 (C-19). Pureza cromatográfica: 92 %, tiempo de retención de 24.43 min.

Ácido 3a-hidroximasticadienoico (2). Sólido blanco amorfo. Pf 142-150 °C. IR (KBr, cm^{-1}) 3436.9 (m); 2950.4 (f); 2886.6 (m); 1695.2 (f); 1237.0 (m); 772.8 (m). **EMIE** m/z (% ar) 456 (18) M^+ , 441 (55) $[\text{M}-\text{Me}]^+$, 423 (100) $[\text{M}-\text{Me}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 43 (28). **RMN ^1H** ($\text{CDCl}_3/\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz) 5.89 (td, 1H, H-24, $J = 1.5, 7.5$); 5.24 (c, 1H, H-7, $J = 3.1$); 3.42 (d, 1H, H-3, $J = 2.7$); 1.90 (d, 3H, Me-27, $J = 1.2$); 1.64 (m, 2H, H-2); 0.97 (s, 3H, Me-28); 0.93 (s, 3H, Me-30); 0.90 (s, 3H, Me-18); 0.88 (d, 3H, Me-21, $J = 6.0$); 0.81 (s, 3H, Me-29); 0.76 (s, 3H, Me-19). **RMN ^{13}C** ($\text{CDCl}_3/\text{DMSO}-d_6$, 75 MHz) 169.6 (C-26); 145.5 (C-8); 142.5 (C-24); 126.5 (C-25); 117.3 (C-7); 75.2 (C-3); 52.3 (C-17); 50.6 (C-14); 48.0 (C-9); 43.9 (C-5); 42.9 (C-13); 36.8 (C-4); 35.4 (C-20); 35.2 (C-22); 34.1 (C-10); 33.4 (C-15); 33.3 (C-12); 30.7 (C-1); 27.5 (C-16); 27.3 (C-30); 26.6 (C-28); 26.0 (C-23); 25.0 (C-2); 23.3 (C-6); 21.2 (C-18); 21.2 (C-29); 20.2 (C-27); 17.7 (C-21); 17.4 (C-11); 12.4 (C-19). Pureza cromatográfica: 97 %, tiempo de retención de 15.58 min.

1.3. Obtención de los derivados del ácido masticadienoico

Los ácidos **1** y **2** se establecieron como moléculas de partida y mediante transformaciones químicas sencillas se generaron 26 derivados, de los cuales 18 (compuestos **3-20**) se obtuvieron a partir de **1** (anexo A). A continuación se describen los métodos de obtención, y los datos fisicoquímicos y espectroscópicos de 18 derivados obtenidos a partir del triterpeno **1**.

1.3.1. Ácido masticadienólico (3)

Una disolución metanólica (20 mL) de **1** (271.4 mg, 0.598 mmol) se trató con una disolución acuosa de borohidruro de sodio (NaBH_4 , Sigma Aldrich Chemical Co.) (260 mg en 3 mL). La mezcla se agitó durante 18 h a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó agua (20 mL), y el producto de reacción se extrajo con AcOEt (3 x 10 mL). La disolución se secó con Na_2SO_4 anhidro, y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo resultante se purificó mediante cristalización con MeOH, obteniéndose un sólido blanco (234.6 mg, rendimiento 86 %), con un pf 160-170 °C. **UV** ($\lambda_{\text{máx}}$ nm, log ϵ) 208.4, 4.09. **IR** (KBr, cm^{-1}) 3242.1 (m); 2950.7 (f); 2883.1 (f); 1688.3 (f); 1638.8 (m); 1458.3 (m); 1380.0 (m); 1031.0 (m). **EMIE** m/z (% ar) 456 (27) M^+ , 442 (32) $[\text{M}-14]^+$, 441 (100) $[\text{M}-\text{Me}]^+$, 423 (71) $[\text{M}-\text{Me}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 95 (30) $[\text{C}_3\text{H}_{11}\text{O}_3]^+$. **RMN ^1H** (DMSO- d_6 , 200 MHz) 5.88 (td, 1H, H-24, $J = 1.0, 7.4$); 5.25 (d, 1H, H-7, $J = 2.7$); 3.17 (m, 1H, H-3); 1.87 (d, 3H, Me-27, $J = 1.0$); 0.96 (s, 3H, Me-30); 0.95 (s, 3H, Me-28); 0.88 (d, 3H, Me-21, $J = 5.7$); 0.84 (s, 3H, Me-29); 0.80 (s, 3H, Me-18); 0.73 (s, 3H, Me-19). **RMN ^{13}C** (DMSO- d_6 , 50 MHz) 169.6 (C-26); 145.1 (C-8); 142.3 (C-24); 126.7 (C-25); 117.3 (C-7); 77.7 (C-3); 52.2 (C-5); 50.5 (C-14); 50.1 (C-17); 48.3 (C-9); 42.9 (C-13); 38.4 (C-4); 36.7 (C-1); 35.4 (C-20); 35.2 (C-22); 34.3 (C-10); 33.4 (C-12); 33.1 (C-15); 27.6 (C-2); 27.2 (C-16); 27.1 (C-28); 26.7 (C-30); 26.0 (C-23); 23.4 (C-6); 21.3 (C-18); 20.4 (C-27); 17.7 (C-21); 17.5 (C-11); 14.4 (C-29); 12.5 (C-19).

1.3.2. Ácido 24-25S-dihidromasticadienólico (4)

Se disolvieron 160 mg (0.352 mmol) de **1** en 20 mL de AcOEt, y se agregaron 60 mg de paladio/carbono (Pd/C) al 5 % (Sigma Aldrich). La suspensión se colocó en un sistema de hidrogenación a presión atmosférica, y se agitó durante 48 h a temperatura ambiente. El desarrollo de la reacción se siguió por *ccf* con un sistema de elución de hexano/AcOEt 2:1. La mezcla resultante se filtró a presión reducida sobre una cama de celita, el sólido se lavó con AcOEt y el filtrado se secó con Na_2SO_4 anhidro. El disolvente se evaporó a presión reducida. El residuo se purificó por *cc*, con un gradiente de hexano/AcOEt, obteniéndose un sólido amorfo blanco (88 mg, rendimiento 55 %), con un pf 140-142 °C. **UV** ($\lambda_{\text{máx}}$ nm, log ϵ) 214.0, 4.21. **IR** (CHCl_3 , cm^{-1}) 2949.9 (f); 2865.7 (m); 1742.0 (m); 1703.2 (f); 1464.7 (m); 1384.4 (m). **EMIE** m/z (% ar) 456 (22) M^+ , 441 (100) $[\text{M}-\text{Me}]^+$, 423 (13) $[\text{M}-\text{Me}-\text{H}_2\text{O}]^+$. **RMN ^1H** (CDCl_3 , 200 MHz) 5.30 (c, 1H, H-7, $J = 3.0$); 2.75 (td, 1H, Hb-2, $J = 5.5, 14.5$); 2.47 (c,

1H, H-25, $J = 7.0$); 2.25 (dt, 1H, Ha-2, $J = 3.3, 13.7$); 1.18 (dd, 3H, Me-27, $J = 1.0, 7.0$); 1.12 (s, 3H, Me-30); 1.05 (s, 3H, Me-29); 1.00 (s, 3H, Me-19); 1.00 (s, 3H, Me-28); 0.86 (d, 3H, Me-21, $J = 5.9$); 0.80 (s, 3H, Me-18). **RMN ^{13}C** (CDCl_3 , 50 MHz) 217.0 (C-3); 182.3 (C-26); 146.0 (C-8); 117.8 (C-7); 53.0 (C-5); 52.3 (C-17); 51.2 (C-14); 48.5 (C-9); 47.9 (C-4); 43.5 (C-13); 39.3 (C-25); 38.5 (C-1); 36.0 (C-20); 35.8 (C-22); 35.0 (C-2); 34.9 (C-10); 34.0 (C-15); 33.9 (C-12); 33.7 (C-24); 28.2 (C-16); 27.4 (C-28); 24.5 (C-29); 24.4 (C-6); 24.1 (C-23); 24.0 (C-11); 22.0 (C-18); 21.6 (C-30); 18.3 (C-21); 17.0 (C-27); 12.8 (C-19).

1.3.3. Ácido 24-25S-dihidromasticadienólico (5)

A una disolución metanólica de 125.2 mg de **4** (0.275 mmol en 20 mL) se agregó lentamente una disolución acuosa de NaBH_4 (100 mg/1 mL). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente durante 2 h. Posteriormente, se agregó agua y el producto se extrajo con AcOEt. La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, y el disolvente se evaporó. El residuo se cristalizó con AcOEt, y se obtuvo un sólido blanco en forma de agujas (98 mg, rendimiento 78 %), que fundió en 170-178 °C. **IR** (KBr, cm^{-1}) 3392.1 (m); 2943.0 (f); 2880.0 (m); 1707.2 (f); 1462.7 (m); 1229.0 (m); 1029.6 (m). **EMIE** m/z (% ar) 458 (27) M^+ ; 443 (100) $[\text{M}-\text{Me}]^+$; 425 (73) $[\text{M}-\text{Me}-\text{H}_2\text{O}]^+$; 303 (10) $[\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{O}_2]^+$; 95 (15) $[\text{C}_3\text{H}_{11}\text{O}_3]^+$. **RMN ^1H** (CDCl_3 , 300 MHz) 5.26 (c, 1H, H7, $J = 3.2$); 3.24 (dd, 1H, H3, $J = 4.5, 11.1$); 2.47 (c, 1H, H-25, $J = 7.0$); 1.18 (dd, 3H, Me-27, $J = 1.5, 7.2$); 0.97 (s, 3H, Me-19); 0.97 (s, 3H, Me-28); 0.86 (s, 3H, Me-30); 0.86 (d, 3H, Me-21, $J = 6.3$); 0.81 (s, 3H, Me-18); 0.75 (s, 3H, Me-29). **RMN ^{13}C** (CDCl_3 , 75 MHz) 180.4 (C-26); 145.9 (C-8); 117.9 (C-7); 79.3 (C-3); 53.1 (C-17); 51.2 (C-14); 50.7 (C-5); 49.0 (C-9); 43.6 (C-13); 39.0 (C-4); 39.0 (C-25); 37.3 (C-1); 36.1 (C-20); 35.9 (C-22); 35.0 (C-10); 34.1 (C-15); 34.0 (C-24); 33.9 (C-12); 28.2 (C-16); 27.7 (C-6); 27.6 (C-28); 27.3 (C-30); 24.0 (C-11); 24.0 (C-23); 21.9 (C-18); 18.4 (C-21); 18.2 (C-2); 17.0 (C-27); 14.7 (C-29); 13.1 (C-19).

1.3.4. Masticadienoato de metilo (6)

Se preparó una mezcla de 100 mg de Nmetil-N-nitroso-*p*-toluensulfonamida (Diazald al 99 %, Sigma Aldrich) en 250 mL de éter etílico (Et_2O , Merck), y se depositó en un embudo de separación. Por otro lado, en un matraz especial se colocó una disolución etanólica de KOH (100 mg en EtOH/agua, 1:1). El matraz se calentó en baño maría hasta la temperatura de 63 °C, y se mantuvo constante. La mezcla contenida en el embudo se adicionó lentamente al matraz. El diazometano generado en forma de gas

se recibió en un matraz con 250 mL de éter. La disolución preparada se adicionó lentamente, con agitación constante, a una disolución de **1** (710 mg, 1.564 mmol) en Et₂O (20 mL). La mezcla se dejó reposar durante 24 h y se evaporó hasta sequedad. El residuo se recristalizó con AcOEt y se obtuvieron cristales blancos (700 mg, rendimiento 98 %), que fundieron en 120-122 °C. **UV** ($\lambda_{\text{máx}}$ nm, log ϵ) 214.0, 4.13. **IR** (KBr, cm⁻¹) 2947.2 (m); 2861.1 (m); 1712.0 (f); 1648.3 (d); 1454.3 (m); 1251.0 (m); 1213.4 (m); 1154.2 (m). **EMIE** m/z (% ar) 468 (35) M⁺, 453 (100) [M-Me]⁺, 435 (5) [M-Me-H₂O]⁺, 421 (22) [M-2Me-H₂O]⁺. **RMN ¹H** (CDCl₃, 300 MHz) 5.93 (td, 1H, H-24, $J = 1.4, 7.7$); 5.30 (c, 1H, H-7, $J = 3.2$); 3.74 (s, 3H, Me-31); 2.76 (td, 1H, Hb-2, $J = 5.5, 14.5$); 2.24 (dt, 1H, Ha-2, $J = 3.4, 14.5$); 1.89 (d, 3H, Me-27, $J = 1.3$); 1.12 (s, 3H, Me-30); 1.05 (s, 3H, Me-19); 1.05 (s, 3H, Me-29); 1.00 (s, 3H, Me-28); 0.90 (d, 3H, Me-21, $J = 6.6$); 0.81 (s, 3H, Me-18). **RMN ¹³C** (CDCl₃, 75 MHz) 216.9 (C-3); 168.6 (C-26); 146.0 (C-8); 144.0 (C-24); 126.5 (C-25); 117.8 (C-7); 52.9 (C-5); 52.3 (C-17); 51.2 (C-14); 51.2 (C-31); 48.5 (C-9); 47.9 (C-4); 43.5 (C-13); 38.5 (C-1); 36.0 (C-20); 35.7 (C-22); 34.9 (C-2); 34.9 (C-10); 34.0 (C-15); 33.6 (C-12); 28.2 (C-16); 27.4 (C-28); 26.7 (C-23); 24.5 (C-29); 24.4 (C-6); 21.9 (C-18); 21.6 (C-30); 20.7 (C-27); 18.2 (C-11); 18.2 (C-21); 12.8 (C-19).

1.3.5. Masticadienolato de metilo (7)

Una cantidad de 158.6 mg de **3** (0.348 mmol) se disolvió en 20 mL de una mezcla de CH₂Cl₂/MeOH 2:1. Posteriormente, se agregó lentamente una disolución etérea de diazometano. La mezcla de reacción se dejó reposar durante 24 h y el disolvente se evaporó. El residuo se purificó por cc, y se obtuvo un producto blanco cristalino (72 mg, rendimiento 44 %). También el producto se preparó a partir de la reducción de **6** con NaBH₄. Para ello se disolvieron 52 mg de **6** (0.115 mmol) en 15 mL de MeOH. A continuación se agregó una disolución de NaBH₄ (55.6 mg en 1 mL de agua), y se agitó durante 48 h, en temperatura ambiente. La mezcla se evaporó a presión reducida, se extrajo con AcOEt, se lavó con agua y se secó con Na₂SO₄ anhidro. Se obtuvo el producto como un sólido blanco (34.6 mg, rendimiento 66 %), que fundió en 98-108 °C. **UV** ($\lambda_{\text{máx}}$ nm, log ϵ) 205.0, 3.86. **IR** (KBr, cm⁻¹) 3562.9 (m); 3446.5 (m); 2952.3 (f); 2883.5 (f); 1715.0 (f); 1645.4 (m); 1454.7 (m); 1216.8 (m); 1151.3 (m); 1032.8 (m). **EMIE** m/z (% ar) 470 (12) M⁺, 455 (74) [M-Me]⁺, 437 (100) [M-Me]⁺, 187 (38), 95 (26). **RMN ¹H** (CDCl₃, 300 MHz) 5.93 (td, 1H, H-24, $J = 1.3, 7.3$); 5.26 (d, 1H, H-7 $J = 3.3$); 3.74 (s, 3H, Me-31); 3.25 (dd, 1H, H-3, $J = 4.3, 10.9$); 1.89 (d, 3H, Me-27, $J = 1.1$); 0.97 (s, 3H, Me-30); 0.97 (s, 3H, Me-28); 0.89

(d, 3H, Me-21, $J = 6.1$); 0.86 (s, 3H, Me-29); 0.81 (s, 3H, Me-18); 0.75 (s, 3H, Me-19). **RMN ^{13}C** (CDCl_3 , 75 MHz) 168.6 (C-26); 145.8 (C-8); 144.1 (C-24); 126.4 (C-25); 117.8 (C-7); 79.2 (C-3); 52.9 (C-5); 51.2 (C-31); 50.6 (C-14); 50.6 (C-17); 48.9 (C-9); 43.6 (C-13); 39.0 (C-4); 37.2 (C-1); 36.1 (C-20); 35.7 (C-22); 34.9 (C-10); 34.0 (C-15); 33.7 (C-12); 28.2 (C-16); 27.7 (C-2); 27.6 (C-30); 27.3 (C-28); 26.7 (C-23); 23.9 (C-6); 21.9 (C-18); 20.7 (C-27); 18.2 (C-21); 18.1 (C-11); 14.7 (C-29); 13.1 (C-19).

1.3.6. 24-25S-dihidromasticadienoato de metilo (8)

A una disolución de 147 mg de **6** (0.314 mmol) en 20 mL de AcOEt se agregaron 75 mg de Pd/C al 5 %. La mezcla se puso en un sistema de hidrogenación durante 48 h, en agitación constante y a temperatura ambiente. La mezcla de reacción resultante se trató de manera análoga como se hizo en la obtención de **4**, obteniéndose un producto sólido blanco puro (66 mg, rendimiento 45 %). Pf 67-74 °C. **UV** ($\lambda_{\text{máx}}$ nm, log ϵ) 205.0, 3.85. **IR** (KBr, cm^{-1}) 2971.8 (m); 2945.5 (m); 2860.2 (d); 1738.4 (m); 1705.8 (m); 1460.6 (d); 1163.7 (d). **EMIE** m/z (% ar) 470 (23) M^+ , 456 (34) $[\text{M}-14]^+$, 455 (100) $[\text{M}-\text{Me}]^+$, 423 (8) $[\text{M}-\text{Me}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 95 (12) $[\text{C}_3\text{H}_{11}\text{O}_3]^+$. **RMN ^1H** (CDCl_3 , 300 MHz) 5.31 (c, 1H, H-7, $J = 3.0$); 3.67 (s, 3H, Me-31); 2.76 (td, 1H, Hb-2, $J = 5.5, 14.3$); 2.44 (c, 1H, H-25, $J = 6.9$); 2.25 (dt, 1H, Ha-2, $J = 3.3, 14.0$); 1.14 (dd, 3H, Me-27, $J = 1.1, 7.0$); 1.12 (s, 3H, Me-30); 1.05 (s, 3H, Me-29); 1.00 (s, 3H, Me-19); 1.00 (s, 3H, Me-28); 0.85 (d, 3H, Me-21, $J = 6.3$); 0.80 (s, 3H, Me-18). **RMN ^{13}C** (CDCl_3 , 75 MHz) 216.9 (C-3); 177.4 (C-26); 146.0 (C-8); 117.8 (C-7); 53.0 (C-5); 52.3 (C-17); 51.4 (C-31); 51.2 (C-14); 48.5 (C-9); 47.9 (C-4); 43.5 (C-13); 39.4 (C-25); 38.5 (C-1); 36.0 (C-20); 35.8 (C-22); 35.0 (C-2); 34.9 (C-10); 34.2 (C-15); 34.0 (C-24); 33.6 (C-12); 28.2 (C-16); 27.4 (C-28); 24.5 (C-29); 24.4 (C-6); 24.0 (C-23); 22.0 (C-18); 21.6 (C-30); 18.3 (C-11); 18.3 (C-21); 17.0 (C-27); 12.8 (C-19).

1.3.7. 24-25S-dihidromasticadienolato de metilo (9)

Una cantidad de 44 mg de **5** (0.096 mmol) se disolvió en 20 mL de CH_2Cl_2 . Posteriormente, se agregó lentamente una disolución etérea de diazometano. La mezcla de reacción se dejó reposar durante 20 h y el disolvente se evaporó. Se obtuvo un residuo aceitoso de color amarillo (33 mg, rendimiento 72.8 %). **EMIE** m/z (% ar) 472 (2) M^+ , 458 (4) $[\text{M}-14]^+$, 455 (8) $[\text{M}-\text{OH}]^+$, 443 (22) $[\text{M}-29]^+$, 425 $[\text{M}-29-\text{H}_2\text{O}]^+$, 226 (100), 191 (73). **RMN ^1H** (CDCl_3 , 300 MHz) 5.25 (m, 1H, H-7); 3.67 (s, 3H, Me-31); 3.25 (dd, 1H, H-3, $J = 4.2, 11.1$); 2.44 (dd, 2H, $J = 7.2, 13.2$); 1.15 (d, 3H, Me-27, $J = 6.9$); 0.97 (s, 3H); 0.86 (s, 3H); 0.80

(s, 3H); 0.74 (s, 3H). **RMN ^{13}C** (CDCl_3 , 75 MHz) 177.3 (C-26); 145.8 (C-8); 117.8 (C-7); 79.3 (C-3); 53.0 (C-5); 51.4 (C-31); 49.0 (C-9); 43.5 (C-13); 39.5 (C-25); 36.0 (C-20); 35.9 (C-22); 34.2 (C-15), 34.0 (C-24); 33.8 (C-12); 28.2 (C-16); 27.7 (C-28); 24.0 (C-23); 22.0 (C-18); 21.9 (C-30); 18.3 (C-11); 18.1 (C-21); 17.2 (C-27); 16.9; 14.7; 13.1 (C-19).

1.38. Isomasticadienoato de etilo (10)

Se disolvieron 65 mg (0.143 mmol) de **1** en 60 mL de EtOH previamente secado. A continuación se adicionó lentamente 1 mL de H_2SO_4 concentrado, seguido de 3 mL de ortoformiato de metilo ($\text{CH}(\text{OCH}_3)_3$, Aldrich). La mezcla se reflujo durante 6 h. Posteriormente, se agregó agua (40 mL) y se extrajo con AcOEt (3 x 10 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro y el disolvente se evaporó. El residuo se purificó por α usando un gradiente de hexano/AcOEt. Se obtuvo un producto aceitoso de color amarillo (63 mg, rendimiento 91 %). **IR** (CHCl_3 , cm^{-1}) 2956.3 (f); 2873.5 (f); 1699.5 (f); 1646.9 (d); 1457.8 (m); 1374.4 (m). **EMIE** m/z (% ar) 482 (64) M^+ , 467 (20) $[\text{M}-\text{Me}]^+$, 437 (13) $[\text{M}-45]^+$, 355 (100) $[\text{C}_{24}\text{H}_{35}\text{O}_2]^+$, 313 (43) $[\text{M}-169]^+$, 263 (65) $[\text{M}-219]^+$. **RMN ^1H** (CDCl_3 , 300 MHz) 5.86 (td, 1H, H-24, $J = 1.5, 7.3$); 4.16 (c, 2H, H-31, $J = 7.0$); 1.86 (d, 3H, Me-27, $J = 1.5$); 1.27 (t, 3H, Me-32, $J = 7.0$); 1.07 (s, 3H, Me-30); 1.06 (s, 3H, Me-19); 1.02 (s, 3H, Me-29); 0.97 (d, 3H, Me-21, $J = 6.7$); 0.91 (s, 3H, Me-28); 0.82 (s, 3H, Me-18).

1.39. Isomasticadienolato de etilo (11)

A una disolución metanólica (30 mL) de **10** (142.2 mg, 0.295 mmol) se adicionó lentamente una disolución acuosa de NaBH_4 (108 mg en 1 mL). La mezcla se mantuvo en temperatura ambiente, en agitación durante 5 h 30 min. Posteriormente se agregó agua (20 mL), y el producto de reacción se extrajo con AcOEt (3 x 10 mL); la fase orgánica se lavó con una disolución de NaHCO_3 al 10 %, se secó con Na_2SO_4 anhidro y el disolvente se eliminó. El producto se purificó por cc con un sistema hexano/AcOEt 95:5. El compuesto **11** también se intentó obtener a partir de la reacción de esterificación de **3** con EtOH en medio ácido. Se obtuvo un sólido blanco (36 mg, rendimiento 67 %). Pf 75-80 °C. **IR** (CHCl_3 , cm^{-1}) 3612.8 (d); 2952.1 (f); 2873.7 (m); 1705.6 (m); 1649.0 (d); 1456.1 (m); 1373.1 (m); 1024.5 (m). **EMIE** m/z (% ar) 484 (9) M^+ , 467 (4) $[\text{M}-\text{OH}]^+$, 437 (10) $[\text{M}-47]^+$, 357 (28) $[\text{M}-127]^+$, 189 (81), 89 (100). **RMN ^1H** (CDCl_3 , 300 MHz) 5.87 (td, 1H, H-24, $J = 1.4, 7.5$); 4.20 (c, 2H, H-31, $J = 7.1$); 3.20 (dd,

1H, H-3, $J = 5.4, 10.9$); 2.48 (c, 1H, H-20, $J = 7.0$); 1.86 (d, 3H, Me-27, $J = 1.4$); 1.28 (t, 3H, Me-32, $J = 7.1$); 1.06 (s, 3H, Me-18); 0.97 (s, 3H, Me-30); 0.96 (d, 3H, Me-21, $J = 6.0$); 0.83 (s, 3H, Me-28); 0.80 (s, 3H, Me-29); 0.76 (s, 3H, Me-19). **RMN ^{13}C** (CDCl_3 , 75 MHz) 168.2 (C-26); 143.2 (C-24); 139.4 (C-8); 134.1 (C-9); 126.8 (C-25); 78.9 (C-3); 60.0 (C-31); 56.4 (C-14); 55.8 (C-5); 51.6 (C-17); 41.3 (C-13); 39.0 (C-1); 38.9 (C-4); 37.4 (C-10); 35.2 (C-22); 35.2 (C-15); 31.7 (C-20); 30.7 (C-7); 29.1 (C-11); 28.1 (C-23); 28.1 (C-30); 27.4 (C-2); 23.1 (C-18); 23.0 (C-12); 21.9 (C-6); 20.7 (C-27); 20.0 (C-21); 18.2 (C-16); 16.7 (C-29); 16.4 (C-28); 15.5 (C-19); 14.3 (C-32).

1.3.10. 3-oxo-7R-8R-epoxi-tirucal-24Z-en-26-ato de metilo (12)

Se disolvieron 52.4 mg de **6** (0.112 mmol), 45.3 mg del ácido *m*-cloroperoxibenzoico (*m*-CPBA, Aldrich) en 20 mL de CH_2Cl_2 , a continuación se adicionó una disolución acuosa de NaHCO_3 al 10 % p/v (20 mL). La mezcla heterogénea se agitó durante 3 h, a temperatura ambiente. Después de su separación, la fase orgánica se lavó con una disolución acuosa de NaHCO_3 , y posteriormente con agua destilada; se secó con Na_2SO_4 anhidro. El disolvente se evaporó a presión reducida, y el residuo se purificó por α mediante una fase fija de sílice neutra, y mezclas de hexano/ AcOEt de polaridad ascendente. Se obtuvo un sólido blanco (25.7 mg, rendimiento 47 %). Pf 106-112 °C. Los datos de RMN en C_6D_6 y CDCl_3 correspondieron al mismo compuesto. **IR** (CHCl_3 , cm^{-1}) 2970.1 (m); 2881.9 (m); 1701.7 (f); 1642.4 (d); 1452.6 (m); 1147.4 (m). **EMIE** m/z (% ar) 484 (100) M^+ , 469 (55) $[\text{M}-\text{Me}]^+$, 466 (18) $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 451 (16) $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{Me}]^+$, 427 (11) $[\text{M}-\text{COOMe}]^+$, 355 (8) $[\text{M}-\text{C}_{24}\text{H}_{35}\text{O}_2]^+$, 329 (16) $[\text{M}-\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{O}_2]^+$, 303 (19) $[\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{O}_2]^+$, 287 (7) $[\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{O}]^+$, 95 (40) $[\text{C}_2\text{H}_7\text{O}_4]^+$. **RMN ^1H** (C_6D_6 , 300 MHz) 5.82 (td, 1H, H-24, $J = 1.4, 7.5$); 3.42 (s, 3H, Me-31); 2.64 (s, 1H, H-7); 2.26 (td, 1H, Hb-2, $J = 5.2, 14.5$); 2.08 (dt, 1H, Ha-2, $J = 3.9, 14.1$); 1.91 (d, 3H, Me-27, $J = 1.3$); 1.12 (s, 3H, Me-30); 1.04 (s, 3H, Me-19); 0.98 (d, 3H, Me-21, $J = 5.9$); 0.88 (s, 3H, Me-29); 0.84 (s, 3H, Me-28); 0.68 (s, 3H, Me-18). **RMN ^{13}C** (C_6D_6 , 75 MHz) 213.5 (C-3); 167.8 (C-26); 144.3 (C-24); 128.3 (C-25); 62.9 (C-8); 54.6 (C-7); 53.3 (C-5); 50.8 (C-31); 49.5 (C-14); 48.7 (C-17); 46.8 (C-4); 46.6 (C-9); 45.2 (C-13); 38.0 (C-1); 36.0 (C-20); 35.9 (C-22); 35.9 (C-10); 34.5 (C-2); 33.2 (C-15); 28.0 (C-16); 27.6 (C-12); 26.9 (C-23); 25.2 (C-29); 23.8 (C-6); 23.0 (C-28); 22.8 (C-30); 20.9 (C-27); 20.7 (C-18); 18.4 (C-21); 18.2 (C-11); 14.3 (C-19). **RMN ^1H** (CDCl_3 , 300 MHz) 5.92 (td, 1H, H-24, $J = 1.4, 7.4$); 3.73 (s, 3H, Me-31); 2.93 (s, 1H, H-7); 2.61 (td, 1H, Hb-2, $J = 5.3, 14.7$); 2.20 (dt, 1H, Ha-2, $J = 3.6, 14.7$); 1.89 (d, 3H, Me-27, $J = 1.3$); 1.11 (s, 3H, Me-30); 1.07 (s, 3H, Me-19); 1.05 (s, 3H, Me-29); 0.93 (s, 3H, Me-28); 0.89 (d, 3H, Me-21, $J = 6.0$); 0.80 (s, 3H, Me-18). **RMN ^{13}C** (CDCl_3 , 75

MHz) 216.2 (C-3); 168.5 (C-26); 144.0 (C-24); 126.5 (C-25); 63.6 (C-8); 54.9 (C-7); 52.9 (C-5); 51.1 (C-31); 49.9 (C-17); 49.1 (C-14); 46.9 (C-4); 46.4 (C-9); 44.9 (C-13); 38.1 (C-1); 35.5 (C-22); 36.3 (C-20); 34.8 (C-2); 34.6 (C-10); 34.2 (C-15); 30.6 (C-6); 28.2 (C-16); 27.6 (C-12); 26.9 (C-28); 26.5 (C-23); 24.8 (C-29); 23.6 (C-11); 22.9 (C-29); 20.7 (C-27); 20.4 (C-28); 18.0 (C-21); 15.8 (C-18); 14.6 (C-19).

1.3.11. Ácido 3-oxo-7R-8R-epoxi-tirucal-24Z-en-26-ico (13)

A una disolución de **1** (64.8 mg en 20 mL de AcOEt, 0.143 mmol) se agregó una disolución acuosa de NaHCO₃ (20 mL). A continuación se adicionaron lentamente, 2 mL del ácido peroxiacético (CH₃CO₃H al 32 % p/v en ácido acético diluido, Aldrich). La mezcla se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente, durante 2 h. La mezcla se extrajo con AcOEt, y la fase orgánica se lavó con NaHCO₃ (3 x 10 mL) y agua destilada. Posteriormente se secó con Na₂SO₄ anhidro y se evaporó. El residuo se purificó por α de manera similar conforme con **12**, y se obtuvo un producto blanco no soluble en AcOEt, y muy soluble en MeOH (13.5 mg, rendimiento 20 %). Pf 100-110 °C. **EMIE** m/z (% ar) 470 M⁺. **RMN ¹H** (CD₃OD, 300 MHz) 5.13 (td, 1H, H-24, *J* = 1.5, 7.2); 2.97 (s, 1H, H-7); 2.70 (td, 1H, Hb-2, *J* = 5.3, 14.7); 2.12 (dt, 1H, Ha-2, *J* = 3.5, 14.3); 1.84 (d, 3H, Me-27, *J* = 1.5); 1.12 (s, 3H, Me-28); 1.11 (s, 3H, Me-19); 1.08 (s, 3H, Me-30); 1.01 (s, 3H, Me-29); 0.91 (s, 3H, Me-18); 0.89 (d, 3H, Me-21, *J* = 6.4). **RMN ¹³C** (CD₃OD, 75 MHz) 218.7(C-3); 179.7 (C-26); 137.1 (C-25); 129.0 (C-24); 65.3 (C-8); 56.6 (C-7); 54.3(C-5); 50.4 (C-14); 50.2 (C-17); 48.2 (C-9); 48.1 (C-13); 46.1 (C-4); 39.5 (C-1); 37.2 (C-22); 36.9 (C-20); 35.9 (C-10); 35.5 (C-2); 34.2 (C-15); 28.7(C-16); 28.3 (C-12); 27.4 (C-23); 25.3 (C-29); 24.6 (C-6); 23.3 (C-28); 23.2 (C-30); 21.5 (C-27); 21.0 (C-18); 19.2 (C-11); 18.8 (C-21); 14.8 (C-19).

1.3.12. 3S-hidroxi-7R-8R-epoxi-tirucal-24Z-en-26-ato de metilo (14)

A una disolución de **7** (118.4 mg en 20 mL de CH₂Cl₂, 0.252 mmol) se agregaron 20 mL de NaHCO₃ pH 8. A continuación se adicionaron lentamente 2 mL de CH₃CO₃H. El curso de la reacción se siguió por *ccf* y, al cabo de 1 h 30 min, se consumió el reactivo, y observó la aparición de un producto. La mezcla se lavó con una disolución acuosa de NaHCO₃ (3 x 10 mL), se secó con Na₂SO₄ anhidro y se evaporó. El producto se purificó por cromatografía preparativa, con un sistema de elución de hexano/AcOEt 2:1. Se obtuvo un sólido blanco (42 mg, rendimiento 34 %). Pf 68-78 °C. **UV** ($\lambda_{\text{máx}}$ nm, log ϵ) 220.0, 3.84. **IR** (CHCl₃, cm⁻¹) 3611.4 (d); 2962.1 (f); 2930.0 (f); 2882.0 (m); 1705.8 (f); 1640.9 (d); 1453.7 (m); 1381.0

(m); 1147.9 (m). **EMIE** m/z (% ar) 486 (100) M^+ , 471 (50) $[M-Me]^+$, 453 (20) $[M-Me-H_2O]^+$, 435 (10) $[M-Me-2H_2O]^+$, 303 (14), 149 (15), 121 (24), 95 (21) $[C_2H_7O_4]^+$. **RMN 1H** (C_6D_6 , 300 MHz) 5.81 (td, 1H, H-24, $J = 1.4, 7.5$); 3.41 (s, 3H, Me-31); 3.17 (s, 1H, H-3); 2.71 (s, 1H, H-7); 1.90 (d, 3H, Me-27, $J = 1.3$); 1.07 (s, 3H, Me-30); 0.96 (d, 3H, Me-21, $J = 6.3$); 0.92 (s, 3H, Me-28); 0.84 (s, 3H, Me-29); 0.74 (s, 3H, Me-18); 0.72 (s, 3H, Me-19). **RMN ^{13}C** (C_6D_6 , 75 MHz) 167.9 (C-26); 144.4 (C-24); 127.0 (C-25); 75.5 (C-3); 63.3 (C-8); 54.5 (C-7); 53.3 (C-5); 50.8 (C-31); 49.6 (C-14); 49.4 (C-17); 45.2 (C-13); 39.2 (C-9); 37.0 (C-4); 36.0 (C-20); 36.0 (C-1); 34.6 (C-10); 33.3 (C-22); 32.1 (C-15); 28.1 (C-29); 28.0 (C-16); 27.7 (C-12); 26.9 (C-2); 25.5 (C-23); 23.1 (C-6); 23.1 (C-18); 22.9 (C-28); 20.9 (C-27); 20.8 (C-30); 18.4 (C-21); 18.0 (C-11); 14.7 (C-19).

El ión molecular en m/z 486, observado en el espectro de masas, es consistente para la estructura de **14**; sin embargo, la adquisición de datos de resonancia en $CDCl_3$ mostró señales para un compuesto diferente, el cual se propuso como 3S-hidroxi-tirucala-7Z, 9Z, 24Z-trien-26-ato de metilo (**14a**): 468.71 M^+ . **RMN 1H** ($CDCl_3$, 300 MHz) 5.93 (td, 1H, H-24, $J = 1.4, 7.5$); 5.34 (s, 1H, H-7); 5.19 (s, 1H, H-11); 3.73 (s, 3H, Me-31); 3.24 (dd, 1H, H-3, $J = 4.6, 10.7$); 1.89 (d, 3H, Me-27, $J = 1.3$); 0.98 (s, 3H, Me-30); 0.92 (s, 3H, Me-28); 0.92 (d, 3H, Me-21, $J = 6.3$); 0.89 (s, 3H, Me-29); 0.83 (s, 3H, Me-18); 0.63 (s, 3H, Me-19). **RMN ^{13}C** ($CDCl_3$, 75 MHz) 168.6 (C-26); 145.0 (C-8); 144.1 (C-24); 141.3 (C-9); 126.4 (C-25); 118.4 (C-7); 115.3 (C-11); 79.0 (C-3); 51.2 (C-31); 50.8 (C-17); 49.5 (C-14); 48.2 (C-5); 44.0 (C-13); 39.0 (C-4); 38.3 (C-12); 36.1 (C-20); 35.8 (C-22); 35.6 (C-15); 31.2 (C-1); 27.9 (C-16); 27.7 (C-2); 27.6 (C-30); 27.6 (C-10); 26.6 (C-23); 23.6 (C-6); 23.1 (C-18); 20.7 (C-27); 20.7 (C-28); 18.3 (C-21); 16.1 (C-19); 15.3 (C-29).

1.3.13. Lactona del ácido 4-hidroxi-7R-8R-epoxi-3, 4-seco-tirucal-24Z-en-26-ico (**15**)

A una disolución de **1** (100 mg, 0.220 mmol) en 3 mL de CH_2Cl_2 se adicionó lentamente una disolución de *m*-CPBA (100 mg en 15 mL de CH_2Cl_2). La mezcla de reacción se agitó durante 3 h a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó con una disolución acuosa de $NaHCO_3$ (3 x 10 mL), se secó con Na_2SO_4 anhidro, y el disolvente se evaporó. El residuo resultante se purificó por *cc*, y se obtuvo un sólido blanco cristalino (10 mg, rendimiento 9 %). Pf 116-122 °C. **IR** (KBr, cm^{-1}) 3488.1 (m); 3426.1 (m); 2964.5 (f); 2927.9 (f); 1692.5 (f); 1648.4 (m); 1203.4 (m); 1113.9 (m). **EMIE** m/z (% ar) 486 (24) M^+ , 468 (100) $[M-H_2O]^+$, 452 (71) $[M-34]^+$, 428 (34) $[M-58]^+$, 395 (79) $[M-91]^+$, 377 (35) $[M-109]^+$, 289 (56)

[M-197]⁺, 159 (51) [M-327]⁺, 145 (60) [M-341]⁺, 122 (88) [M-364]⁺. **RMN ¹H** (CDCl₃, 200 MHz) 5.99 (td, 1H, H-24, *J* = 1.4, 7.5); 2.82 (s, 1H, H-7); 2.55 (m, 2H, H-2); 1.84 (d, 3H, Me-27, *J* = 1.2); 1.45 (s, 3H, Me-18); 1.34 (s, 3H, Me-29); 0.94 (s, 3H, Me-30); 0.86 (s, 3H, Me-19); 0.83 (s, 3H, Me-28); 0.80 (d, 3H, Me-21, *J* = 6.0). **RMN ¹³C** (CDCl₃, 50 MHz) 176.0 (C-3); 172.0 (C-26); 147.0 (C-24); 126.0 (C-25); 86.0 (C-4); 63.9 (C-8); 54.7 (C-7); 52.9 (C-9); 49.3 (C-14); 46.5 (C-17); 46.3 (C-13); 44.6 (C-5); 38.1 (C-10); 35.5 (C-2); 35.5 (C-20); 35.5 (C-22); 33.6 (C-15); 32.7 (C-12); 31.4 (C-6); 27.6 (C-16); 27.3 (C-1); 26.8 (C-29); 26.3 (C-23); 24.3 (C-18); 22.8 (C-30); 20.6 (C-27); 20.3 (C-28); 18.1 (C-21); 18.1 (C-11); 15.5 (C-19).

1.3.14. Lactona del 4-hidroxi-7R-8R-epoxi-3,4-seco-tirucal-24Z-en-26-ato de metilo (16)

A una disolución de **6** (70.7 mg en 30 mL de CH₂Cl₂ anhidro, 0.151 mmol) se agregaron 100 mg de Na₂CO₃ previamente tratado a 260 °C. La mezcla se mantuvo en una atmósfera de nitrógeno, con agitación constante a temperatura ambiente. A continuación se adicionaron lentamente, 2 mL de CH₃CO₃H. El curso de la reacción se siguió por *ccfy*, al cabo de 2 h 30 min, se observó la desaparición total del compuesto inicial. La mezcla de reacción resultante se lavó con una disolución acuosa de NaHCO₃ (3 x 10 mL), se secó con Na₂SO₄ anhidro y se evaporó. El residuo se purificó por *cc*, empleando como fase fija sílice perfectamente seca y previamente neutralizada con disoluciones de acetato de sodio (AcONa) y NaHCO₃. Se usó un sistema de elución de hexano/AcOEt. Finalmente se obtuvo un sólido blanco cristalino (27 mg, rendimiento 36 %). Pf 144-150 °C. **UV** (λ_{máx} nm, log ε) 220.0, 4.20. **IR** (KBr, cm⁻¹) 2978.5 (m); 2926.6 (m); 2870.9 (m); 1717.0 (f); 1650.4 (d); 1455.3 (m); 1219.7 (m); 1195.8 (m). **EMIE** m/z (% ar) 500 (16) M⁺, 482 (18) [M-H₂O]⁺, 467 (17) [M-H₂O-Me]⁺, 442 (24) [M-COOMe]⁺, 427 (27) [M-COOMe-Me]⁺, 409 (32) [M-COOMe-Me-H₂O]⁺, 303 (56) [C₂₀H₃₁O₂]⁺, 287 (28) [C₂₀H₃₁O]⁺, 271 (10) [C₂₀H₃₁]⁺, 215 (16) [C₁₁H₁₉O₄]⁺, 161 (30) [C₇H₁₃O₄]⁺, 135 (35) [C₅H₁₁O₄]⁺, 123 (80) [C₄H₁₁O₄]⁺, 122 (100) [C₄H₁₀O₄]⁺, 107 (47) [C₃H₇O₄]⁺, 95 (82) [C₂H₇O₄]⁺. **RMN ¹H** (C₆D₆, 300 MHz) 5.82 (td, 1H, H-24, *J* = 1.4, 7.3); 3.43 (s, 3H, Me-31); 2.54 (s, 1H, H-7); 2.40 (cd, 1H, Hb-2, *J* = 1.8, 8.4); 2.26 (cd, 1H, Ha-2, *J* = 1.8, 11.1); 1.91 (d, 3H, Me-27, *J* = 1.2); 1.19 (s, 3H, Me-30); 1.08 (s, 3H, Me-19); 1.02 (s, 3H, Me-29); 0.98 (d, 3H, Me-21, *J* = 5.7); 0.84 (s, 3H, Me-28); 0.55 (s, 3H, Me-18). **RMN ¹³C** (C₆D₆, 75 MHz) 173.5 (C-3); 167.8 (C-26); 144.2 (C-24); 127.1 (C-25); 84.6 (C-4); 63.2 (C-8); 54.3 (C-31); 53.3 (C-7); 50.8 (C-9); 49.7 (C-14); 46.9 (C-17); 46.5 (C-13); 44.9 (C-5); 38.1 (C-10); 36.0 (C-1);

35.9 (C-20); 33.7 (C-22); 33.1 (C-15); 32.8 (C-2); 31.9 (C-6); 28.0 (C-16); 27.6 (C-12); 26.8 (C-29); 26.3 (C-23); 24.0 (C-28); 22.9 (C-30); 20.9 (C-27); 20.6 (C-18); 18.4 (C-21); 18.2 (C-11); 15.2 (C-19).

El ión molecular en m/z 500, es consistente para la estructura del derivado epoxidado **16**. Sin embargo, la adquisición de datos de resonancia en CDCl_3 mostró señales para un compuesto diferente, el cual se propuso como lactona de 4, 7*R*-dihidroxi-3, 4-seco-tirucala-8*Z*, 24*Z*-dien-26-ato de metilo (**16a**): 500.71 M^+ . IR (CHCl_3 , cm^{-1}) 2952.2 (m); 2926.6 (m); 1707.0 (f); 1638.5 (d); 1451.0 (m); 1113.5 (m). RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) 5.93 (td, 1H, H-24, $J = 1.5, 7.5$); 4.13 (s, 1H, H-7); 3.74 (s, 3H, Me-31); 2.90 (1H, -OH); 2.73 (td, 2H, H-2, $J = 6.8, 13.3$); 2.55 (m, 1H, H-5); 1.89 (d, 3H, Me-27, $J = 1.2$); 1.55 (d, 3H, Me-30, $J = 8.0$); 1.41 (d, 3H, Me-28, $J = 8.0$); 1.19 (s, 3H, Me-29); 0.94 (d, 3H, Me-21, $J = 6.0$); 0.89 (t, 3H, Me-18, $J = 3.0$); 0.75 (s, 3H, Me-19). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) 174.1 (C-3); 168.5 (C-26); 144.0 (C-24); 139.4 (C-8); 134.8 (C-9); 126.5 (C-25); 85.5 (C-4); 63.9 (C-7); 51.2 (C-31); 50.1 (C-17); 49.8 (C-14); 43.9 (C-13); 41.8 (C-5); 39.7 (C-10); 36.3 (C-20); 36.0 (C-2); 35.7 (C-22); 33.3 (C-15); 32.5 (C-12); 30.7 (C-6); 29.8 (C-1); 29.5 (C-30); 28.1 (C-16); 26.8 (C-28); 26.5 (C-23); 24.5 (C-18); 21.0 (C-11); 20.7 (C-27); 20.4 (C-29); 18.5 (C-21); 16.2 (C-19).

1.3.15. Ácido 3*b*-acetoxi-tirucala-7*E*, 24*E*-dien-26-ico (17)

Se disolvieron 0.5 mL de piridina (99 % de grado reactivo, Aldrich), 46.6 mg (0.102 mmol) de **3**, posteriormente se añadió 1 mL de anhídrido acético (Ac_2O , Bæker). La mezcla se mantuvo a una temperatura de 40 °C durante 24 h. Posteriormente, se agregó agua destilada y se extrajo con AcOEt. La fase orgánica se lavó consecutivamente con disoluciones acuosas de HCl al 10 % v/v, y NaHCO_3 al 10 %; se secó con Na_2SO_4 anhidro, y el disolvente se eliminó. El residuo se purificó por cc en un sistema de hexano/AcOEt 9:1, y se obtuvo un sólido blanco (43.8 mg, rendimiento 86 %). Pf 170-172 °C. IR (CHCl_3 , cm^{-1}) 3527.2 (d); 2953.5 (m); 2886.9 (m); 1720.1 (m); 1685.0 (m); 1372.6 (m); 1258.6 (m); 1029.1 (m). EMIE m/z (% ar) 498 (13) M^+ , 483 (30) $[\text{M}-\text{Me}]^+$, 423 (100) $[\text{M}-\text{Me}-\text{Ac}]^+$. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) 6.90 (td, 1H, H-24, $J = 1.4, 7.3$); 5.25 (d, 1H, H-7, $J = 3.6$); 4.52 (dd, 1H, H-3, $J = 4.9, 10.7$); 2.06 (s, 3H, Me-32); 1.84 (d, 3H, Me-27, $J = 1.2$); 0.97 (s, 3H, Me-30); 0.93 (s, 3H, Me-29); 0.91 (d, 3H, Me-21, $J = 6.0$); 0.85 (s, 3H, Me-28); 0.81 (s, 3H, Me-18); 0.77 (s, 3H, Me-19). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) 173.0 (C-26); 171.0 (C-31); 145.8 (C-8); 145.8 (C-24); 126.6 (C-25); 117.7 (C-7); 81.1 (C-3); 52.8 (C-5); 51.1 (C-14); 50.7 (C-17); 48.8 (C-9); 43.5 (C-13); 37.8 (C-4); 36.8 (C-1); 36.0 (C-20); 34.8 (C-

10); 34.6 (C-22); 34.0 (C-12); 33.7 (C-15); 28.2 (C-16); 27.5 (C-28); 27.2 (C-30); 26.0 (C-6); 24.2 (C-2); 23.7 (C-23); 21.9 (C-18); 21.3 (C-32); 18.2 (C-21); 18.1 (C-11); 15.8 (C-29); 13.1 (C-19); 11.9 (C-27).

1.3.16. 3b-acetoxi-tirucala-7E, 24Z -dien-26-ato de metilo (18)

Una mezcla de 55 mg (0.117 mmol) de **7**, 0.5 mL de piridina, y 1 mL de Ac_2O se colocó a una temperatura de 40 °C durante 24 h. La mezcla de reacción se trató de forma similar a la obtención de **17**. El producto se recristalizó con hexano/AcOEt y se obtuvo un polvo blanco (48 mg, rendimiento 80 %). Pf 56-64 °C. IR (KBr, cm^{-1}) 3394.2 (m); 2954.0 (f); 2878.1 (m); 1730.8 (f); 1645.6 (m); 1369.5 (m); 1249.7 (f); 1215.8 (m); 1027.8 (m). EMIE m/z (% ar) 512 M^+ . RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) 5.93 (td, 1H, H-24, $J = 1.5, 7.2$); 5.25 (d, 1H, H-7 $J = 3.1$); 4.52 (dd, 1H, H-3, $J = 5.0, 10.7$); 3.73 (s, 3H, Me-31); 2.05 (s, 3H, Me-33); 1.89 (d, 3H, Me-27, $J = 1.2$); 0.97 (s, 3H, Me-29); 0.97 (s, 3H, Me-30); 0.89 (d, 3H, Me-21, $J = 6.1$); 0.86 (s, 3H, Me-28); 0.81 (s, 3H, Me-18); 0.75 (s, 3H, Me-19). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) 171.0 (C-32); 168.6 (C-26); 145.9 (C-8); 144.1 (C-24); 126.4 (C-25); 117.6 (C-7); 81.2 (C-3); 52.8 (C-5); 51.2 (C-31); 51.1 (C-14); 50.7 (C-17); 48.8 (C-9); 43.5 (C-13); 37.8 (C-4); 36.8 (C-1); 36.0 (C-20); 35.7 (C-22); 34.8 (C-10); 34.0 (C-12); 33.7 (C-15); 28.2 (C-16); 27.6 (C-28); 27.2 (C-30); 26.7 (C-6); 24.2 (C-2); 23.7 (C-23); 21.9 (C-18); 21.3 (C-33); 20.7 (C-27); 18.2 (C-21); 18.1 (C-11); 15.8 (C-29); 13.1 (C-19).

1.3.17. Ácido 3-hidroximino-masticadiemico (19)

Una mezcla de 18.2 mg de clorhidrato de hidroxilamina ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, Aldrich) y 22.4 mg de AcONa en 30 mL de MeOH se adicionó lentamente a un matraz con 50.6 mg de **1** (0.111 mmol). La mezcla se refluxó durante 2 h. Al término, se concentró en un rotavapor y se extrajo con AcOEt. La fase orgánica se lavó con agua, se secó con Na_2SO_4 anhidro y se evaporó el disolvente. Finalmente se obtuvieron cristales blancos (29 mg, rendimiento 55 %). Pf 85-90 °C. IR (KBr, cm^{-1}) 3270.3 (d); 2954.8 (m); 1687.3 (m); 1642.6 (d); 1458.4 (d); 1380.4 (d); 1261.1 (d). EMIE m/z (% ar) 469 (27) M^+ , 454 (100) $[\text{M}-\text{Me}]^+$, 439 (30) $[\text{M}-\text{NO}]^+$, 438 (29) $[\text{M}-\text{NOH}]^+$, 421 (7) $[\text{M}-\text{NO}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 95 (12) $[\text{C}_3\text{H}_{11}\text{O}_3]^+$.

El ión molecular en m/z 469, es consistente para la estructura del derivado **19**. Sin embargo, los datos de resonancia en CDCl_3 evidenciaron la presencia de un grupo 3-nitroso. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) 6.02 (td, 1H, H-24, $J = 1.2, 7.1$); 5.27 (d, 1H, H-7, $J = 2.7$); 3.34 (dt, 1H, H-3, $J = 3.4, 13.8$); 1.92 (d, 3H,

Me-27, $J = 1.6$); 1.13 (s, 3H, Me-29); 1.12 (s, 3H, Me-18); 0.99 (s, 3H, Me-28); 0.91 (s, 3H, Me-19); 0.86 (d, 3H; Me-21, $J = 6.6$); 0.78 (s, 3H, Me-30).

1.3.18. 3-hidroxiimino-masticadienonato de metilo (20)

Se preparó una mezcla de 63 mg de **6** (0.135 mmol) en piridina previamente destilada (1.6 mL). Posteriormente se adicionó una disolución de 16.5 mg de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ en piridina (2 mL). La mezcla se reflujo durante 1 h. Después se agregó agua y la fase orgánica se extrajo con AcOEt. A continuación se lavó con una disolución acuosa de NaHCO_3 0.5 M, se secó con Na_2SO_4 anhidro y se evaporó. El residuo se purificó por cromatografía preparativa con un gradiente de hexano/AcOEt 3:1. Se obtuvo un polvo blanco (46 mg, rendimiento 71 %). Pf 126-128 °C. IR (KBr, cm^{-1}) 3319.4 (m); 2949.3-2929.4 (f); 1719.2 (f); 1642.8 (m); 1455.2 (f); 1382.2 (f); 1218.4 (f). EMIE m/z (% ar) 483 (31) M^+ , 469 (33) $[\text{M}-14]^+$, 468 (100) $[\text{M}-\text{Me}]^+$, 453 (18) $[\text{M}-\text{NO}]^+$, 452 (24) $[\text{M}-\text{NOH}]^+$, 95 (16) $[\text{C}_3\text{H}_{11}\text{O}_3]^+$.

El ión molecular en m/z 483, es consistente con la estructura del derivado **20**. Sin embargo, la adquisición de datos de resonancia en CDCl_3 mostró señales para un grupo 3-nitroso. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) 5.93 (td, 1H, H-24, $J = 1.3, 7.5$); 5.27 (m, 1H, H-7); 3.73 (s, 3H, Me-31); 3.30 (dt, 1H, H-3, $J = 3.5, 14.2$); 1.89 (d, 3H, Me-27, $J = 1.2$); 1.13 (s, 3H, Me-29); 1.13 (s, 3H, Me-18); 0.99 (s, 3H, Me-28); 0.91 (s, 3H, Me-19); 0.89 (d, 3H; Me-21, $J = 6.3$); 0.79 (s, 3H, Me-30). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) 168.6 (C-26); 146.0 (C-8); 144.0 (C-24); 126.5 (C-25); 117.6 (C-7); 78.0 (C-3); 52.9 (C-5); 52.4 (C-17); 51.2 (C-14); 51.2 (C-31); 48.6 (C-9); 43.5 (C-13); 40.8 (C-4); 37.9 (C-1); 36.0 (C-20); 35.7 (C-22); 35.2 (C-10); 34.0 (C-15); 33.7 (C-12); 28.2 (C-16); 27.4 (C-28); 26.7 (C-23); 25.8 (C-29); 24.3 (C-6); 22.5 (C-18); 21.9 (C-30); 20.7 (C-27); 18.2 (C-11); 18.2 (C-21); 17.7 (C-2); 12.8 (C-19).

1.3.19. Mezcla isomasticadienonato de metilo / 3-oxodamara-13-17E, 24Z-dien-26-ato de metilo

Se disolvieron 102 mg (0.218 mmol) de **6** en 60 mL de EtOH anhidro, y se adicionó lentamente 0.7 mL de H_2SO_4 concentrado y 3 mL de $\text{CH}(\text{OCH}_3)_3$. La mezcla se reflujo durante 3 h. Posteriormente, se diluyó con agua y se extrajo con AcOEt. La fase orgánica se lavó sucesivamente con NaHCO_3 al 10 % y agua destilada (3 x 10 mL), se secó con Na_2SO_4 anhidro y se eliminó el disolvente. El residuo se purificó por *cc*, y se obtuvo un producto amarillo de consistencia aceitosa cuyo comportamiento en *ccf*

era muy similar a **6**. Los datos espectroscópicos evidenciaron una mezcla de dos compuestos, los cuales se identificaron como isomasticadienonato de metilo y 3-oxodamara-13-17E, 24Z-dien-26-ato de metilo.

Isomasticadienoato de metilo. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) 5.92 (td, 1H, H-24, *J* = 1.4, 7.5); 3.74 (s, 3H, Me-31); 2.50 (m, 1H, H-20); 1.89 (d, 3H, Me-27, *J* = 1.6); 1.66 (m, 1H, H-17); 1.45 (m, 1H, H-5); 1.09 (d, 3H, Me-30, *J* = 1.6); 0.93 (s, 3H, Me-19); 0.89 (s, 3H, Me-29); 0.84 (d, 3H, Me-28); 0.75 (s, 3H, Me-18). RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) 218.3 (C-3); 168.5 (C-26); 143.8 (C-24); 139.1 (C-8); 134.4 (C-9); 126.4 (C-25); 55.1 (C-5); 51.4 (C-17); 51.1 (C-31); 47.2 (C-4); 47.2 (C-14); 41.0 (C-13); 39.8 (C-1); 37.1 (C-10); 35.8 (C-22); 35.1 (C-15); 34.0 (C-2); 31.7 (C-20); 30.6 (C-12); 29.7 (C-16); 28.0 (C-23); 27.0 (C-30); 24.1 (C-29); 23.0 (C-7); 21.3 (C-11); 20.7 (C-27); 19.9 (C-21); 19.6 (C-6); 16.5 (C-19); 16.3 (C-28); 15.5 (C-18). **3-oxodamara-13-17, 24Z-dien-26-ato de metilo.** RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) 5.92 (td, 1H, H-24, *J* = 1.4, 7.5); 3.72 (s, 3H, Me-31); 1.89 (d, 3H, Me-27, *J* = 1.6); 1.53 (m, 1H, H-5); 1.53 (m, 1H, H-9); 1.45 (m, 1H, H-20); 1.05 (d, 3H, Me-30, *J* = 1.6); 1.04 (s, 3H, Me-28); 0.93 (s, 3H, Me-18). RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) 218.2 (C-3); 168.4 (C-26); 144.1 (C-24); 134.6 (C-17); 132.6 (C-13); 126.4 (C-25); 56.3 (C-14); 51.1 (C-31); 50.8 (C-5); 50.0 (C-9); 47.2 (C-4); 44.1 (C-8); 37.0 (C-10); 36.3 (C-20); 35.5 (C-1); 34.5 (C-22); 34.5 (C-2); 30.6 (C-7); 28.9 (C-15); 28.0 (C-16); 27.4 (C-12); 26.6 (C-30); 26.6 (C-11); 22.8 (C-29); 22.4 (C-23); 21.0 (C-28); 21.0 (C-19); 20.7 (C-27); 20.2 (C-6); 19.7 (C-21); 18.5 (C-18).

1.4. Obtención de los derivados del ácido 3a-hidroximasticadienoico

A partir del ácido **2** se originaron los compuestos **21-28** (anexo A). A continuación se describen los métodos de obtención, y los datos fisicoquímicos y espectroscópicos de los derivados obtenidos.

1.4.1. Ácido 24-25S-dihidro-3-epimasticadienolico (**21**)

Una mezcla de 50 mg (0.110 mmol) de **2**, 50 mg de Pd/C al 5 % y 10 mL de AcOEt se mantuvo en un sistema de hidrogenación durante 96 h, a presión y temperatura ambiente, con agitación constante. La mezcla de reacción se trató de manera similar a la reacción de 1.3.2. El producto se purificó por *cc*, y se obtuvo un sólido blanco amorfo (37 mg, rendimiento 73 %). Pf 100-110 °C. IR (KBr, cm⁻¹) 3407.6 (m);

2945.4 (f); 2887.0 (m); 1707.0 (m); 1460.1 (m); 1380.4 (m); 1223.6 (m). **EMIE** m/z (% ar) 458 (26) M⁺, 443 (75) [M-Me]⁺, 425 (100) [M-Me-H₂O]⁺, 303 (10) [C₂₀H₃₁O₂]⁺, 175 (13) [C₈H₁₅O₄]⁺, 95 (13) [C₃H₁₁O₃]⁺. **RMN ¹H** (CDCl₃, 300 MHz) 5.25 (c, 1H, H-7, *J* = 3.3); 3.46 (t, 1H, H-3, *J* = 2.9); 2.47 (c, 1H, H-25, *J* = 7.0); 2.33 (m, 1H, Ha-2); 1.18 (dd, 3H, Me-27, *J* = 1.5, 7.2); 0.97 (s, 3H, Me-28); 0.94 (s, 3H, Me-30); 0.92 (s, 3H, Me-18); 0.86 (d, 3H, Me-21, *J* = 6.3); 0.81 (s, 3H, Me-29); 0.77 (s, 3H, Me-19). **RMN ¹³C** (CDCl₃, 75 MHz) 181.1 (C-26); 146.2 (C-8); 117.9 (C-7); 76.4 (C-3); 53.0 (C-17); 51.2 (C-14); 48.7 (C-9); 44.6 (C-5); 43.5 (C-13); 39.1 (C-25); 37.4 (C-4); 36.0 (C-20); 35.9 (C-22); 34.8 (C-10); 34.0 (C-15); 34.0 (C-24); 33.9 (C-12); 31.3 (C-1); 28.2 (C-16); 27.8 (C-30); 27.3 (C-28); 25.4 (C-2); 23.9 (C-6); 23.9 (C-23); 21.9 (C-29); 21.8 (C-18); 18.4 (C-21); 18.0 (C-11); 17.0 (C-27); 13.0 (C-19).

1.4.2. 3-epimasticadienolato de metilo (22)

A una disolución de **2** (55 mg, 0.120 mmol) en CH₂Cl₂ se agregó lentamente con agitación constante, una disolución etérea de diazometano. La mezcla de reacción se dejó reposar durante 24 h y se evaporó. A pesar de los intentos de cristalización del residuo, siempre se obtuvo un producto puro de consistencia aceitosa (50 mg, rendimiento 88 %). **IR** (CHCl₃, cm⁻¹) 3624.0 (d); 2952.3 (f); 2882.6 (m); 1708.6 (f); 1645.9 (d); 1456.4 (m); 1439.2 (m); 1370.1 (m); 1150.1 (m). **EMIE** m/z (% ar) 470 (9) M⁺, 455 (47) [M-Me]⁺, 437 (100) [M-Me-H₂O]⁺, 187 (46), 95 (33). **RMN ¹H** (CDCl₃, 300 MHz) 5.93 (td, 1H, H-24, *J* = 1.2, 7.5); 5.25 (c, 1H, H-7, *J* = 3.1); 3.73 (s, 3H, Me-31); 3.46 (t, 1H, H-3, *J* = 2.8); 1.89 (3H, d, Me-27, *J* = 1.2); 0.97 (s, 3H, Me-28); 0.94 (s, 3H, Me-29); 0.91 (s, 3H, Me-18); 0.89 (d, 3H, Me-21, *J* = 6.0); 0.82 (s, 3H, Me-30); 0.77 (s, 3H, Me-19). **RMN ¹³C** (CDCl₃, 75 MHz) 168.5 (C-26); 146.0 (C-8); 144.0 (C-24); 126.4 (C-25); 117.8 (C-7); 76.2 (C-3); 52.8 (C-17); 51.2 (C-14); 51.1 (C-31); 48.6 (C-9); 44.5 (C-5); 43.4 (C-13); 37.3 (C-4); 36.0 (C-20); 35.7 (C-22); 34.7 (C-10); 33.9 (C-15); 33.7 (C-12); 31.2 (C-1); 28.1 (C-16); 27.7 (C-29); 27.2 (C-28); 26.7 (C-23); 25.4 (C-6); 23.9 (C-11); 21.8 (C-30); 21.8 (C-18); 20.6 (C-27); 18.2 (C-21); 17.9 (C-2); 12.9 (C-19).

1.4.3. 24-25S-dihidro-3-epimasticadienolato de metilo (23)

A una disolución etérea de **21** (37.9 mg, 0.083 mmol, 20 mL) se agregó lentamente, con agitación constante, una disolución etérea de diazometano. La mezcla de reacción se mantuvo en reposo durante 24 h. Posteriormente, el disolvente se evaporó a presión reducida y se obtuvo un producto aceitoso (33

mg, rendimiento 84.5 %). **EMIE** m/z (% ar) 472 (1) M⁺, 455 (40) [M-OH]⁺, 437 (100) [M-35]⁺, 187 (38), 95 (27).

1.4.4. 3-epiisomasticadienolato de etilo (24)

A una disolución etanólica (EtOH anhidro, 60 mL) de **2** (122.8 mg, 0.269 mmol) se adicionó lentamente H₂SO₄ concentrado (3 mL), seguido de CH(OCH₃)₃ (4 mL). La mezcla se reflujo durante 8 h. Posteriormente, se agregó agua a la mezcla de reacción y se extrajo con AcOEt. La fase orgánica se lavó con NaHCO₃ al 10 %p/v (3 x 10 mL), se secó con Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se evaporó a presión reducida. El residuo se purificó por *cc*, de las fracciones 2-4 eluidas con hexano/AcOEt 95:5 se obtuvo un polvo blanco brillante muy soluble en CH₂Cl₂ (26.8 mg, rendimiento 21 %). Pf 111-114 °C. **IR** (CHCl₃, cm⁻¹) 3691.8 (d); 3608.7 (d); 2950.4 (f); 2875.4 (m); 1704.1 (f); 1601.9 (m); 1455.9 (m); 1373.1 (m); 1149.4 (m). **EMIE** m/z (% ar) 484 (20) M⁺, 469 (53) [M-Me]⁺, 451 (100) [M-Me-H₂O]⁺, 437 (30) [M-Et-H₂O]⁺, 241 (23) [C₁₈H₂₅]⁺, 189 (29) [C₁₀H₂₁O₃]⁺, 95 (30) [C₃H₁₁O₃]⁺. **RMN** ¹H (CDCl₃, 300 MHz) 5.90 (td, 1H, H-24, *J* = 1.4, 7.5); 4.20 (c, 2H, H-31, *J* = 7.0); 3.43 (t, 1H, H-3, *J* = 2.8); 1.89 (d, 3H, Me-27, *J* = 1.2); 1.31 (t, 3H, Me-32, *J* = 7.2); 0.97 (s, 3H, Me-29); 0.96 (s, 3H, Me-28); 0.93 (d, 3H, Me-21, *J* = 5.6); 0.87 (s, 3H, Me-18); 0.87 (s, 3H, Me-30); 0.77 (s, 3H, Me-19). **RMN** ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) 168.3 (C-26); 143.5 (C-24); 134.6 (C-8); 133.3 (C-9); 126.8 (C-25); 76.0 (C-3); 60.0 (C-31); 50.1 (C-5); 50.0 (C-14); 44.8 (C-17); 44.1 (C-13); 37.7 (C-4); 37.2 (C-10); 36.4 (C-20); 36.0 (C-1); 30.8 (C-7); 29.8 (C-11); 29.8 (C-22); 28.1 (C-23); 28.1 (C-29); 27.2 (C-2); 26.6 (C-15); 25.8 (C-12); 24.4 (C-30); 22.2 (C-18); 21.4 (C-6); 20.7 (C-27); 19.9 (C-28); 18.8 (C-16); 18.6 (C-21); 15.5 (C-19); 14.3 (C-32).

1.4.5. 24-25S-dihidro-3-epiisomasticadienolato de etilo (25)

A una disolución etanólica (EtOH anhidro, 50 mL) de **21** (54.5 mg, 0.119 mmol) se adicionó lentamente H₂SO₄ concentrado (2 mL), seguido de CH(OCH₃)₃ (6 mL). La mezcla se reflujo durante 3 h. Posteriormente, la mezcla de reacción se trató de manera similar a la reacción 1.4.4. El residuo resultante se purificó por *cc*, y de las fracciones 3-8 eluidas con hexano/AcOEt 95:5, se obtuvo un producto amarillo no cristizable (22 mg, rendimiento 39 %). **EMIE** m/z (% ar) 486 M⁺. **RMN** ¹H (CDCl₃, 200 MHz) 5.25 (d, 1H, H-7, *J* = 2.8); 4.20 (c, 2H, H-31, *J* = 7.0); 3.47 (s, 1H, H-3); 1.26 (s, 3H); 1.16 (s,

3H); 1.13 (s, 3H); 0.97 (s, 3H); 0.94 (s, 3H); 0.92 (s, 3H); 0.85 (d, 3H, Me-21, $J = 6.2$); 0.81 (s, 3H); 0.77 (s, 3H). **RMN ^{13}C** (CDCl_3 , 50 MHz) 177.4 (C-26); 146.1 (C-8); 117.8 (C-7); 76.4 (C-3).

1.4.6. Ácido 3R-hidroxi-7R-8R-epoxi-tirucal-24Z-en-26-ico (26)

A una mezcla de 46.2 mg de **2** (0.101 mmol) en 2 mL MeOH se adicionó lentamente una disolución de 53.3 mg de *m*-CPBA en 20 mL de CH_2Cl_2 . La mezcla se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente, la mezcla de reacción se lavó con una disolución acuosa de Na_2SO_3 , y agua destilada; y se secó con Na_2SO_4 anhidro. El disolvente se evaporó a presión reducida y el producto se recristalizó dos veces con MeOH. Se obtuvo un sólido blanco cristalino (30 mg, rendimiento 63 %). Pf 128-132 °C. **IR** (KBr, cm^{-1}) 3424.8 (m); 2928.3 (f); 2877.7 (f); 1707.5 (f); 1458.6 (m); 1380.5 (m); 1249.2 (m). **EMIE** m/z (% ar) 472 (14) M^+ , 454 (80) $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 439 (17) $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{Me}]^+$, 421 (100) $[\text{M}-2\text{H}_2\text{O}-\text{Me}]^+$, 367 (10) $[\text{C}_{27}\text{H}_{43}]^+$, 95 (18) $[\text{C}_2\text{H}_7\text{O}_4]^+$. **RMN ^1H** (CDCl_3 , 300 MHz) 6.07 (td, 1H, H-24, $J = 7.0$); 3.43 (t, 1H, H-3, $J = 2.4$); 2.86 (s, 1H, H-7); 1.92 (s, 3H, Me-27); 1.00 (s, 3H, Me-29); 0.95 (s, 3H, Me-19); 0.94 (s, 3H, Me-30); 0.92 (s, 3H, Me-28); 0.90 (d, 3H, Me-21, $J = 6.0$); 0.85 (s, 3H, Me-18).

1.4.7. 3R-hidroxi-7R-8R-epoxi-tirucal-24Z-en-26-ato de metilo (27)

Se preparó una mezcla de **22** (100 mg, 0.213 mmol), en CH_2Cl_2 (20 mL), NaHCO_3 pH 8 (20 mL), y $\text{CH}_3\text{CO}_3\text{H}$ (2 mL). La mezcla se mantuvo en agitación constante y a temperatura ambiente. El desarrollo de la reacción se siguió por *ccf*, y al cabo de 30 min se observó la desaparición total del sustrato. La mezcla se lavó con una disolución acuosa de NaHCO_3 (3 x 10 mL), se secó con Na_2SO_4 anhidro y se evaporó. El producto se purificó por cromatografía preparativa con un sistema de elución de hexano/AcOEt, 1:1. Finalmente se obtuvieron cristales blancos en forma de agujas (54 mg, rendimiento 52 %). Pf 68-72 °C. **UV** ($\lambda_{\text{máx}}$ nm, log ϵ) 220.0, 3.99. **IR** (CHCl_3 , cm^{-1}) 3617.1 (d); 2949.7 (m); 2882.5 (m); 1704.6 (m); 1641.6 (d); 1450.9 (m); 1380.8 (m); 1147.4 (m). **EMIE** m/z (% ar) 486 (87) M^+ , 471 (42) $[\text{M}-\text{Me}]^+$, 468 (30) $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 453 (26) $[\text{M}-\text{Me}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 435 (35) $[\text{M}-\text{Me}-2\text{H}_2\text{O}]^+$, 303 (12), 57 (100). **RMN ^1H** ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 300 MHz) 5.98 (td, 1H, H-24, $J = 1.5, 7.6$); 3.68 (s, 3H, Me-31); 3.37 (t, 1H, H-3, $J = 4.3$); 2.85 (s, 1H, H-7); 1.85 (d, 3H, Me-27, $J = 1.3$); 1.03 (s, 3H, Me-28); 0.93 (s, 3H, Me-29); 0.92 (d, 3H, Me-21, $J = 5.6$); 0.91 (s, 3H, Me-18); 0.90 (s, 3H, Me-30); 0.87 (s, 3H, Me-19). **RMN ^{13}C** ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 75 MHz) 168.5 (C-26); 144.0 (C-24); 127.4 (C-25); 75.3 (C-3); 63.8 (C-8); 55.0 (C-7); 53.7 (C-5); 51.3 (C-

31); 50.0 (C-17); 50.0 (C-14); 45.7 (C-13); 39.6 (C-9); 37.5 (C-4); 36.4 (C-20); 36.2 (C-1); 35.1 (C-10); 33.9 (C-15); 32.7 (C-22); 28.7 (C-30); 28.2 (C-16); 27.9 (C-12); 27.0 (C-2); 26.2 (C-23); 23.5 (C-6); 23.4 (C-18); 23.0 (C-28); 20.8 (C-27); 20.8 (C-29); 18.5 (C-21); 18.3 (C-11); 14.9 (C-19).

El EM reveló un ión molecular en m/z 486, consistente para la estructura del derivado epoxidado **27**. Sin embargo, durante la adquisición de los datos de resonancia realizada en $CDCl_3$ se observaron señales correspondientes a un compuesto diferente, el cual se propuso como 3*R*-hidroxi-tirucala-7*Z*, 9*Z*, 24*Z*-trien-26-ato de metilo (**27a**): 468 M^+ . **RMN 1H** ($CDCl_3$, 300 MHz) 5.93 (t, 1H, H-24, $J = 7.3$); 5.33 (s, 1H, H-7); 5.23 (s, 1H, H-11); 3.74 (s, 3H, Me-31); 3.46 (t, 1H, H-3, $J = 2.7$); 1.89 (d, 3H, Me-27, $J = 0.9$); 0.95 (s, 3H, Me-29); 0.94 (s, 3H, Me-28); 0.94 (s, 3H, Me-30); 0.92 (d, 3H, Me-21, $J = 6.3$ Hz); 0.84 (s, 3H, Me-18); 0.64 (s, 3H, Me-19). **RMN ^{13}C** ($CDCl_3$, 75 MHz) 168.6 (C-26); 144.9 (C-8); 144.1 (C-24); 141.5 (C-9); 126.4 (C-25); 118.3 (C-7); 115.1 (C-11); 76.5 (C-3); 51.2 (C-31); 50.8 (C-17); 49.6 (C-14); 44.1 (C-13); 42.4 (C-5); 38.3 (C-12); 37.6 (C-4); 36.1 (C-20); 36.0 (C-15); 35.9 (C-22); 31.2 (C-1); 29.6 (C-16); 27.9 (C-29); 27.8 (C-10); 26.6 (C-23); 25.4 (C-2); 23.6 (C-6); 23.1 (C-18); 22.4 (C-30); 20.7 (C-27); 20.5 (C-28); 18.3 (C-21); 16.2 (C-19).

1.4.8. Ácido 3*a*-acetoxi-tirucala-7*E*, 24*E*-dien-26-ico (**28**)

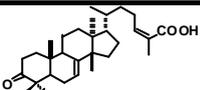
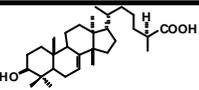
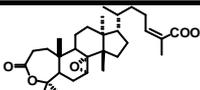
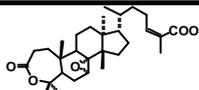
Una mezcla constituida por 53 mg de **2** (0.116 mmol), 1 mL de piridina, y 1 mL de Ac_2O , se mantuvo en una temperatura de 40 °C durante 4 h. Posteriormente, se agregó agua destilada y se procedió la extracción del producto con AcOEt. La mezcla de reacción se trató de manera similar a la descrita para la obtención de **17**. El residuo se purificó mediante *cc* utilizando mezclas de hexano/AcOEt de polaridad ascendente. Finalmente se obtuvo un sólido blanco (32.6 mg, rendimiento 56 %). Pf 120-122 °C. **IR** (KBr, cm^{-1}) 3415.2 (d); 2952.9 (m); 2883.0 (m); 1734.2 (m); 1687.0 (m); 1645.1 (d); 1438.2 (d); 1375.1 (m); 1244.3 (m). **EMIE** m/z (% ar) 498 M^+ . **RMN 1H** ($CDCl_3$, 300 MHz) 6.92 (td, 1H, H-24, $J = 7.5$); 5.26 (d, 1H, H-7, $J = 3.0$); 4.69 (t, 1H, H-3, $J = 3.0$); 2.07 (s, 3H, Me-32); 1.84 (s, 3H, Me-27); 0.98 (s, 3H, Me-30); 0.97 (s, 3H, Me-29); 0.92 (d, 3H, Me-21, $J = 6.0$); 0.86 (s, 3H, Me-18); 0.84 (s, 3H, Me-28); 0.78 (s, 3H, Me-19). **RMN ^{13}C** ($CDCl_3$, 75 MHz) 173.2 (C-26); 170.8 (C-31); 146.0 (C-8); 145.8 (C-24); 126.6 (C-25); 117.8 (C-7); 78.4 (C-3); 52.8 (C-5); 51.2 (C-14); 48.6 (C-17); 45.5 (C-9); 43.5 (C-13); 36.6 (C-4); 36.1 (C-20); 34.7 (C-10); 34.6 (C-22); 34.0 (C-2); 33.7 (C-15); 32.0 (C-1); 28.2 (C-12); 27.4 (C-28); 27.2

(C-18); 26.0 (C-16); 23.8 (C-6); 22.9 (C-23); 21.9 (C-30); 21.4 (C-29); 21.3 (C-32); 18.2 (C-21); 18.0 (C-11); 13.0 (C-19); 11.9 (C-27).

1.5. Análisis cristalográfico de rayos X

La obtención de formas cristalinas de los derivados **5**, **15** y **16** permitió realizar un estudio de difracción de rayos X. Los datos cristalográficos de estos compuestos se encuentran en el Cuadro 1, y las figuras 15, 16 y 17 corresponden a sus estructuras relativas obtenidas por difracción de rayos X.

Cuadro 1
Datos cristalográficos y estructurales de los compuestos 1, 5, 15 y 16

Compuestos y sus características	1*	5	15	16
Estructura química				
Fórmula química	C ₃₀ H ₄₆ O ₃	C ₃₀ H ₅₀ O ₃	C ₃₀ H ₄₆ O ₅ ·H ₂ O	C ₃₁ H ₄₈ O ₅ ·0.25 CH ₃ OH
Peso fórmula	454.68	458.70	504.68	508.70
Color y forma	---	Incoloro, paralelepípedo	Incoloro, prisma	Incoloro, placas
Temperatura (K)	294	293 (2)	293 (2)	293 (2)
Sistema cristalino	---	Ortorrómbico	Ortorrómbico	Monoclínico
Grupo espacial	P2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁
Dimensiones de la unidad celular (?)	<i>a</i> = 6.907 (3) <i>b</i> = 19.860 (7) <i>c</i> = 19.768 (4)	<i>a</i> = 10.997 (1) <i>b</i> = 36.851 (1) <i>c</i> = 7.019 (1)	<i>a</i> = 7.612 (1) <i>b</i> = 9.917 (2) <i>c</i> = 37.325 (4)	<i>a</i> = 14.086 (1) <i>b</i> = 7.5132 (4), β = 96.446 (1)° <i>c</i> = 27.852 (2)
Longitud molecular (Å)	19.1	18.181	17.511	18.911
Núcleo alicíclico (Å)	11.8	10.402	10.195	9.899
Cadena lateral (Å)	7.3	8.465	7.530	9.576
Volumen (Å ³)	2701.4 (20)	2844.5 (5)	2817.6 (7)	2929.0 (3)
Vol. crítico (cm ³ /mol)	1484.5	1508.5	1516.5	1574.5
Z	---	4	4	4
Densidad (mg/m ³)	1.172	1.071	1.190	1.154

Continuación Cuadro 1 ...

Coefficiente de absorción (mm ⁻¹)	---	0.512	0.081	0.077
Rango θ para colección de datos (°)	---	1.5 – 56.7	1.5 – 25.0	1.4 – 25.0
Reflexiones independientes/ colectadas	---	3781 (R _{int} = 0.0314) / 4434 [$I > 2\sigma(I)$]	2861 (R _{int} = 0.0000) / 2861 [$I > 2\sigma(I)$]	10261 (R _{int} = 0.0604) / 24167 [$I > 2\sigma(I)$]
Coefficiente de extinción	---	0.0014 (3)	0.0020 (6)	---
Bondad de ajuste en F ²	---	1.032	1.009	1.009
Índices finales R [$I > 2s(I)$]	R ₁ = 0.0833, wR ₂ = 0.1114	R ₁ = 0.0642 wR ₂ = 0.1640	R ₁ = 0.8350 wR ₂ = 0.1283	R ₁ = 0.0597 wR ₂ = 0.0796
Índices R (todos los datos)	---	R ₁ = 0.0914 wR ₂ = 0.1856	R ₁ = 0.2436 wR ₂ = 0.1881	R ₁ = 0.1405 wR ₂ = 0.0891
Parámetro de estructura absoluta	---	- 0.3 (7)	- 7.0 (6)	- 0.2 (12)
Tamaño del cristal (mm)	---	0.60 x 0.24 x 0.12	0.60 x 0.32 x 0.20	0.30 x 0.25 x 0.08
Rangos índice	---	- 11 ≤ h ≤ 11 - 39 ≤ k ≤ 39 - 7 ≤ l ≤ 7	0 ≤ h ≤ 9 0 ≤ k ≤ 11 0 ≤ l ≤ 44	- 16 ≤ h ≤ 16 - 8 ≤ k ≤ 8 - 33 ≤ l ≤ 33
Número de parámetros	---	315	335	---
Diferencia entre el pico y el fondo (eÅ ⁻³)	---	0.174 y – 0.175	0.193 y – 0.201	0.293 y – 0.232
Longitud de onda (Å)	---	1.54178	0.71073	---
F (000)	---	1016	1104	1114
Difractómetro	---	Siemens D-5005	Siemens D-5005	Bruker Smart Apex CCD

* Datos tomados de Jain *et al.*, (1995).

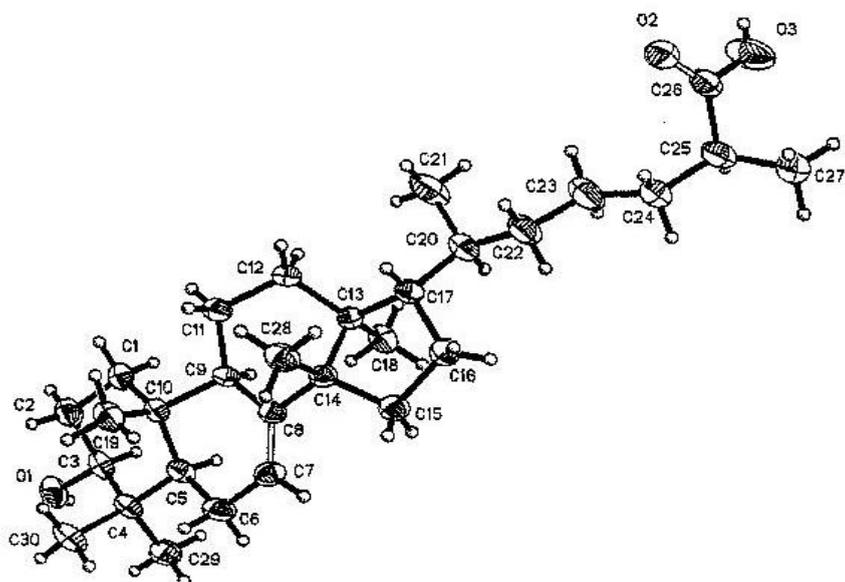


Figura 15
Estructura del ácido 24-25 S-dihidromasticadienólico (5)

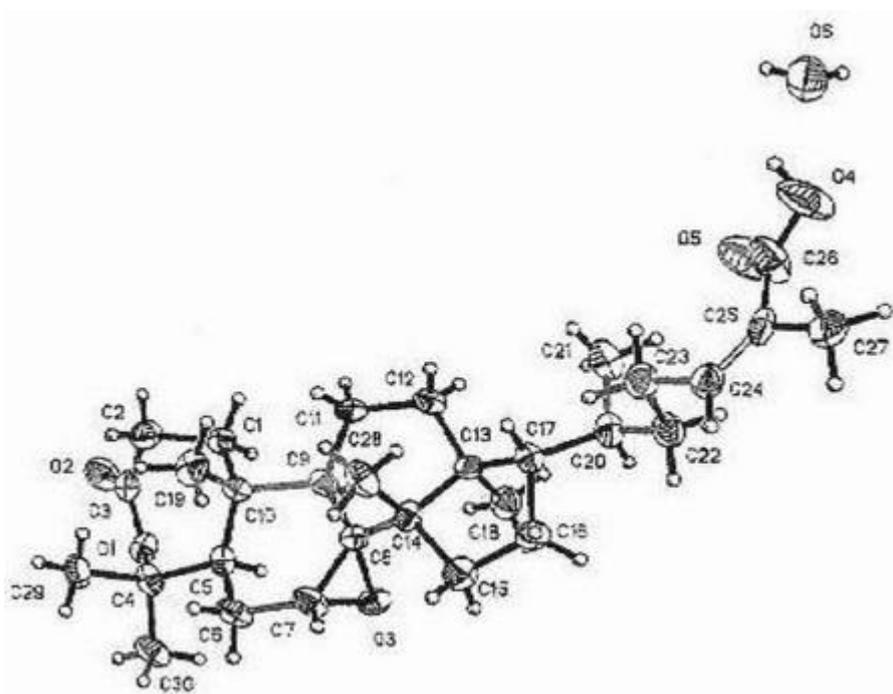


Figura 16
Estructura de la lactona del ácido 4-hidroxi-7R,8R-epoxi-3,4-seco-tirucal-24Z-en-26-ico (15)

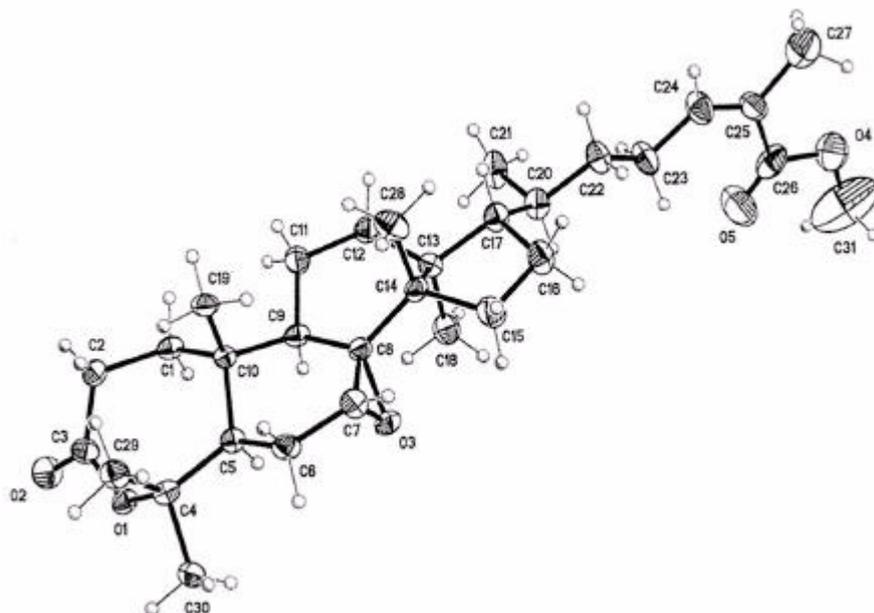


Figura 17

Estructura de la lactona del 4-hidroxi-7*R*-8*R*-epoxi-3, 4-seco-tirucal-24*Z*-en-26-ato de metilo (16)

2. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

En esta investigación se emplearon dos modelos de experimentación animal:

- edema inducido por TPA en la oreja de ratón,
- edema inducido por carragenina en la pata de la rata,

y tres experimentos *in vitro*:

- producción de NO en macrófagos peritoneales de ratón,
- producción del LTB₄ en leucocitos polimorfonucleares de rata,
- citotoxicidad en líneas celulares de cáncer humano.

Los animales utilizados en los ensayos se adquirieron en el bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Se manipularon de acuerdo con las condiciones establecidas por el «Comité de usos y cuidados de animales de experimentación», en el proyecto contenido en la Ley General de Salud (PROY-NOM 087-ECOL-SSA1-2000). Dentro de esa norma se establece su colocación dentro de cajas de polipropileno translúcidas, con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h, y en condiciones ambientales controladas (20-22 °C de temperatura y la 50-60 % de humedad). Los animales recibieron *ab libitum* agua y una dieta estándar de laboratorio.

2.1. Métodos *in vivo*

2.1.1. Modelo de edema inducido por TPA

2.1.1.1. Condiciones generales

Se utilizaron ratones machos de la cepa NIH con un peso comprendido entre 25-30 g. Los animales se dividieron al azar en los siguientes grupos (n = 4-9): control (recibieron TPA más el vehículo), de prueba (recibieron TPA más las sustancias problema) y de referencia (recibieron TPA más indometacina o ácido ursólico). Este triterpeno se obtuvo a partir de *Salvia mexicana* (Argumedo *et al.*, 2003).

En una primera fase se evaluaron los extractos acuoso y hexánico de *A. adstringens*, así como los triterpenos **1** y **2** obtenidos del extracto orgánico. Posteriormente, se evaluaron 18 derivados obtenidos.

Se prepararon disoluciones primarias de cada sustancia, para ello se tomó una muestra (2-5 mg) y se disolvió en el vehículo señalado en el Cuadro 2. Posteriormente, a partir de esa disolución se prepararon cuatro dosis. Todas las sustancias, excepto el extracto acuoso, se aplicaron por vía tópica. El extracto acuoso se administró por vía intraperitoneal (*p*) en dosis de 3,1, 10, 31 y 100 mg/kg de peso. El extracto hexánico, la indometacina (Sigma Chemical Co., San Luis Misuri, Estados Unidos), los triterpenos **1** y **2** y sus derivados se aplicaron en dosis de 0.031, 0.10, 0.31 y 1 mg/oreja. El compuesto **5** y ácido ursólico se evaluaron en dosis de 0.01, 0.031, 0.1 y 0.31 mg/oreja.

Cuadro 2
Tratamientos en el modelo de edema inducido por TPA

Sustancia	n	Vehículo
Extracto acuoso (EA)	4-5	SSF
Extracto hexánico (EH)	4-7	EtOH
Ácido masticadienoico (1)	4-7	EtOH/MeCN, 1:1
Ácido 3 α -hidroximasticadienoico (2)	4	EtOH/Me ₂ CO, 1:1
Ácido masticadienólico (3)	5	EtOH
Ácido 24-25S-dihidromasticadienoico (4)	5	CH ₂ Cl ₂
Ácido 24-25S-dihidromasticadienólico (5)	7	EtOH/Me ₂ CO, 1:1
Masticadienoato de metilo (6)	5	CH ₂ Cl ₂
Masticadienolato de metilo (7)	5	CH ₂ Cl ₂
24-25S-dihidromasticadienoato de metilo (8)	4	EtOH/Me ₂ CO, 1:1
24-25S-dihidromasticadienolato de metilo (9)	4-9	EtOH/Me ₂ CO, 1:1
Isomasticadienoato de etilo (10)	5	EtOH/Me ₂ CO, 1:1
3-oxo-7R-8R-epoxi-tirucal-24Z-en-26-ato de metilo (12)	4	Me ₂ CO
3S-hidroxi-7R-8R-epoxi-tirucal-24Z-en-26-ato de metilo (14)	4	Me ₂ CO
Lactona de 4-hidroxi-7R-8R-epoxi-3,4-seco-tirucal-24Z-en-26-ato de metilo (16)	4	Me ₂ CO
Ácido 3 β -acetoxi-tirucal-7E, 24E-dien-26-ico (17)	4-7	EtOH/Me ₂ CO, 1:1
Ácido 24-25S-dihidro-3-epimasticadienólico (21)	5	CH ₂ Cl ₂
3-epiisomasticadienolato de etilo (24)	4	EtOH/Me ₂ CO, 1:1
24-25S-dihidro-3-epiisomasticadienolato de etilo (25)	4	EtOH/Me ₂ CO, 1:1
Ácido 3R-hidroxi-7R-8R-epoxi-tirucal-24Z-en-26-ico (26)	5	MeOH
3R-hidroxi-7R-8R-epoxi-tirucal-24Z-en-26-ato de metilo (27)	4	Me ₂ CO
Ácido 3 α -acetoxi-tirucal-7E, 24E-dien-26-ico (28)	7	EtOH/Me ₂ CO, 1:1
Ácido ursólico	5-7	DMSO/EtOH, 7.2:92.8
Indometacina	4	EtOH/Me ₂ CO, 1:1

Acetona (Me₂CO); acetonitrilo (MeCN); cloruro de metileno (CH₂Cl₂); disolución salina al 0.85 % (SSF); etanol (EtOH); metanol (MeOH); sulfóxido de dimetilo (DMSO).

2.1.1.2. Procedimiento

El ensayo se efectuó conforme con la técnica establecida por De Young *et al.* (1989) y con algunas modificaciones (Oviedo-Chávez *et al.*, 2004). A continuación se describe el procedimiento realizado (fig. 18).

Los ratones se anestesiaron con 0.25 mL de pentobarbital (Sedalforte®, 0.063 g/mL) por vía *ip*. Posteriormente, una disolución etanólica de 2.5 µg/10 µL de TPA (Sigma) se administró en el pabellón de la oreja derecha de todos los animales (5 µL en cada lado). Las sustancias de prueba y los fármacos de referencia se aplicaron 10 min después (10 µL en cada lado). La oreja izquierda sirvió como control negativo; primero se administraron 10 µL de etanol (EtOH), y luego 20 µL del vehículo correspondiente. Después de 4 h, los animales se sacrificaron por dislocación cervical y de ambas orejas se obtuvieron las biopsias con ayuda de un sacabocados circular de 9 mm de diámetro.

El edema se determinó de la diferencia de pesos (en mg) del tejido tratado (oreja derecha), respecto del tejido no tratado (oreja izquierda). Los porcentajes de inhibición del edema (% *IE*) se calcularon de acuerdo con la ecuación 1. En donde *A* corresponde al valor promedio del edema en el grupo control, y *B* al valor promedio del edema en el grupo de prueba o de referencia.

$$\% IE = 100 - [B / A \times 100] \quad (1)$$

Se construyó una curva dosis-respuesta para cada sustancia, siendo las variables «x» y «y» los valores de las dosis y los % *IE*, respectivamente. La dosis efectiva 50 (DE₅₀) se determinó a partir de los datos significativos de las curvas que mostraron un efecto dependiente de la dosis y un valor de *IE* mayor de 50 % en la última dosis de ensayo. Los valores de DE₅₀ en mg/oreja se convirtieron en unidades de µmol/oreja considerando el peso fórmula de cada compuesto.

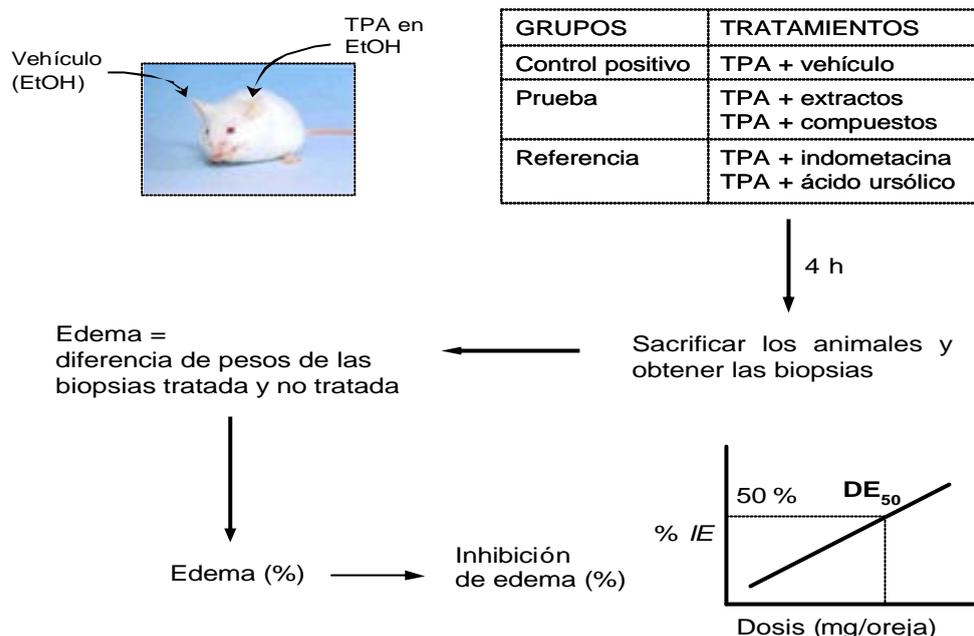


Figura 18
Modelo de edema agudo inducido por TPA en la oreja de ratón

2.1.1.3. Resultados

Todos los resultados se expresaron en valores de media y error estándar (media ± eem), n = 4-8. En el Cuadro 3 se muestran los datos de los extractos de *A. adstringens* y los triterpenos **1** y **2**. En los Cuadros 4 y 5 se presentan los resultados de los derivados de **1** y **2**. Finalmente, el Cuadro 6 presenta los valores de DE₅₀ en μmol/oreja y logaritmos base 10 del inverso de la DE₅₀ de los derivados de **1** y **2**.

Cuadro 3

Efectos de los extractos y triterpenos constituyentes de *A. adstringens* en el modelo de edema inducido por TPA

Grupo	Dosis (mg/oreja)	Peso de la biopsia (mg)	IE (%)	DE ₅₀ (mg/oreja)
Extracto acuoso (EA) ^a	---	13.73 ± 0.25	---	ND
	3.1	12.80 ± 1.68	6.74	
	10	13.56 ± 0.58	1.20	
	31	13.56 ± 0.71	1.20	
	100	13.65 ± 0.44	0.55	

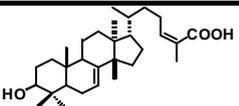
Continuación Cuadro 3...

Extracto hexánico (EH)	---	14.19 ± 0.22	---	Mayor de 1.0
	0.031	11.60 ± 0.72	18.2	
	0.10	10.57 ± 0.75 **	25.5 **	
	0.31	9.09 ± 0.71 **	36.0 **	
	1.0	7.21 ± 0.65 **	49.1 **	
Ácido masticadienoico (1)	---	14.90 ± 0.35	---	ND
	0.031	13.90 ± 0.43	6.7	
	0.10	12.75 ± 0.25	14.4	
	0.31	9.52 ± 1.25 **	36.1 **	
	1.0	11.56 ± 0.58 **	22.4 **	
Ácido 3 α -hidroxi- masticadienoico (2)	---	14.55 ± 0.35	---	0.800 ± 0.195
	0.031	11.93 ± 0.92	18.0	
	0.10	10.48 ± 0.49 *	28.0 **	
	0.31	9.23 ± 1.22 **	36.6 **	
	1.0	6.45 ± 0.80 **	55.7 **	
Ácido ursólico	---	13.29 ± 0.58	---	Mayor de 0.31
	0.01	12.34 ± 0.18	7.1	
	0.031	11.93 ± 0.35	10.2	
	0.1	8.54 ± 0.69 **	35.7 **	
	0.31	7.51 ± 1.05 **	43.4 **	
Indometacina	---	14.55 ± 0.35	---	0.204 ± 0.051
	0.031	11.48 ± 0.23	21.1	
	0.10	10.15 ± 0.65 **	30.2 **	
	0.31	6.18 ± 1.67 **	57.6 **	
	1.0	5.23 ± 0.62 **	64.1 **	

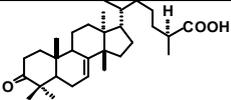
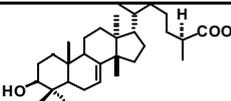
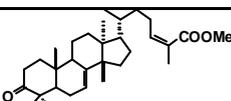
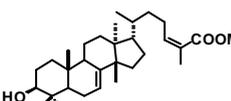
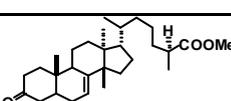
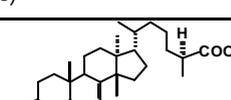
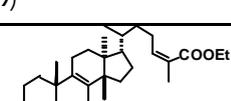
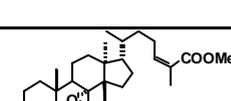
Las dosis efectivas 50 (DE₅₀) se calcularon a través de un análisis de regresión no lineal, mediante el programa estadístico JMP versión 5.1 (® SAS Institute Inc., 2003). * $P = 0.05$ y ** $P = 0.01$ *t* de *Dunnett*. ^a Dosis en mg/kg de peso. No determinado (ND).

Cuadro 4

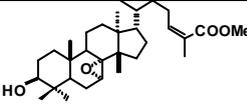
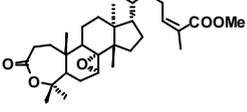
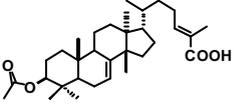
Efectos de los derivados del ácido masticadienoico en el modelo de edema inducido por TPA

Compuesto	Dosis (mg/oreja)	Peso de la biopsia (mg)	la <i>I</i> E (%)	DE ₅₀ (mg/oreja)
 Ácido masticadienolico (3)	---	15.72 ± 0.64	---	0.748 ± 0.262
	0.031	14.90 ± 0.74	5.2	
	0.10	12.50 ± 1.51	20.5 *	
	0.31	9.16 ± 0.62 **	41.7 **	
	1.0	7.68 ± 0.64 **	51.1 **	

Continuación Cuadro 4 ...

 Ácido 24-25S-dihidromasticadienoico (4)	---	13.68 ± 0.86	---	0.611 ± 0.079
	0.031	10.98 ± 0.51 *	19.7 **	
	0.10	9.44 ± 0.62 **	31.0 **	
	0.31	8.66 ± 0.52 **	36.7 **	
	1.0	4.30 ± 0.62 **	68.6 **	
 Ácido 24-25S-dihidromasticadienólico (5)	---	14.66 ± 0.68	---	ND
	0.01	13.99 ± 0.32	4.6	
	0.031	13.66 ± 0.72	6.8	
	0.1	12.14 ± 0.38 **	17.2 **	
	0.31	12.57 ± 0.37 *	14.2 **	
 Masticadienoato de metilo (6)	---	11.46 ± 0.81	---	0.131 ± 0.030
	0.031	9.96 ± 1.01	13.1	
	0.10	7.26 ± 1.61 *	36.7 *	
	0.31	2.46 ± 0.44 **	78.5 **	
	1.0	2.20 ± 0.28 **	80.8 **	
 Masticadienolato de metilo (7)	---	14.88 ± 0.41	---	0.161 ± 0.038
	0.031	11.16 ± 0.59 *	25.0 *	
	0.10	9.88 ± 1.45 **	33.6 **	
	0.31	4.06 ± 1.09 **	72.7 **	
	1.0	2.92 ± 0.68 **	80.4 **	
 24-25S-dihidromasticadienoato de metilo (8)	---	14.68 ± 0.87	---	Mayor de 1.0
	0.031	13.25 ± 0.58	9.7	
	0.10	12.45 ± 1.74	15.2	
	0.31	11.33 ± 0.87	22.8	
	1.0	9.48 ± 1.22 *	35.4 *	
 24-25S-dihidromasticadienolato de metilo (9)	---	14.23 ± 0.48	---	0.834 ± 0.341
	0.031	12.30 ± 0.33	13.6	
	0.10	11.60 ± 0.61 *	18.5 **	
	0.31	9.58 ± 1.38 **	32.7 **	
	1.0	6.62 ± 1.08 **	53.4 **	
 Isomasticadienoato de etilo (10)	---	13.54 ± 0.73	---	Mayor de 1.0
	0.031	13.74 ± 0.76	0.0	
	0.10	12.52 ± 0.50	7.5	
	0.31	9.14 ± 0.44 **	32.5 **	
	1.0	7.90 ± 0.64 **	41.7 **	
 3-oxo-7R-8R-epoxi-tirucal-24Z-en-26-ato de metilo (12)	---	12.43 ± 0.65	---	0.074 ± 0.025
	0.031	9.40 ± 1.46	24.3	
	0.10	5.15 ± 1.16 **	58.6 **	
	0.31	2.67 ± 0.50 **	78.5 **	
	1.0	4.70 ± 1.93 **	62.2 **	

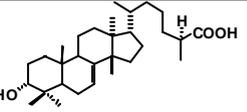
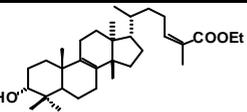
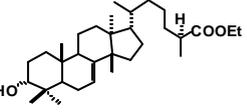
Continuación Cuadro 4 ...

 3S-hidroxi-7R-8R-epoxi-tirucal-24Z-en-26-ato de metilo (14)	---	13.85 ± 0.49	---	0.840 ± 0.177
	0.031	9.75 ± 1.34 *	29.6 *	
	0.10	9.13 ± 1.25 *	34.1 *	
	0.31	8.78 ± 1.02 **	36.6 **	
	1.0	6.35 ± 0.66 **	54.2 **	
 Lactona de 4-hidroxi-7R-8R-epoxi-3,4-seco-tirucal-24Z-en-26-ato de metilo (16)	---	13.47 ± 0.58	---	0.078 ± 0.030
	0.031	9.57 ± 0.70	29.0	
	0.10	5.67 ± 2.03 **	57.9 **	
	0.31	1.13 ± 0.33 **	91.6 **	
	1.0	0.60 ± 0.10 **	95.5 **	
 Ácido 3-acetoxi-tirucala-7E, 24E-dien-26-ico (17)	---	14.40 ± 0.34	---	Mayor de 1.0
	0.031	13.16 ± 0.49	8.6	
	0.10	12.74 ± 0.54	11.5 *	
	0.31	9.60 ± 0.29 **	33.3 **	
	1.0	7.98 ± 0.48 **	44.6 **	

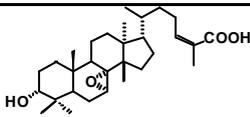
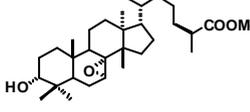
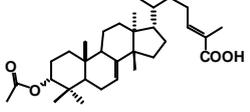
Las dosis efectivas 50 (DE₅₀) se calcularon a través de un análisis de regresión no lineal, mediante el programa estadístico JMP. * $P = 0.05$ y ** $P = 0.01$ *t* de *Dunnnett*. Los valores de DE₅₀ para el ácido ursólico y la indometacina son > 0.31 y 0.204 ± 0.051 mg/oreja, respectivamente. No determinado (ND).

Cuadro 5

Efectos de los derivados de ácido 3a-hidroximasticadienoico en el modelo de edema inducido por TPA

Compuesto	Dosis (mg/oreja)	Peso de la IE (mg)	la IE (%)	DE ₅₀ (mg/oreja)
 Ácido 24-25S-dihidro-3-epimasticadienolico (21)	---	15.18 ± 0.39	---	0.182 ± 0.026
	0.031	12.72 ± 0.45	16.2	
	0.10	11.16 ± 1.20 **	26.5 **	
	0.31	5.36 ± 0.52 **	64.7 **	
	1.0	3.56 ± 0.70 **	76.6 **	
 3-episomasticadienolato de etilo (24)	---	17.35 ± 0.86	---	0.176 ± 0.024
	0.031	14.40 ± 0.26 *	17.0 *	
	0.10	11.65 ± 0.76 **	32.9 **	
	0.31	6.28 ± 0.72 **	63.8 **	
	1.0	8.03 ± 0.92 **	53.7 **	
 24-25S-dihidro-3-epimasticadienolato de etilo (25)	---	13.63 ± 0.54	---	0.825 ± 0.112
	0.031	14.20 ± 0.35	0.0	
	0.10	9.77 ± 0.23 *	28.4 **	
	0.31	9.53 ± 1.45 **	30.1 **	
	1.0	6.03 ± 0.43 **	55.7 **	

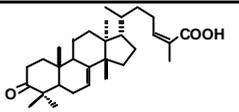
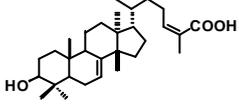
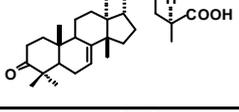
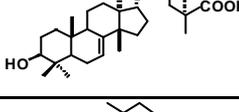
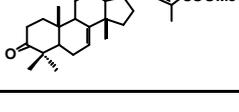
Continuación Cuadro 5...

 Ácido 3R-hidroxi-7R-8R-epoxi-tirucal-24Z- en-26-ico (26)	---	16.04 ± 0.74	---	0.070 ± 0.012
	0.031	15.28 ± 1.29	4.7	
	0.10	6.68 ± 1.13 **	58.4 **	
	0.31	5.82 ± 1.26 **	63.7 **	
	1.0	2.72 ± 0.59 **	83.0 **	
 3R-hidroxi-7R-8R-epoxi-tirucal-24Z-en-26- ato de metilo (27)	---	13.15 ± 1.08	---	0.185 ± 0.065
	0.031	10.75 ± 0.98	18.3	
	0.10	8.37 ± 0.91	36.3	
	0.31	5.45 ± 2.06 **	58.6 **	
	1.0	4.25 ± 1.33 **	67.7 **	
 Ácido 3α-acetoxi tirucala-7E, 24E-dien-26- ico (28)	---	14.10 ± 0.33	---	0.692 ± 0.189
	0.031	12.94 ± 0.36	8.2	
	0.10	10.20 ± 0.46 **	27.7 **	
	0.31	8.75 ± 0.66 **	37.9 **	
	1.0	6.13 ± 0.86 **	56.5 **	

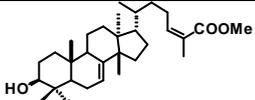
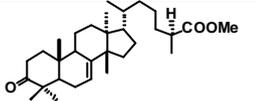
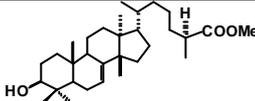
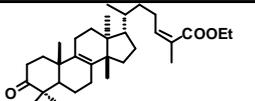
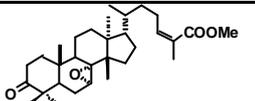
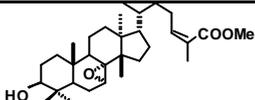
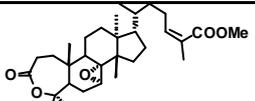
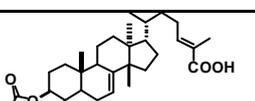
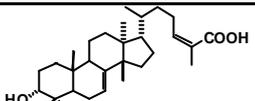
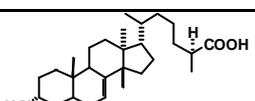
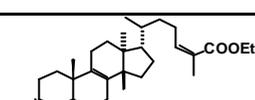
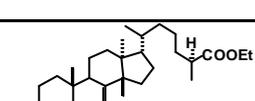
Las dosis efectivas 50 (DE₅₀) se calcularon a través de un análisis de regresión no lineal, mediante el programa estadístico JMP. * $P = 0.05$ y ** $P = 0.01$ *t* de *Dunnett*. Los valores de DE₅₀ para el ácido ursólico y la indometacina son > 0.31 y 0.204 ± 0.051 mg/oreja, respectivamente.

Cuadro 6

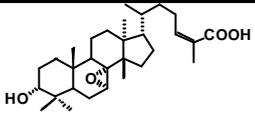
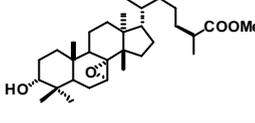
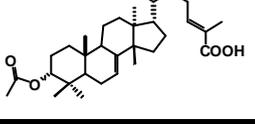
Dosis efectiva media de los triterpenos originales 1 y 2 y sus derivados en el modelo de edema inducido por TPA

Compuesto 1 y sus derivados	DE ₅₀ (μmol/oreja)	Log DE ₅₀ ⁻¹
Ácido masticadienoico (1) 	ND	ND
Ácido masticadienolico (3) 	1.638 ± 0.573	5.786 ± 0.456 *
Ácido 24-25S-dihidromasticadienoico (4) 	1.337 ± 0.173	5.874 ± 0.888 *
Ácido 24-25S-dihidromasticadienolico (5) 	ND	ND
Masticadienoato de metilo (6) 	0.279 ± 0.064	6.555 ± 0.640 **

Continuación Cuadro 6...

Masticadienolato de metilo (7)		0.341 ± 0.081	$6.467 \pm 0.627^{**}$
24-25S-dihidromasticadienoato de metilo (8)		> 2.124	< 5.673
24-25S-dihidromasticadienolato de metilo (9)		1.765 ± 0.720	$5.753 \pm 0.389^*$
Isomasticadienoato de etilo (10)		> 2.072	< 5.684
3-oxo-7R-8R-epoxi-tirucal-24Z-en-26-ato de metilo (12)		0.152 ± 0.052	$6.819 \pm 0.468^{**}$
3S-hidroxi-7R-8R-epoxi-tirucal-24Z-en-26-ato de metilo (14)		1.725 ± 0.364	$5.763 \pm 0.676^*$
Lactona de 4-hidroxi-7R-8R-epoxi-3,4-seco-tirucal-24Z-en-26-ato de metilo (16)		0.155 ± 0.060	$6.810 \pm 0.410^{**}$
Ácido 3β-acetoxi-tirucala-7E, 24E-dien-26-ico (17)		> 2.005	< 5.698
Compuesto 2 y sus derivados			
Ácido 3α-hidroximasticadienoico (2)		1.752 ± 0.428	5.757 ± 0.612
Ácido 24-25S-dihidro-3-epimasticadienolico (21)		0.397 ± 0.056	$6.401 \pm 0.850^{**}$
3-epiisomasticadienolato de etilo (24)		0.363 ± 0.049	$6.439 \pm 0.875^{**}$
24-25S-dihidro-3-epimasticadienolato de etilo (25)		1.694 ± 0.229	5.771 ± 0.869

Continuación Cuadro 6...

Ácido 3 <i>R</i> -hidroxi-7 <i>R</i> -8 <i>R</i> -epoxi-tirucal-24 <i>Z</i> -en-26-ico (26)		0.149 ± 0.026	6.827 ± 0.757 **
3 <i>R</i> -hidroxi-7 <i>R</i> -8 <i>R</i> -epoxi-tirucal-24 <i>Z</i> -en-26-ato de metilo (27)		0.381 ± 0.134	6.419 ± 0.455 **
Ácido 3α-acetoxi-tirucal-7 <i>E</i> , 24 <i>E</i> -dien-26-ico (28)		1.387 ± 0.379	5.858 ± 0.564

Los resultados están expresados como media ± eem. Los datos de DE₅₀ (μmol/oreja) y Log 1/DE₅₀ para el ácido ursólico son < 0.679 y < 6.168, y para indometacina 0.570 ± 0.143 y 6.244 ± 0.600 **. * P = 0.05 y ** P = 0.01 *t* de *Dunnett* con respecto del triterpeno original correspondiente. No determinado (ND).

2.1.2. Modelo de edema inducido por carragenina

2.1.2.1. Condiciones generales

Se usaron ratas Wistar machos con un peso comprendido entre 150-200 g, y se distribuyeron al azar (n = 3-6) en los siguientes grupos: control (recibió carragenina y el vehículo correspondiente), de prueba (recibieron carragenina y las sustancias a evaluar), y de referencia (recibieron carragenina y el fármaco).

Se evaluaron los extractos acuoso (EA) y hexánico (EH), los ácidos masticadienoico (1) y 3α-hidroximasticadienoico (2); también, el ácido masticadienólico (3), masticadienoato de metilo (6), masticadienolato de metilo (7) y el ácido 24-25*S*-dihidro-3-epimasticadienólico (21). Los fármacos de referencia fueron el ácido ursólico y la indometacina. Se prepararon disoluciones primarias de las sustancias; para ello una muestra de 80 mg se disolvió en una mezcla de sulfóxido de dimetilo (DMSO) (Sigma) y disolución A (1:9). La disolución A se preparó con Tween al 0.1 % y metilcelulosa al 0.5 % en una relación 1:3. A partir de cada disolución se prepararon dos dosis de ensayo (31 y 100 mg/kg). La indometacina se evaluó en la dosis de 7.5 mg/kg.

2.1.2.2. Procedimiento

El ensayo se procedió de acuerdo con lo establecido por Winter *et al.* (1962) con algunas variaciones (Oviedo-Chávez *et al.*, 2004). A continuación se describe el procedimiento realizado (fig. 19).

Inicialmente se efectuó la calibración del pletismómetro (Modelo 7140, Ugo Basile). Posteriormente, se determinó el volumen inicial (V_0 , en mL) mediante la medición del volumen de agua que se desplaza tras la introducción de la pata posterior derecha hasta el nivel del callo. Se realizaron de 3 a 4 mediciones, que no diferían del 4 %. A continuación, por vía *ip* se administraron las sustancias de prueba y los fármacos de referencia. El grupo control recibió el vehículo correspondiente.

Una hora después, una disolución de carragenina tipo kappa (Sigma) al 0.1 % (0.1 mL) en disolución salina fisiológica (SSF) se administró por vía subcutánea en la aponeurosis plantar de la pata en cuestión. Después de 1, 3 y 5 h se determinaron los volúmenes de la pata y los valores se asignaron como volúmenes finales (V_f). La diferencia del volumen V respecto de V_0 representó una medida del edema. A partir de estos datos se calcularon los porcentajes de inhibición del edema parcial (% *IEP*) en los tres tiempos de exploración, tomando en cuenta los valores de cada grupo de ensayo respecto con el control. Por otro lado, los resultados de volumen del edema se multiplicaron por 100 y se integraron en una curva, la cual representa el desarrollo del efecto farmacológico observado. El área bajo la curva (ABC) se calculó a partir de la regla trapezoidal descrita por Tallarida y Murray (1981). Los valores de ABC permitieron determinar los porcentajes de inhibición del edema total (% *JET*) (ecuación 2). En donde A correspondió al valor promedio del área ABC para el grupo control, y B al valor de ABC para cada uno de los animales componentes de los grupos de prueba o de referencia.

$$\% IE = [A - B] / A \times 100 \quad (2)$$

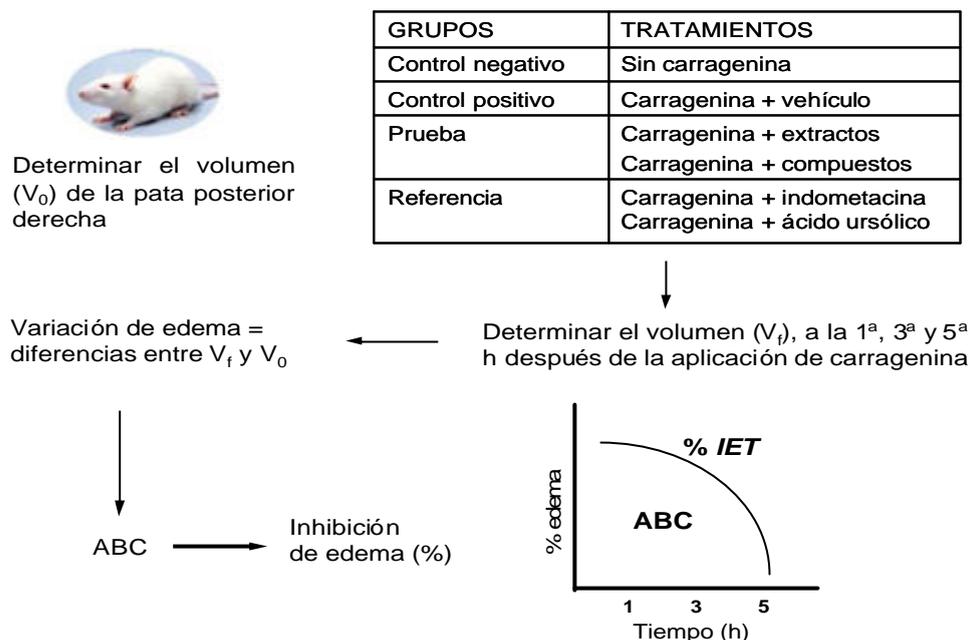


Figura 19
Modelo de edema inducido por carragenina en la pata de la rata

2.1.2.3. Resultados

Los resultados (media ± eem, n = 46) se expresaron como volúmenes del edema en mL, porcentajes de inhibición de los edemas parcial (IEP) y total (IET). En el Cuadro 7 y en la figura 20 se muestran los resultados de los extractos acuoso y hexánico de *A. adstringens*, así como de los ácidos 1 y 2. En el Cuadro 8 se presentan los resultados de los derivados 3, 6, 7 y 21 y se graficaron las respuestas de inhibición del edema global de los derivados evaluados, con respecto a los triterpenos originales 1 y 2 (fig. 21).

Cuadro 7
Efectos de los extractos de *A. adstringens* y los triterpenos 1 y 2 en el modelo de edema inducido por carragenina

Grupo	Dosis (mg/kg)	Volumen de edema (mL)			IET (%)
		1 h	3 h	5 h	
Control	---	0.37 ± 0.03	0.46 ± 0.06	0.39 ± 0.06	0.0

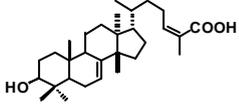
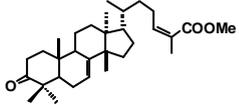
Continuación Cuadro 7...

Extracto acuoso (EA)	31	0.18 ± 0.05 ** (51.4)	0.18 ± 0.03 ** (60.9)	0.07 ± 0.03 ** (82.1)	68.0 ± 9.0
	100	0.13 ± 0.00 ** (64.9)	0.08 ± 0.03 ** (82.6)	0.09 ± 0.02 ** (76.9)	73.5 ± 2.5 **
Extracto hexánico (EH)	31	0.37 ± 0.02 (0.0)	0.51 ± 0.04 (0.0)	0.44 ± 0.06 (0.0)	0.0
	100	0.35 ± 0.03 (5.4)	0.37 ± 0.03 (19.6)	0.26 ± 0.03 (33.3)	14.4 ± 7.5
Ácido masticadienoico (1)	31	0.31 ± 0.02 (16.2)	0.37 ± 0.01 (19.6)	0.33 ± 0.02 (15.4)	17.0 ± 4.4
	100	0.27 ± 0.04 (27.0)	0.20 ± 0.03 ** (56.5)	0.15 ± 0.02 ** (61.5)	43.6 ± 7.2
Ácido 3-epi-masticadienólico (2)	31	0.27 ± 0.03 (27.0)	0.37 ± 0.03 (19.6)	0.31 ± 0.03 (20.5)	24.0 ± 5.7
	100	0.27 ± 0.03 (27.0)	0.18 ± 0.04 ** (60.9)	0.16 ± 0.02 ** (59.0)	44.6 ± 7.5
Ácido ursólico	31	0.27 ± 0.04 (27.0)	0.13 ± 0.04 ** (71.7)	0.08 ± 0.03 ** (79.5)	51.9 ± 9.6
	100	0.31 ± 0.02 (16.2)	0.25 ± 0.03 ** (45.7)	0.23 ± 0.02 (41.0)	31.7 ± 3.5
Indometacina	7.5	0.29 ± 0.03 (21.6)	0.27 ± 0.03 (41.3)	0.21 ± 0.04 * (46.2)	33.5 ± 7.1

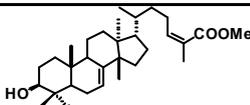
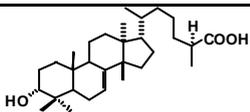
Los datos de inhibición del edema parcial (%IEP) se encuentran entre paréntesis, y se calcularon a partir de los volúmenes del edema del problema respecto del grupo control. * $P = 0.05$, ** $P = 0.01$ *t* de Tukey-Kramer.

Cuadro 8

Efectos de los derivados 3, 6, 7 y 21 en el modelo de edema inducido por carragenina

Compuesto	Dosis (mg/kg)	Volumen de edema (mL)			IET (%)
		1 h	3 h	5 h	
 Ácido masticadienólico (3)	---	0.21 ± 0.03	0.71 ± 0.03	0.79 ± 0.02	0.0
	31	0.18 ± 0.03 (13.3)	0.60 ± 0.04 (14.9)	0.80 ± 0.04 (0.0)	10.3 ± 5.5
	100	0.17 ± 0.03 (18.5)	0.38 ± 0.04 ** (47.0)	0.43 ± 0.04 ** (46.3)	40.4 ± 6.5
 Masticadienoato de metilo (6)	---	0.47 ± 0.04	1.23 ± 0.06	1.07 ± 0.07	0.0
	31	0.44 ± 0.03 (7.3)	1.08 ± 0.01 (12.0)	0.87 ± 0.03 * (18.8)	12.1 ± 2.7
	100	0.46 ± 0.12 (2.9)	0.99 ± 0.05 ** (19.5)	0.91 ± 0.03 (15.3)	13.8 ± 7.7

Continuación Cuadro 8...

 Masticadienolato de metilo (7)	---	0.25 ± 0.01	0.98 ± 0.06	1.08 ± 0.08	0.0
	31	0.21 ± 0.09 (15.7)	0.82 ± 0.17 (16.4)	0.99 ± 0.15 (7.6)	13.7 ± 19.2
	100	0.23 ± 0.03 (11.3)	0.79 ± 0.06 (19.3)	0.80 ± 0.07 (25.6)	19.5 ± 7.2
 Ácido 24-25S-dihidro-3-epimasticadienólico (21)	---	0.33 ± 0.05	0.60 ± 0.07	0.85 ± 0.04	0.0
	31	0.36 ± 0.07 (0.0)	0.58 ± 0.07 (2.9)	0.67 ± 0.07 (20.8)	4.1 ± 13.6
	100	0.36 ± 0.05 (0.0)	0.42 ± 0.05 (30.2)	0.46 ± 0.06 ** (46.0)	21.8 ± 10.4

Cada valor representa la media ± eem de 4-6 animales. Los datos de inhibición del edema parcial (% IEP) se encuentran entre paréntesis, y se calcularon a partir de los volúmenes del edema del problema respecto del grupo control. La inhibición del edema total (% IET) se calculó mediante la regla trapezoidal (Tallarida y Murray, 1981). * $P = 0.05$, ** $P = 0.01$ *t* de Dunnett.

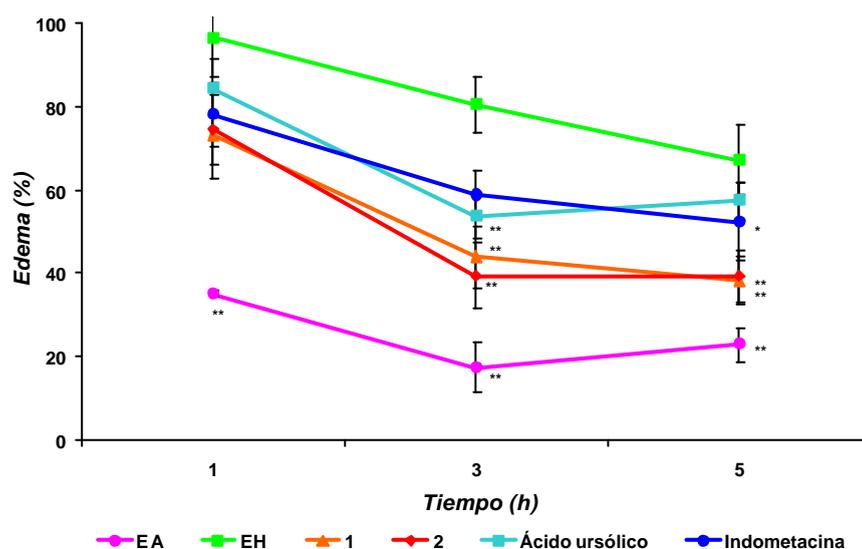


Figura 20

Curso temporal de las respuestas de los extractos de *A. adstringens* y los triterpenos 1 y 2 en el modelo de edema inducido por carragenina

Se muestran los datos del edema parcial (%) para las sustancias evaluadas a la dosis de 100 mg/kg, con excepción de indometacina, cuya dosis fue de 7.5 mg/kg. * $P = 0.05$, ** $P = 0.01$ *t* de Tukey-Kramer. Extracto acuoso (EA); extracto hexánico (EH); ácido masticadienoico (1); ácido 3-epimasticadienólico (2).

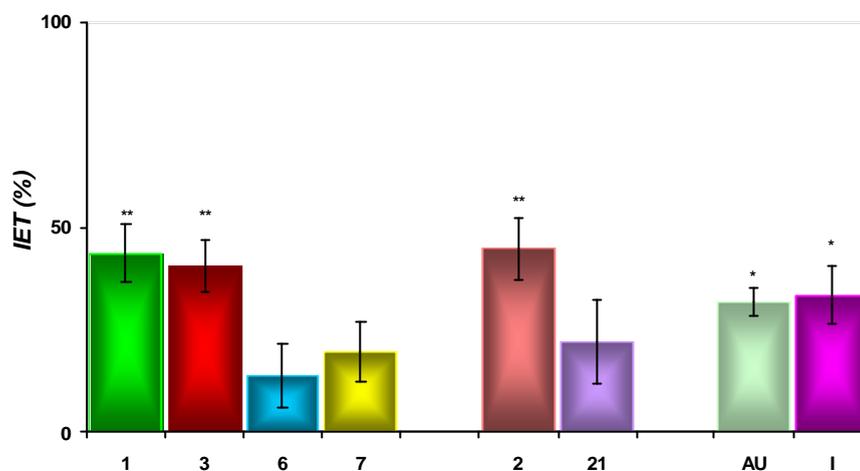


Figura 21

Efectos de los triterpenos 1 y 2, y los derivados 3, 6, 7 y 21 en el modelo de edema inducido por carragenina

Se presentan los datos de inhibición del edema total (*IET*) (media \pm eem, $n = 4-6$) de los compuestos evaluados a la dosis de 100 mg/kg, con excepción de indometacina, cuya dosis fue de 7.5 mg/kg. * $P = 0.05$, ** $P = 0.01$ *t* de *Dunnnett*. Ácido masticadienolico (1); ácido 3-epimasticadienolico (2); ácido masticadienolico (3); masticadienoato de metilo (6); masticadienolato de metilo (7); ácido 24-25S-dihidro-3-epimasticadienolico (21); ácido ursólico (AU); indometacina (I).

2.2. Métodos *in vitro*

2.2.1. Producción del óxido nítrico en macrófagos peritoneales de ratón

2.2.1.1. Condiciones generales

Las células se obtuvieron de la cavidad peritoneal de ratones Swiss y CD-1, hembras de 25-30 g ($n = 3-5$). El lipopolisacárido (LPS) provenía de *Escherichia coli* serotipo 055:B5 (Sigma).

Se evaluaron un extracto hexánico de *A. adstringens*, los triterpenos 1 y 2, ácido ursólico y pristimerina. Las sustancias se disolvieron en EtOH. La concentración final de EtOH en los sobrenadantes de cultivo celular fue menor del 0.1 %, además no tuvo efecto en los ensayos. También se evaluaron un extracto acuoso de la especie y los fármacos de referencia (aminoguanidina e indometacina), quienes se disolvieron en agua. Los compuestos 1, 2, indometacina y aminoguanidina se evaluaron a la dosis de

100 μM ; ácido ursólico y pristimerina a 10 μM y 0.5 μM , respectivamente; y los extractos orgánico y acuoso a la dosis de 100 $\mu\text{g/mL}$ (Oviedo-Chávez *et al.*, 2004).

Asimismo, los ácidos masticadienoico (**1**), 3- α -hidroximasticadienoico (**2**), masticadienolico (**3**), y 24-25S-dihidromasticadienoico (**4**); masticadienoato de metilo (**6**); 3-oxo-7R-8R-epoxi-tirucal-24Z-en-26-ato de metilo (**12**); lactona de 4-hidroxi-7R-8R-epoxi-3, 4-seco-tirucal-24Z-en-26-ato de metilo (**16**); y ácido ursólico se evaluaron en el rango de dosis desde 0.001 hasta 10 μM . Estos compuestos se disolvieron en EtOH.

2.2.1.2. Procedimiento

El procedimiento (fig. 22) se realizó de acuerdo con las especificaciones establecidas por Fushiya *et al.* (1998) con algunas modificaciones (Oviedo-Chávez *et al.*, 2004 y 2005).

2.2.1.2.1. Aislamiento y cultivo primario de macrófagos

En el peritoneo de los animales se aplicó 1 mL de medio de tioglicolato Brewer (BD Bioxon, Becton Dickinson de México) al 3 % p/v. Después de 72 h, se sacrificaron por inhalación de CO_2 . En la pared abdominal se administraron 10 mL de medio de cultivo modificado Dulbecco's (DMEM) (GIBCO, Gran Isla, Nueva York, Estados Unidos), suplementado con penicilina (50 $\mu\text{g/mL}$), estreptomicina (50 UI/mL) y suero bovino fetal (SBF, GIBCO) al 5 %. Se realizó un masaje abdominal vigoroso, y se extrajo el líquido peritoneal. A continuación se colocó en tubos de polipropileno y se centrifugó durante 6 min (3400 rpm, 20 °C). Los eritrocitos contaminantes se destruyeron con agua desionizada. El extracto celular final se suspendió en DMEM, y se depositó en platos de cultivo de 24 pozos (Becton Dickinson, Oxnard, California, Estados Unidos) a una concentración de 1×10^6 células/mL. Las placas se colocaron en una incubadora de CO_2 al 5 % durante 2 h, 37 °C. Posteriormente, se lavaron con medio fresco adicionado con SBF al 10 %.

2.2.1.2.2. Producción del óxido nítrico

Los macrófagos fijados (más de 95 % de acuerdo con un análisis citomorfológico y tinción de Giemsa en un microscopio de contraste de fases) se resuspendieron en medio DMEM y se manipularon de dos maneras diferentes. En una, 100 μL de un cultivo de macrófagos (0.5×10^6 células/mL) se trataron con LPS (50 μL , 10 $\mu\text{g/mL}$), en ausencia o presencia de sustancias de prueba o de referencia (50 μL). La adición de LPS se efectuó en tiempos diferentes; en el protocolo I se agregó simultáneamente junto con las sustancias a evaluar; y en el protocolo II se adicionó 4 h después de las sustancias. Las placas se incubaron durante 24 h, a 37 °C (Oviedo-Chávez *et al.*, 2004).

El otro procedimiento comprendió el tratamiento preliminar de los macrófagos (0.5×10^6 células/mL) con una disolución de enzima dismutasa de superóxido (SOD), a una dosis de 60 U/mL. Posteriormente, las células se trataron con o sin LPS (10 $\mu\text{g/mL}$), en ausencia o presencia de los triterpenos, o ácido ursólico como referencia. Las placas se incubaron durante 24 h a 37 °C (Oviedo-Chávez *et al.*, 2005).

2.2.1.2.3. Determinación de la concentración del óxido nítrico

La producción del NO en los sobrenadantes de cultivo celular se efectuó mediante la cuantificación de nitritos, la cual se realizó a través de la reacción de Griess (Dirsch *et al.*, 1998). Primero se preparó el reactivo constituido por una mezcla, en una relación 1:1, de una disolución de sulfanilamida al 1 % en ácido fosfórico al 5 %, y dihidroclorhidrato de *N*-(1-naftil)-etilenodiamina al 0.1 % en agua desionizada. A continuación, en una placa de 96 pocillos se mezclaron 100 μL de cada sobrenadante con 100 μL del reactivo de Griess. La placa se mantuvo a temperatura ambiente y sin agitación, durante 10 min. Posteriormente, las absorbancias se determinaron en un lector de placas (Elx 808, BIO-TEK Instruments, Inc), a una longitud de onda (λ) de 515 nm. La concentración de NO (μM) se obtuvo por interpolación de los resultados de densidades ópticas (DO) en una curva estándar de nitrito de sodio; la cual se construyó con concentraciones desde 0.01 hasta 50 μM . Las absorbancias se relacionaron directamente con la concentración del NO.

La inhibición de la cantidad del NO (% *I*) se calculó de acuerdo con la *ecuación 3* En donde *A* corresponde al valor promedio de concentración de NO en el grupo control, y *B* es la cantidad de NO de cada grupo de ensayo.

$$\% I = 100 - [B / A \times 100] \quad (3)$$

2.2.1.2.4. Viabilidad celular

Los efectos de las sustancias de ensayo sobre la viabilidad celular se determinaron mediante el método colorimétrico de MTT (Mossman, 1983). A continuación se describe el procedimiento. Se preparó una disolución de MTT (Sigma) en amortiguador de fosfatos (Sigma) a una concentración final 5 mg/mL. Enseguida, la disolución se adicionó a la placa con las células tratadas (10 μ L/pozo). Posteriormente, la placa se incubó durante 4 h a 37 °C, en atmósfera de CO₂ al 5 %. Los cristales de formazán generados en cada pozo se disolvieron con DMSO (100 μ L). La placa se mantuvo en agitación durante 10 min, posteriormente se midieron las absorbancias a 515 nm y 690 nm de referencia. Los porcentajes de citotoxicidad se calcularon considerando las absorbancias de cada grupo de ensayo con respecto a las del grupo control.

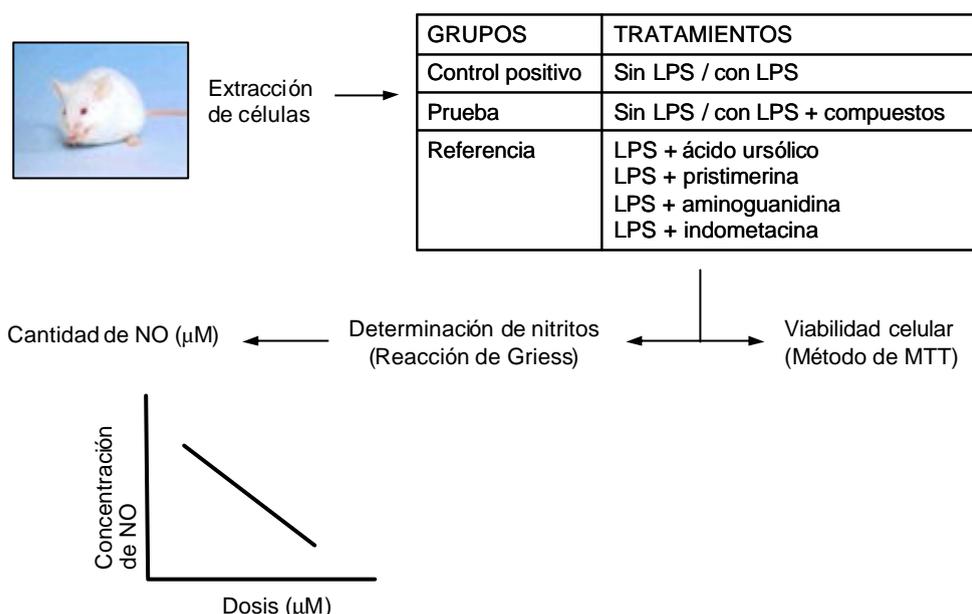


Figura 22
Producción del óxido nítrico en macrófagos peritoneales de ratón

2.2.1.3. Resultados

En el Cuadro 9 se muestran los resultados (media \pm eem) como concentración del NO (μM) y porcentajes de inhibición (%) en macrófagos estimulados por LPS, y tratados con los extractos de *A. adstringens* y los triterpenos 1 y 2. El Cuadro 10 presenta los resultados expresados en concentración del NO (μM , media \pm eem) en células sensibilizadas y no sensibilizadas por LPS, y tratadas con los triterpenos 1, 2, 3, 4, 6, 12 y 16. Los datos de citotoxicidad se muestran como porcentajes.

Cuadro 9

Efectos de los extractos de *A. adstringens* y los triterpenos 1 y 2, en el modelo de producción de óxido nítrico por macrófagos sensibilizados con lipopolisacárido

Grupo	Protocolo I		Protocolo II	
	Concentración de NO (μM)	Viabilidad (%)	Concentración de NO (μM)	Viabilidad (%)
Control	12.58 \pm 0.43	= 95	9.89 \pm 0.35	= 95

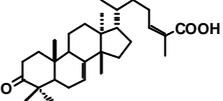
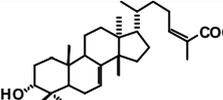
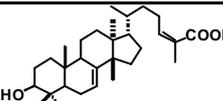
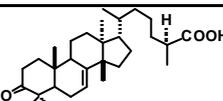
Continuación Cuadro 9...

Extracto acuoso (EA)	5.41 ± 0.89 ** (57.0)	= 95	4.86 ± 1.11 ** (50.9)	= 95
Extracto hexánico (EH)	8.36 ± 0.23 ** (33.6)	= 95	7.42 ± 0.26 (25.0)	= 95
Ácido masticadienoico (1)	1.28 ± 0.13 ** (89.8)	5.5	1.33 ± 0.10 ** (86.6)	0.8
Ácido 3 α -hidroximasticadienólico (2)	2.13 ± 0.19 ** (83.1)	17.4	1.11 ± 0.16 ** (88.8)	7.8
Ácido ursólico	8.16 ± 0.12 ** (35.1)	= 95	8.43 ± 0.20 (14.8)	= 95
Pristimerina	0.77 ± 0.20 ** (100.0)	8.4	0.00 ± 0.10 ** (100.0)	7.7
Aminoguanidina	3.06 ± 0.39 ** (75.7)	= 95	3.75 ± 0.37 ** (62.1)	= 95
Indometacina	12.24 ± 0.20 (2.7)	= 95	12.20 ± 0.12 (0.0)	= 95

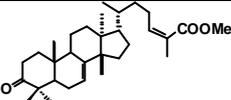
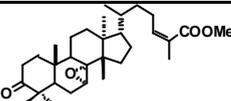
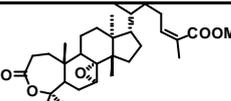
Todos los grupos recibieron LPS (10 $\mu\text{g/mL}$) y las sustancias de ensayo, ambos se agregaron simultáneamente (*Protocolo I*), o el LPS se adicionó 4 h después de las sustancias (*Protocolo II*). Los compuestos **1**, **2**, indometacina y aminoguanidina se evaluaron a la dosis de 100 μM ; ácido ursólico y pristimerina a 10.0 y 0.5 μM , respectivamente; y los extractos a 100 $\mu\text{g/mL}$. Los porcentajes de inhibición de la concentración de NO (*I*, %) se encuentran entre paréntesis. * $P = 0.05$, ** $P = 0.01$ t de Tukey-Kramer respecto con su grupo control.

Cuadro 10

Efectos de los triterpenos **1** y **2**, y algunos derivados en el modelo de producción de óxido nítrico por macrófagos sensibilizados y no sensibilizados con lipopolisacárido

Compuesto	Dosis (μM)	Concentración de NO (μM)	
		Sin LPS	Con LPS
Control	---	25.53 ± 1.21	44.68 ± 1.81
Ácido masticadienoico (1) 	0.001	42.68 ± 2.84 **	54.29 ± 0.56
	10	40.07 ± 4.08 **	51.10 ± 5.65
Ácido 3 α -hidroximasticadienoico (2) 	0.001	39.02 ± 0.27 **	61.82 ± 2.69 **
	10	34.68 ± 2.64 **	47.16 ± 4.93
Ácido masticadienólico (3) 	0.001	36.94 ± 5.71 *	50.82 ± 2.44
	10	36.75 ± 4.01 *	50.25 ± 1.85
Ácido 24-25S-dihidromasticadienoico (4) 	0.001	30.48 ± 3.43	44.19 ± 4.23
	10	26.40 ± 1.80	33.27 ± 3.73

Continuación Cuadro 10 ...

Masticadienoato de metilo (6)		0.001	30.80 ± 0.55	46.31 ± 3.88
		10	37.61 ± 3.65 **	51.18 ± 2.52
3-oxo-7R-8R-epoxi-tirucal-24Z-en-26-ato de metilo (12)		0.001	32.15 ± 0.34 **	48.46 ± 1.14
		10	29.36 ± 2.40	42.99 ± 4.00
Lactona de 4-hidroxi-7R-8R-epoxi-3, 4-seco-tirucal-24Z-en-26-ato de metilo (16)		0.001	36.18 ± 3.09 **	46.05 ± 3.13
		10	35.12 ± 3.13 **	45.71 ± 2.63
Ácido ursólico		0.001	33.78 ± 1.78	48.12 ± 5.77
		10	28.90 ± 2.30	38.00 ± 13.70

La mayoría de los compuestos se evaluaron en el rango de dosis desde 0.001 hasta 10 μM . Sin embargo, en el cuadro se registran únicamente los resultados obtenidos en la primera y última dosis, tomando en cuenta que no existieron diferencias estadísticas entre las 5 dosis de ensayo. * $P = 0.05$, ** $P = 0.01$ *t* de *Dunnnett* y *Tukey-Kramer* de cada tratamiento respecto con el control. La viabilidad superó el 90 % en las células tratadas sólo con las sustancias de ensayo; en tanto, en las células tratadas con LPS y los compuestos **6**, **12**, **16** y ácido ursólico se observó una viabilidad de 80 al 85 %.

2.2.2. Producción del leucotrieno B₄ en leucocitos polimorfonucleares de rata

2.2.2.1. Condiciones generales

Las células se obtuvieron del peritoneo de ratas Wistar hembras de 200-250 g ($n = 3$). Se evaluaron los triterpenos **1** y **2**, y los derivados: masticadienoato de metilo (**6**); 3-oxo-7R-8R-epoxi-tirucal-24Z-en-26-ato de metilo (**12**); y lactona de 4hidroxi-7R-8R-epoxi-3, 4-seco-tirucal-24Z-en-26-ato de metilo (**16**). Los ácidos oleanólico, ursólico, y nordihidroguaiarético (NDGA) fueron los fármacos de referencia.

Se preparó una disolución etanólica de cada compuesto. La concentración final de EtOH en los sobrenadantes del cultivo celular fue menor del 0.1 % y no afectó los ensayos. Se efectuaron las diluciones correspondientes para obtener las dosis deseadas; los compuestos **1**, **2**, **6**, **12** y NDGA se evaluaron en dosis desde 0.31 hasta 31 μM , el ácido oleanólico a 31 μM , el compuesto **16** y ácido ursólico entre 10 y 100 μM .

2.2.2.2. Procedimiento

La obtención del cultivo primario de LPMN, y la producción del LTB₄ se realizaron con base en las técnicas de Houlst *et al.* (1994). El procedimiento general se representó en la figura 23.

2.2.2.2.1. Aislamiento y cultivo primario de leucocitos polimorfonucleares

En los animales se promovió un cuadro de peritonitis aguda (rica en leucocitos) mediante la aplicación de 10 mL de una disolución de almidón (JT Baker) al 6 % p/v. Después de 16 h, los animales se sacrificaron por inhalación de CO₂. En la cavidad peritoneal se inyectaron 50 mL de disolución salina balanceada de Hanks (HBSS), fría, y libre de calcio y magnesio. Después de un masaje abdominal vigoroso, el extracto peritoneal se recolectó en tubos de polipropileno y se centrifugó durante 6 min (3400 rpm, 20 °C). Los eritrocitos se hemolizaron con agua desionizada. Posteriormente, el complejo celular se depositó sobre una fase de polímero (polymorphprep, Axis-Shield Poc AS, Oslo, Noruega), en una proporción 1:1, y se centrifugó durante 35 min a 500 g y 20 °C. Posteriormente, el extracto celular se lavó con HBSS libre de metales para eliminar el polímero.

La cantidad de células vivas se determinó mediante el ensayo de exclusión por azul de tripano. El método se fundamenta en la integridad de la membrana celular de las células vivas, de manera que, no absorben el colorante, y solo las células muertas se matizan de azul. El ensayo consiste en la preparación de una mezcla de suspensión celular en una disolución salina de colorante al 0.4 % p/v, en una proporción 1:10 o 1:100. Posteriormente, 10 µL de esa mezcla se coloca en una cámara de *Neubawery* se cuentan las células translúcidas.

2.2.2.2.2. Producción del leucotrieno B₄

Una suspensión celular en SSF (5 x 10⁶ células/mL) se depositó en tubos de polipropileno y se trató con indometacina (concentración final de 10 µg/mL). Los tubos se incubaron durante 20 min a 4 °C. A continuación el extracto celular se centrifugó a 3400 rpm durante 6 min, a 20 °C. Las células se resuspendieron en 0.5 mL de SSF y se colocaron en placas de cultivo. A continuación se adicionaron

las sustancias (0.5 mL) y se incubaron durante 20 min a 37 °C, con agitación suave. Posteriormente, se agregó el ionóforo de calcio A23187 (concentración final de 1.5 μ M), y se incubaron durante 15 min, a 37 °C, con agitación ligera. Finalmente, los concentrados celulares se centrifugaron durante 10 min, 1500 g, 4 °C. El botón celular se desechó y los sobrenadantes se reservaron a - 70 °C.

2.2.2.3. Determinación de la concentración de l leucotrieno B₄

La cuantificación del LTB₄ en los sobrenadantes de cultivo celular se determinó mediante un ensayo inmunoenzimático comercial (DRG Internacional, Inc). A continuación se describe el procedimiento efectuado (Cuadro 11).

En una placa de 96 pozos se mezclaron los sobrenadantes con las disoluciones del conjugado y del anticuerpo específico del LTB₄. El conjugado consiste en la unión de la enzima fosfatasa alcalina con el LTB₄. Una vez concluida la primera fase de llenado de la placa, todos los pozos mostraron un color verde excepto los pozos NSB, los cuales presentaron una tonalidad azul, los pozos Blanco y TA estaban vacíos. La placa se incubó durante 2 h. Posteriormente, se adicionó el sustrato de la enzima (reactivo de Ellman) y se generó un producto colorido. La placa se reincubó y la reacción se detuvo inmediatamente. Finalmente, las lecturas de DO se determinaron a 405 nm.

Cuadro 11

Procedimiento del ensayo inmunoenzimático para la cuantificación del leucotrieno B₄

	Blanco	Bo	TA	NSB	STD	Muestras
Buffer de ensayo	---	100	---	150	---	---
Sustancias de ensayo	---	---	---	---	100	100
Conjugado	---	50	---	50	50	50
Anticuerpo	---	50	---	---	50	50
Incubación durante 2 h, a 20 °C, con agitación suave						
Lavar 3 veces con disolución de lavado						
Conjugado	---	---	5	---	---	---
Sustrato	200	200	200	200	200	200
Sellar perfectamente la placa, e incubar durante 2 h, a 37 °C, con agitación suave						
Disolución de paro	50	50	50	50	50	50
Leer a 405 nm, con filtro de corrección entre 570 y 590 nm						

Todas las cantidades corresponden a unidades de volumen en microlitros (μL). El grupo «Blanco» es un testigo y constituye la absorbancia de fondo causada por el reactivo de Ellman; el grupo «Bo» corresponde a la unión máxima del complejo anticuerpo-conjugado-sustrato; el grupo «TA» representa la actividad enzimática total del complejo enzima-sustrato; el grupo «NSB» representa la unión no específica causada por el buffer de ensayo y el conjugado; el grupo «STD» representa la curva estándar.

Las lecturas de DO de los grupos cumplieron el orden indicado en el paquete (TA > Bo > NSB > Blanco). Para cada tratamiento se determinaron los promedios de las absorbancias «DO promedio». Los valores de «DO corregida» se calcularon mediante la sustracción del valor de «DO promedio» de NSB a cada valor de «DO promedio».

Los porcentajes de unión enzima-sustrato (% U) se determinaron de acuerdo con la ecuación 4. En donde A correspondió al valor «DO corregida» de Bo (unión máxima de la enzima con el sustrato, 100 %); y B al valor «DO corregida» de cada tratamiento.

$$\% U = B / A \times 100 \quad (4)$$

La concentración del LTB_4 (pg/mL) se determinó por interpolación de los resultados de % U en una curva patrón, la cual se construyó con concentraciones desde 11.7 hasta 3000 pg/mL. La intensidad del color y el % U son directamente proporcionales, y a su vez ambos guardan una relación inversa con la concentración del LTB_4 .

Los porcentajes de producción relativa del LTB_4 (% Pr) se estimaron conforme con la ecuación 5; en donde C correspondió al valor promedio de concentración del LTB_4 en el grupo control, y D al valor de concentración del LTB_4 para cada grupo de ensayo.

$$\% Pr = D / C \times 100 \quad (5)$$

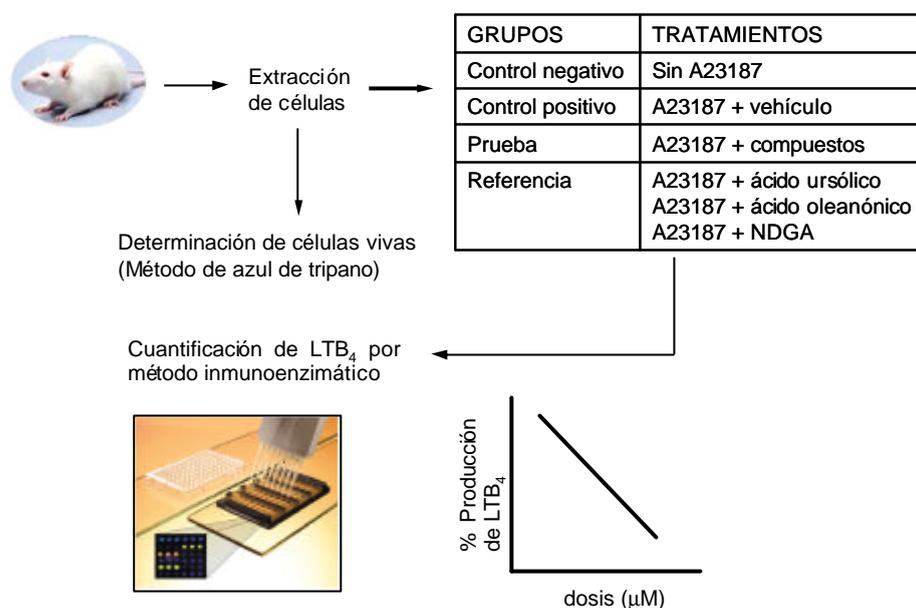


Figura 23

Producción de leucotrieno B₄ en leucocitos polimorfonucleares peritoneales de rata

2.2.2.3. Resultados

En el Cuadro 12 se muestran los resultados (media \pm eem) como concentración del LTB₄ (pg/mL) y porcentajes de producción relativa del LTB₄ (%).

Cuadro 12

Efectos de los triterpenos 1 y 2, y los epoxiderivados 12 y 16 en el modelo de producción del LTB₄ en leucocitos polimorfonucleares estimulados por ionóforo de calcio

Grupo	Dosis (μM)	% Pr
Células - A23187	---	6.37 \pm 0.25 ***
Células + A23187	---	100.00 \pm 1.96
Ácido masticadienoico (1)	3.1	74.51 \pm 19.97
	10	58.88 \pm 18.19
	31	37.73 \pm 10.89 *
Ácido 3 α -hidroximasticadienoico (2)	1.0	89.09 \pm 25.44
	3.1	53.81 \pm 14.01 *
	10	40.65 \pm 9.71 *
	31	19.51 \pm 7.70 ***

Continuación Cuadro 12 ...

3-oxo-7R-8R-epoxi-tirucal-24Z-en-26-ato de metilo (12)	1.0	83.53 ± 38.27
	3.1	70.53 ± 31.35
	10	62.11 ± 8.70 *
	31	47.92 ± 18.98
Lactona de 4-hidroxi-7R-8R-epoxi-3,4-seco-tirucal-24Z-en-26-ato de metilo (16)	50	71.25 ± 41.25
	100	49.40 ± 30.65
Ácido oleanólico	31	11.28 ± 1.57 ***
Ácido ursólico	10	64.63 ± 0.23 ***
	50	52.24 ± 7.26 *
	100	36.95 ± 0.13 ***
Ácido nordihidroguaiarético	0.31	22.96 ± 12.75 **
	3.1	10.27 ± 0.16 ***
	10	4.50 ± 0.76 ***

Los datos se muestran como porcentajes de producción relativa del LTB₄ (% *P*) respecto al grupo control. * *P* = 0.05, ** *P* = 0.01, *** *P* = 0.005 *t* de *student* respecto al grupo control. El masticadienoato de metilo (6) no presentó actividad (datos no mostrados).

2.3. Ensayo de citotoxicidad en líneas celulares de cáncer humano

2.3.1. Condiciones generales

La citotoxicidad en líneas tumorales se determinó de acuerdo con los protocolos establecidos por el Instituto Nacional de Cáncer (INC) de Estados Unidos (Skehan *et al.*, 1990; Monks *et al.*, 1991). Se evaluaron un extracto hexánico de *A. adstringens*, y los ácidos 1 y 2. También se evaluaron los siguientes derivados: ácidos masticadienolico (3), 24-25S-dihidromasticadienoico (4) y 24-25S-dihidromasticadienolico (5); masticadienoato de metilo (6); masticadienolato de metilo (7); 24-25S-dihidromasticadienoato de metilo (8); 3-oxo-7R-8R-epoxi-tirucal-24Z-en-26-ato de metilo (12); lactona de 4hidroxi-7R-8R-epoxi-3, 4-seco-tirucal-24Z-en-26-ato de metilo (16) y el ácido 24-25S-dihidro-3-epimasticadienolico (21). El ensayo se efectuó en las siguientes líneas celulares de cáncer humano: colon (HCT-15), mama (MCF-7), sistema nervioso central (U-251), próstata (PC-3) y leucemia promielocítica (K-562). Las líneas se obtuvieron del INC. La doxorubicina (Sigma) y el ácido ursólico se usaron como fármacos de referencia.

El extracto hexánico, los compuestos 1, 2, 3, 4, 12 y el ácido ursólico se disolvieron en DMSO. La concentración final de DMSO en los cultivos celulares fue menor del 0.1 % y no tuvo efecto en los

ensayos. Las dosis de ensayo fueron desde 1.9 hasta 60 mg/mL para el extracto hexánico; de 1.25 a 100 μ M para los compuestos **1**, **2**, **3**, **4** y **12**; y de 1.6 a 75 μ M para el ácido ursólico. En este caso se realizaron más de tres experimentos, por triplicado.

Los derivados **5**, **6**, **7**, **8**, **16** y **21** se disolvieron en EtOH. La concentración final de EtOH menor del 0.1 % no afectó las células. Los compuestos se evaluaron a una dosis (100 μ M para **5**, **7**, **8** y **21**, y 50 μ M para **6** y **16**). Se efectuó solamente un ensayo por triplicado.

2.3.2. Procedimiento

El procedimiento general se representó en la figura 24. Las células se cultivaron en el medio RPMI-1640 suplementado con 10 % de SBF inactivado, 100 UI/mL de penicilina G, 100 μ g/mL de sulfato de estreptomicina, 0.25 μ g/mL de anfotericina B (GIBCO) y 2 mM de *L*-glutamina (GIBCO). Se conservaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 %.

En una placa de 96 pozos se colocaron 100 μ L de cada línea celular. Las densidades celulares fueron las siguientes: 5 x 10⁴ células/mL de K-562 y MCF-7, 7.5 x 10⁴ células/pozo de U-251 y PC-3, y 10 x 10⁴ células/pozo de HCT-15. A continuación, la placa se incubó durante 24 h a 37 °C en CO₂ al 5 %. Posteriormente, se adicionaron 100 μ L de las sustancias de prueba o fármacos de referencia. La placa se incubó por 48 h en las mismas condiciones. Los grupos testigo contenían solo un volumen equivalente de cada línea celular.

Después, las células se fijaron con una disolución acuosa de ácido tricloroacético al 50 % p/v (50 μ L/pozo). La placa se incubó durante 60 min a 4 °C. Los sobrenadantes se desecharon, la placa se lavó 3 veces con agua destilada desionizada y se dejó secar. Las células se trataron con 100 μ L de sulforrodamina B (SRB, Sigma) al 0.4 % durante 30 min, a temperatura ambiente. Posteriormente, la placa se lavó tres veces con una disolución de ácido acético al 1 %. El colorante se extrajo con una disolución 10 mM de base Tris (Sigma) no amortiguada. Las absorbancias se determinaron en un lector de placas a una λ de 515 nm. La intensidad del color es directamente proporcional al número de células vivas, por lo tanto, a mayor coloración menor porcentaje de inhibición del crecimiento celular.

La citotoxicidad se calculó conforme con la ecuación 6 En donde *A* correspondía al valor de DO de las células sin tratar; y *B*, al valor de DO de las células tratadas con las sustancias de prueba o de referencia.

$$\% IC = 100 - [B / A \times 100] \tag{6}$$

En algunos casos se construyó una curva dosis-respuesta, donde los valores de dosis y % *IC* eran las respectivas variables «x» y «y». La dosis DE₅₀ se determinó a partir de los datos significativos de las curvas que mostraron un efecto dependiente de la dosis y un valor de *IC* mayor del 50 % en la última dosis de ensayo.

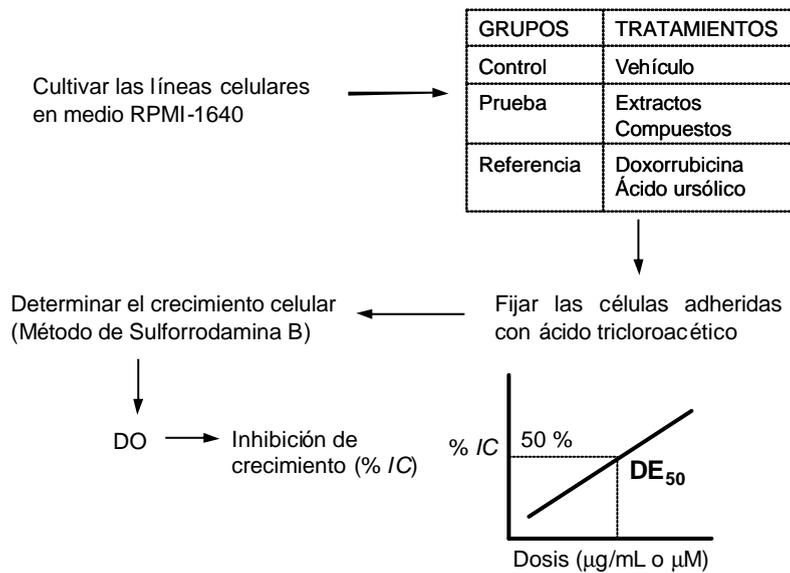
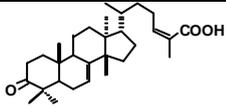
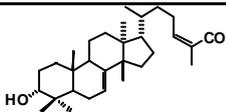
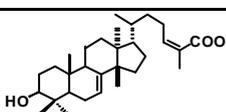
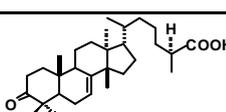
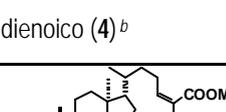


Figura 24
Ensayo de citotoxicidad en líneas celulares de cáncer humano

2.3.3. Resultados

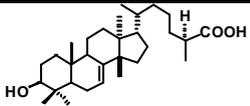
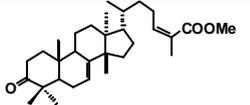
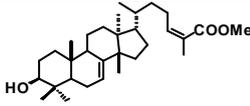
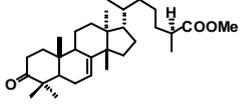
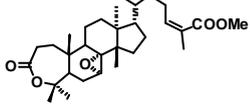
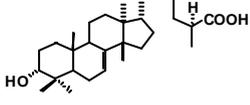
En el Cuadro 13 se presentan los resultados (media \pm eem) de DE_{50} del extracto hexánico de *A. adstringens* y de los triterpenos **1**, **2**, **3**, **4** y **12**. En tanto, los datos de % IC de los derivados **5**, **6**, **7**, **8**, **16** y **21** se muestran en el Cuadro 14.

Cuadro 13
Efectos citotóxicos del extracto hexánico de *A. adstringens* y algunos triterpenos en líneas tumorales

Grupo	DE_{50} (mM)				
	HCT-15 (Colon)	MCF-7 (Mama)	U251 (SNC)	PC-3 (Próstata)	K562 (Leucemia)
Extracto hexánico (EH) ^a	13.7 \pm 1.0	7.9 \pm 1.9	35.3 \pm 1.5	38.3 \pm 2.0	8.4 \pm 0.1
 Ácido masticadienoico (1) ^b	42.1 \pm 6.4	18.4 \pm 1.0	20.4 \pm 2.2	27.4 \pm 3.9	36.8 \pm 9.4
 Ácido 3-epimasticadienoico (2) ^b	27.6 \pm 6.0	31.5 \pm 6.8 *	31.6 \pm 5.4 *	29.2 \pm 0.3	24.2 \pm 0.7 *
 Ácido masticadienoico (3) ^b	20.2 \pm 8.4 *	28.0 \pm 14.0	29.1 \pm 6.8	32.6 \pm 4.0	24.9 \pm 6.3
 Ácido 24-25S-dihidromasticadienoico (4) ^b	22.9 \pm 5.2 *	26.0 \pm 2.9 *	48.2 \pm 13.5 *	29.2 \pm 2.9	33.1 \pm 5.6
 3-oxo-7R-8R-epoxi-tirucal-24Z-en-26-ato de metilo (12) ^b	55.6 \pm 4.7	11.2 \pm 2.1 *	72.9 \pm 0.4 **	ND	49.9 \pm 7.6
Ácido ursólico ^b	17.5 \pm 6.8	17.5 \pm 1.1	15.1 \pm 4.9	30.5 \pm 0.5	17.2 \pm 2.3
Doxorrubicina ^c	0.23 \pm 0.01	0.14 \pm 0.01	0.09 \pm 0.02	0.32 \pm 0.02	0.28 \pm 0.01

Los resultados se muestran como dosis efectiva 50 (DE₅₀), expresados en valores de media \pm eem; n = 3-5. * $P = 0.05$, ** $P = 0.01$ *t* de *Dunnnett* respecto de los datos del triterpeno **1**. ^aDosis efectiva en $\mu\text{g/mL}$; ^b DE₅₀ en μM ; ^c Datos tomados de Martínez *et al*, 2002. No determinado (ND).

Cuadro 14
Efectos citotóxicos de algunos derivados en líneas tumorales

Grupo	IC (%)				
	HCT-15 (colon)	MCF7 (mama)	U251 (SNC)	PC3 (próstata)	K562 (leucemia)
 Ácido 24-25S-dihidro-masticadienolico (5) ^b	65.9	69.5	55.8	70.4	39.4
 Masticadienoato de metilo (6) ^a	0.0	< 10.0	43.5	18.0	< 10.0
 Masticadienolato de metilo (7) ^b	49.8	100.0	96.5	60.2	79.5
 24-25S-dihidromasticadienoato de metilo (8) ^b	0.0	11.3	100.0	36.5	< 10.0
 Lactona de 4-hidroxi-7R-8R-epoxi-3,4-seco-tirucal-24Z-en-26-ato de metilo (16) ^a	12.8	0.0	53.2	23.8	27.8
 Ácido 24-25S-dihidro-3-epimasticadienolico (21) ^b	100.0	100.0	100.0	100.0	91.0

Los resultados se muestran como inhibición de crecimiento celular (% IC); n = 1. ^a dosis 50 μM ; ^b dosis 100 μM .

3. ESTUDIO DE RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD

3.1. Análisis comparativo de los potenciales de interacción

3.1.1. Condiciones generales

Los compuestos **2, 3, 4, 6, 7, 9, 12, 14, 16, 21, 24, 25, 26, 27** y **28** evaluados en el modelo de edema inducido por TPA, se seleccionaron para el análisis de CoMFA. Se consideraron los valores de logaritmos del inverso de la DE₅₀ contenidos en el Cuadro 6.

3.1.2. Procedimiento

El CoMFA se realizó mediante el programa de modelado molecular Sybyl 6.8 en una estación de trabajo OCTANE 2.0 Silicon Graphics. Se dibujaron las estructuras de las 15 moléculas seleccionadas. Posteriormente, se generaron las conformaciones de mínima energía mediante un proceso de optimización de la mecánica cuántica, que considera los campos de fuerza estándar de Tripos. Las optimizaciones adicionales se efectuaron mediante el modelo Hamiltoniano AM1 de MOPAC (Molecular Orbital PACKage).

Tomando como base el esqueleto tetracíclico del ácido 24-25 S-dihidromasticadienólico (**5**) se orientó la superposición de cada una de las moléculas y se produjo un alineamiento, el cual, como lo supone CoMFA correspondería con la orientación espacial relativa en el sitio receptor.

El programa coloca el complejo de moléculas superpuestas dentro de una caja tridimensional (de 2 Å por cuadro), y determina las interacciones óptimas entre las moléculas y el receptor. Las propiedades de unión entre las moléculas alineadas y la sonda de prueba (con propiedades de carbono sp^3 y carga +1) se calcularon mediante las energías de interacción molecular MIP (*Molecular Interaction Potential*) estéricas (según el potencial Lennard-Jones) y electrostáticas (según el potencial coulombico). La distribución de valores de MIP alrededor de una molécula se denomina potencial de interacción molecular MIF (*Molecular Interaction Field*).

El sistema de variables MIF se correlacionó con los valores de actividad biológica, y la matriz de datos se resolvió mediante un análisis estadístico multivariable, conocido como PLS (*Partial Least Squares* mínimos cuadrados parciales). El método reduce la cantidad de variables y las reemplaza por un número menor de nuevos valores ortogonales llamados componentes principales. Posteriormente, los datos se analizaron por el método de validación cruzada (*cross-validation*) mediante la exclusión de un dato (*leave one out*). Ese análisis permite comprobar la predecibilidad del modelo generado, eliminar el riesgo de correlaciones casuales y disminuir la pérdida de información. De igual manera, los componentes se sometieron a un método de no validación (*non validated*) para conocer la linealidad del sistema. El número de componentes principales se representa mediante mapas de contornos.

3.1.3. Resultados

Durante el análisis se generaron los valores de descriptores espaciales y estructurales de las moléculas en estudio. Se incluyeron las energías de los orbitales moleculares más alto ocupado (HOMO) y más bajo no ocupado (LUMO) en eV, la electronegatividad según la escala de Pauling, la polarizabilidad, el volumen molecular en Å³, la ovalidad, el logaritmo del coeficiente de partición *n*-octanol/agua ($\log P$) calculado por el método de Ghose-Crippen, y el dipolo molecular en debye. Los resultados se encuentran en el Cuadro 15.

Un análisis de regresión lineal múltiple permitió obtener la matriz de correlación (Cuadro 16) de los logaritmos del inverso de DE₅₀ (Log 1/DE₅₀ en M/oreja) y los parámetros fisicoquímicos contenidos en el Cuadro 15. El Cuadro 17 muestra los resultados de predecibilidad y linealidad del modelo obtenidos mediante los respectivos métodos de validación cruzada y no validación. La figura 25 presenta los mapas de contornos de interacción estérica y electrostática del compuesto activo 3-oxo-7*R*-8*R*-epoxitirucal-24*Z*-en-26-ato de metilo (**12**).

Cuadro 15
Descriptores fisicoquímicos de 15 moléculas analizadas mediante el método CoMFA

Compuesto	A	B	C	D	E	F	G	H	I
2	5.76	-9.135	-0.023	4.58	41.754	485.96	1.751	7.39	2.012
3	5.79	-9.072	-0.042	4.56	41.925	485.97	1.747	7.39	3.202
4	5.87	-9.284	1.011	4.14	39.772	487.23	1.774	8.12	3.594
6	6.56	-9.379	0.019	4.68	42.232	498.81	1.788	8.15	0.946
7	6.47	-9.228	0.048	4.59	42.902	504.18	1.789	7.66	2.488
9	5.75	-9.130	1.189	3.97	41.613	510.35	1.804	7.89	2.578
12	6.82	-10.045	0.009	5.02	41.677	506.16	1.777	7.23	1.047
14	5.76	-9.247	-0.012	4.63	44.637	524.54	1.817	7.62	3.360
16	6.81	-10.076	0.010	5.03	42.288	514.31	1.762	6.07	6.330
21	6.40	-9.072	1.086	3.99	40.409	492.54	1.772	7.63	1.339
24	6.44	-8.782	0.164	4.31	44.987	521.50	1.815	7.84	2.109
25	5.77	-8.838	1.255	3.79	43.390	528.04	1.839	8.08	0.890
26	6.83	-10.039	-0.014	5.03	40.714	493.72	1.745	6.48	4.570
27	6.42	-9.998	0.070	4.96	42.073	511.33	1.771	6.74	3.810
28	5.86	-9.220	-0.020	4.62	44.705	524.52	1.815	7.62	1.041

A, Log $1/DE_{50}$ (M/oreja); B, Energía de HOMO (eV); C, Energía de LUMO (eV); D, Electronegatividad (Escala de Pauling); E, Polarizabilidad; F, Volumen molecular (\AA^3); G, Ovalidad; H, Log P (Ghose-Crippen); I, Dipolo molecular (en debye).

Ácido 3-epimasticadienólico (2); ácido masticadienólico (3); ácido 24-25S-dihidromasticadienoico (4); masticadienoato de metilo (6); masticadienolato de metilo (7); 24-25S-dihidromasticadienolato de metilo (9); 3-oxo-7R-8R-epoxi-tirucal-24Z-en-26-ato de metilo (12); 3S-hidroxi-7R-8R-epoxi-tirucal-24Z-en-26-ato de metilo (14); lactona de 4-hidroxi-7R-8R-epoxi-3, 4-seco-tirucal-24Z-en-26-ato de metilo (16); ácido 24-25-dihidro-3-epimasticadienólico (21); 3-epiisomasticadienolato de etilo (24); 24-25-dihidro-3-epimasticadienolato de etilo (25); ácido 3R-hidroxi-7R-8R-epoxi-tirucal-24Z-en-26-ico (26); 3R-hidroxi-7R-8R-epoxi-tirucal-24Z-en-26-ato de metilo (27); ácido 3 α -acetoxi-tirucal-7E, 24E-dien-26-ico (28).

Cuadro 16

Matriz de correlación r de los logaritmos del inverso de las dosis efectivas obtenidas en el modelo de edema inducido por TPA, y los descriptores fisicoquímicos

	A								
A	1	B							
B	-0.522	1	C						
C	-0.387	0.473	1	D					
D	0.524	-0.845	-0.870	1	E				
E	-0.078	0.329	-0.293	-0.008	1	F			
F	-0.007	0.030	0.078	-0.066	0.766	1	G		
G	-0.260	0.521	0.450	-0.565	0.655	0.788	1	H	
H	-0.435	0.815	0.529	-0.775	0.148	-0.007	0.599	1	I
I	0.278	-0.546	-0.227	0.443	-0.309	-0.162	-0.563	-0.737	1

De A a I corresponden con lo indicado en el Cuadro 15.

Cuadro 17
Predecibilidad y linealidad del sistema de datos analizados mediante el método CoMFA

Factores	Predecibilidad		Linealidad	
	<i>Coficiente</i>	<i>Contribución</i>	<i>Coficiente</i>	<i>Contribución</i>
<i>Estéricos</i>	0.532	0.285	0.542	0.299
<i>Electrostráticos</i>	1.334	0.715	1.271	0.701
<i>Resumen</i>	Número de variables = 1350 Error estándar de predicciones = 0.517 Número óptimo de componentes = 1 R cuadrada (Q^2) = - 0.244		Número de variables = 1350 Error estándar del estimado = 0.275 Valores de F ($n_1 = 1, n_2 = 11$) = 20.208 R cuadrada (r^2) = 0.648, $r = 0.82$ Probabilidad de $r^2 = 0.001$	

Se muestran los resultados de predecibilidad y linealidad de CoMFA obtenidos mediante los métodos de validación cruzada y no validación. Se analizaron los compuestos **2, 3, 4, 6, 7, 9, 12, 14, 16, 21, 24, 25, 26, 27 y 28**.

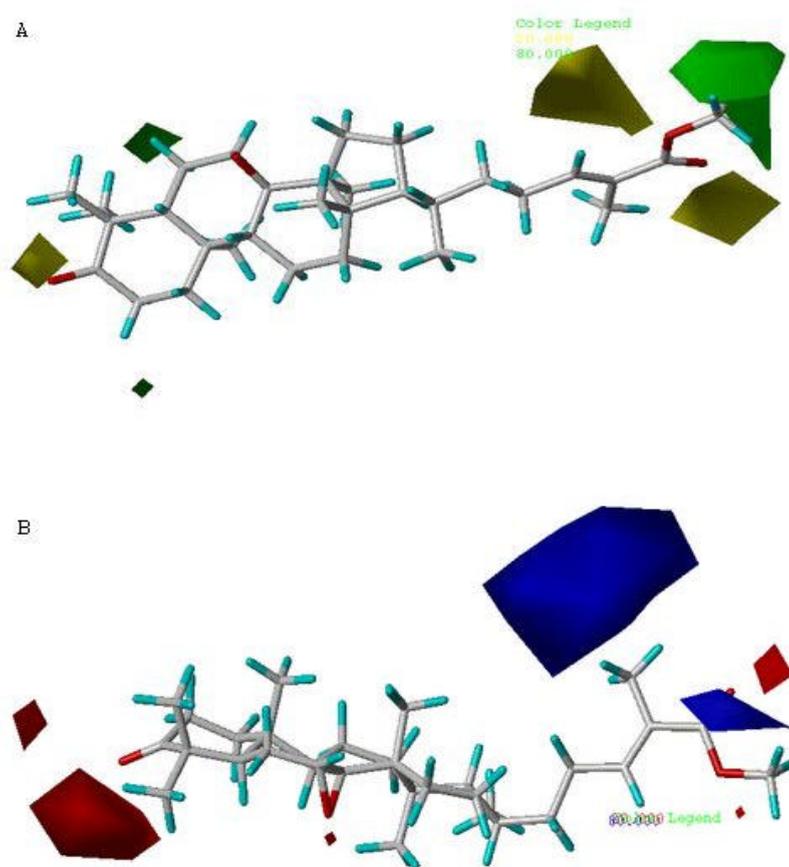


Figura 25

Mapas de los contornos de interacciones estérica (A) y electrostática (B) del compuesto 12

Los campos estéricos que favorecen y no favorecen la actividad están representados como poliedros verdes y amarillos, respectivamente. Los campos de carga electropositiva y electronegativa que contribuyen con la actividad corresponden con los poliedros azul y rojo.

V. DISCUSIÓN

1. REACCIONES QUÍMICAS

Tomando en cuenta los datos de actividad biológica de **1** y **2** en los modelos de edema inducidos por TPA y carragenina, ambos se establecieron como cabezas de serie y se obtuvieron 26 derivados (anexos A y B, págs. 153-161).

En la literatura se señalan varias modificaciones estructurales de triterpenos antiinflamatorios por métodos químicos, principalmente de esqueletos de tipo ursano y oleanano (Mahato y Sen, 1997; Akihisa y Yasukawa, 2001; Patocka, 2003; Connolly y Hill, 2005). Por otro lado, se ha informado de la obtención de algunos derivados de los ácidos **1** y **2** y su relación con la inhibición de la PLA₂ (Jain *et al.*, 1995). A pesar de estos antecedentes, no existían estudios de modificaciones sistemáticas de los grupos funcionales presentes en **1** y **2** y su relación con la actividad antiinflamatoria. Por lo anterior, se decidió evaluar las propiedades antiinflamatorias de varios derivados obtenidos mediante modificaciones químicas en la posición C-3, la doble ligadura del anillo B y el ácido carboxílico insaturado de la cadena lateral (fig. 26).

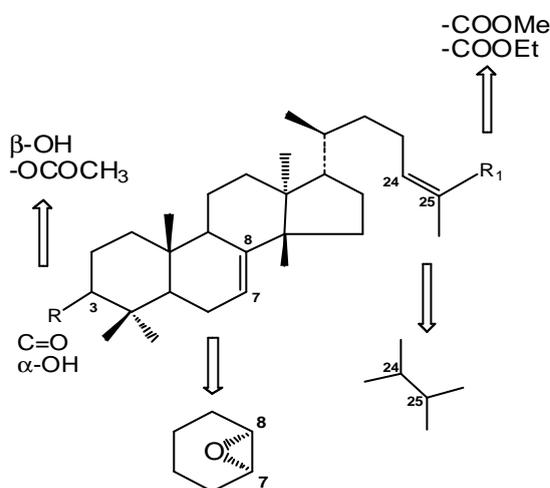


Figura 26

Esquema general de modificaciones estructurales a los ácidos **1** y **2**

1.1. Reducción con NaBH₄

La reacción de reducción del grupo carbonilo en **1** produjo el alcohol esperado (**3**) (fig. 27). El análisis de los datos espectroscópicos y espectrométricos de **3** evidenciaron que el carbonilo en C-3 en el ácido **1**, fue el único grupo funcional que se modificó durante la reacción. Más aún, la comparación de los datos de RMN de ^1H y ^{13}C de **3** asignados a la posición C-3 (δ 3.2 y 79.0 ppm, respectivamente), con aquellos del ácido 3α -hidroximasticadienoico (**2**) (δ 3.4 y 75.2 ppm) indicaron claramente que el alcohol formado en C-3 presentaba una orientación β .

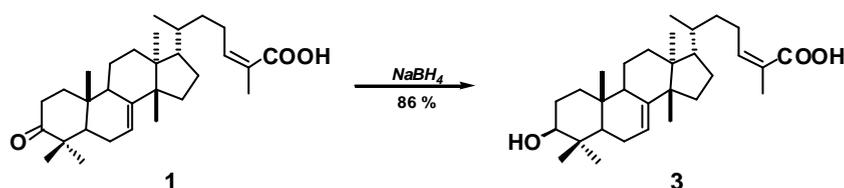


Figura 27
Obtención del ácido masticadienólico (**3**)

Se sabe que el mecanismo de reducción de un carbonilo es dirigido por cuestiones estéricas, de manera que, en este caso la presencia de los grupos metilos en C-4 y C-10 orientan la aproximación del agente reductor sobre la cara *si* del plano del grupo carbonilo en **1**, y resulta la inserción del hidruro (fig. 28).

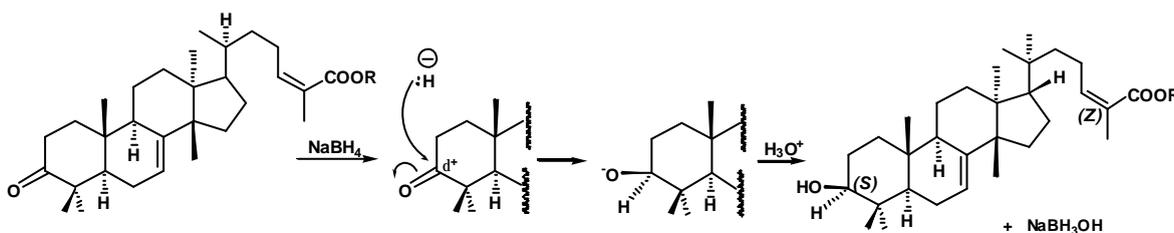


Figura 28
Mecanismo propuesto para la formación de 3b-hidroxiderivados

Un dato adicional que ayuda a explicar la formación preferencial de un alcohol con orientación β , sobre uno con orientación α , lo constituyen los calores de formación de los epímeros **2** y **3**. Mediante el programa de mecánica molecular MOPAC se determinaron los calores de formación de **2** (-185.58769 Kcal/mol) y **3** (-186.38488 Kcal/mol). Estos resultados indican que el isómero β es más estable.

Los alcoholes **5**, **7** y **11** provenían de la reacción de reducción del grupo carbonilo en C-3 con NaBH_4 , de los respectivos compuestos **4**, **6** y **10** (fig. 29). Considerando que los datos espectroscópicos de estos productos eran similares a los del ácido masticadienólico (**3**), se propuso que también presentaban una orientación β . Esta hipótesis se confirmó mediante un análisis de difracción de rayos X del derivado **5** (fig. 15).

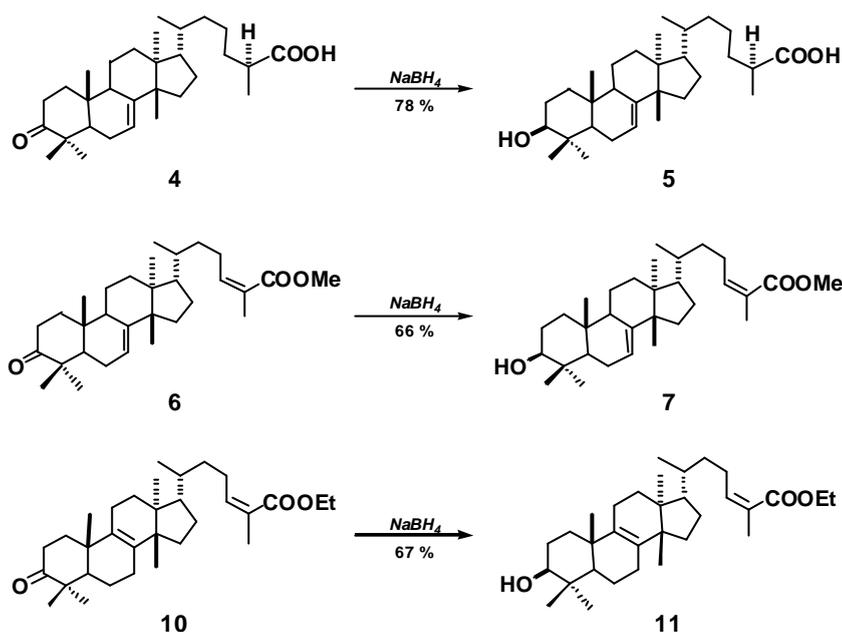


Figura 29
Obtención de 3 β -hidroxiderivados

1.2. Hidrogenación catalítica

Los productos saturados **4**, **8** y **21** se generaron a partir de la reacción de hidrogenación de **1**, **6** y **2** respectivamente, mediante hidrógeno molecular y un catalizador metálico (fig. 30). Los datos espectroscópicos de **4**, **8** y **21** evidenciaron la hidrogenación selectiva del doble enlace en C-24 / C-25. Así, en el espectro de RMN ^1H de los productos saturados se observó la señal del hidrógeno vinílico H-7 en δ 5.3 ppm, y no se observó la señal en aproximadamente δ 6.0 ppm asignada al H24. La hidrogenación selectiva del doble enlace de la cadena lateral, y no del ubicado en C-7/C-8 del núcleo terpenoide, posiblemente se atribuye a que éste último se encuentra impedido estéricamente.

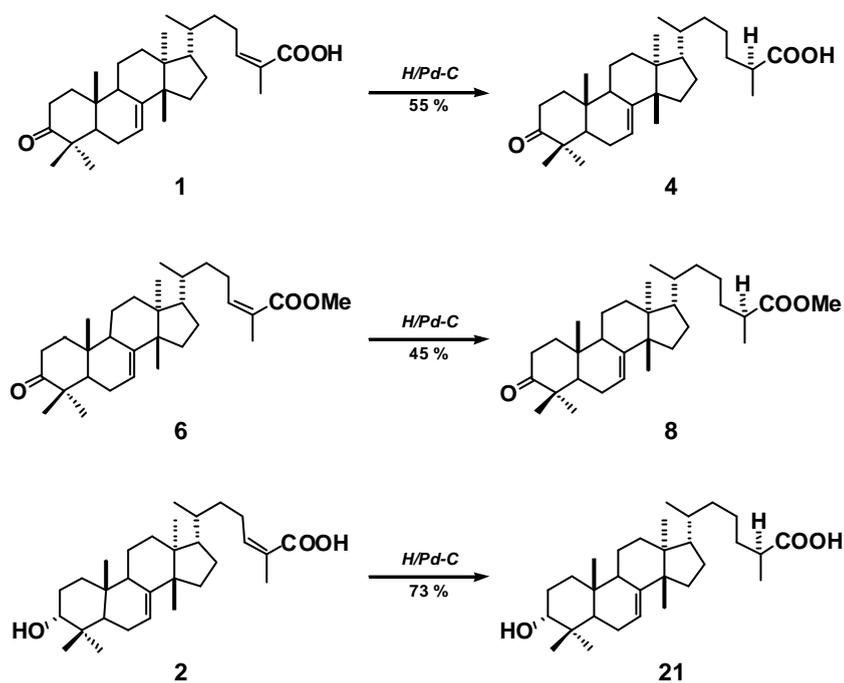


Figura 30
Obtención de dihidroderivados

La reducción del carbonilo en G3 con NaBH_4 del dihidroderivado **4** resultó en la obtención de **5**. El análisis cristalográfico de rayos X de **5** permitió determinar la estereoquímica *S* en C-25, así como la orientación β del grupo hidroxilo en G3 (fig. 15). Puesto que la obtención de **5** implicó únicamente la reducción del grupo carbonilo en **4**, se dedujo que éste presentaba la misma estereoquímica en C-25. Por otro lado, tomando en cuenta que la obtención de **8** y **21** a partir de **6** y **2** comprendía solo la reacción de hidrogenación, se propuso que **8** y **21** también presentaban la estereoquímica *S* en C-25.

Considerando que el mecanismo de hidrogenación involucra la acción del catalizador sobre la cara menos impedida del doble enlace y además obedece una estereoquímica *sin*; en este caso, el catalizador accede por el lado contrario al grupo carboxilo, de manera que los hidrógenos se adicionan sobre la cara *si* del doble enlace y resulta un centro *S* en C-25.

1.3. Esterificación

Los ésteres metílicos **6**, **7**, **9**, **22** y **23** se obtuvieron a partir de los ácidos correspondientes **1**, **3**, **5**, **2** y **21** por tratamiento con una disolución etérea de diazometano (fig. 31). En general, la reacción es muy flexible y se obtienen productos con rendimientos razonables. El mecanismo de reacción se explica por el carácter nucleofílico de uno de los átomos de oxígeno del grupo carboxilo, quien ataca al grupo metilo del diazometano y tras la pérdida de la molécula de N_2 se origina el residuo de éster.

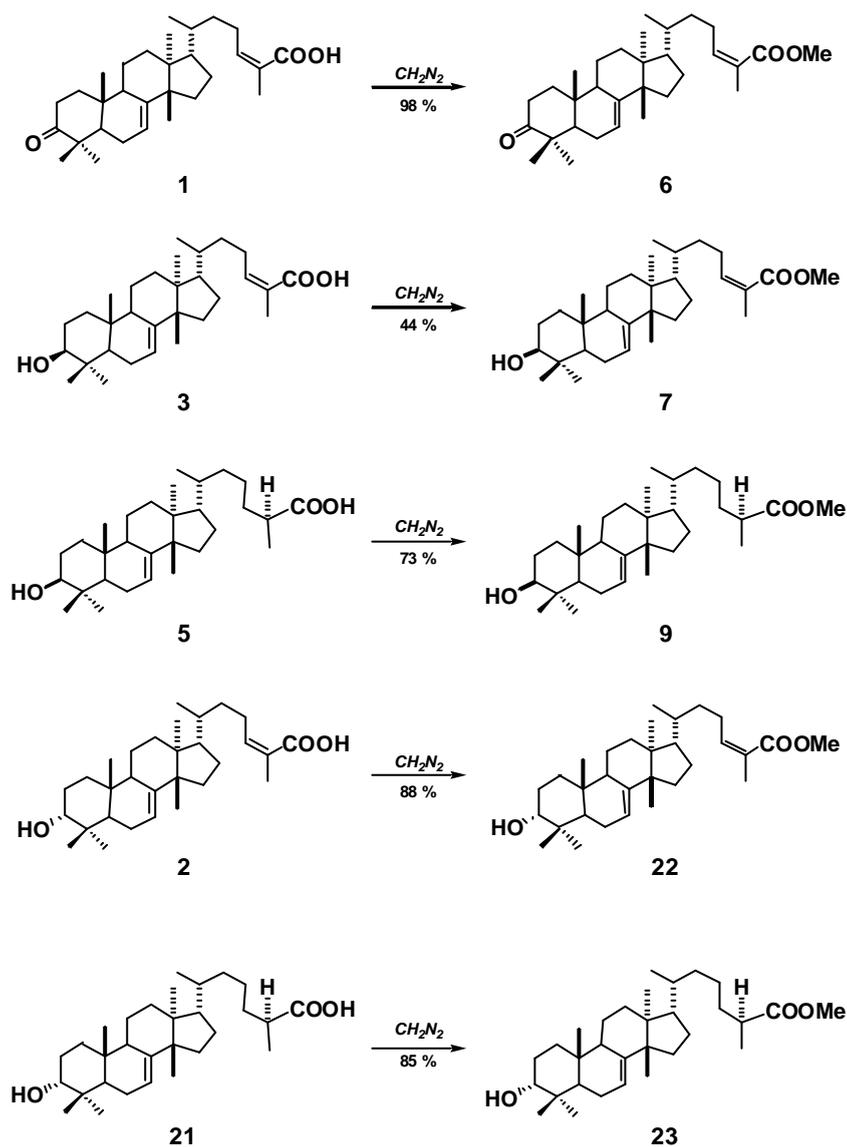


Figura 31
Obtención de ésteres metílicos

Por su parte, los derivados ésteres etílicos **10**, **24** y **25** resultaron de la reacción de los ácidos **1**, **2** y **21** respectivamente, en presencia de etanol y un ácido como catalizador (fig. 32). Los moderados rendimientos de reacción se explican por la reversibilidad de los pasos implicados, es decir, la formación del éster se favorece por el exceso de etanol y el agua resultante interviene en la hidrólisis del éster. Sin embargo, los rendimientos no mejoraron con la utilización de un agente desecante.

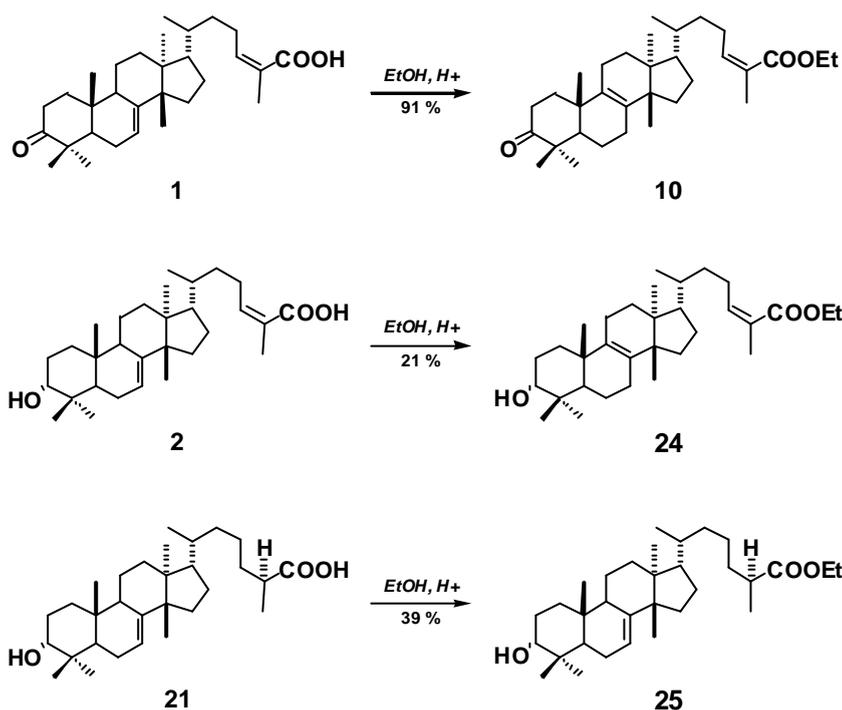


Figura 32
Obtención de ésteres etílicos

Además de la formación de los ésteres etílicos en los compuestos **10** y **24**, se observó la isomerización del doble enlace original en C-7 / C-8. Esta reacción se evidenció mediante el análisis de los datos espectroscópicos de RMN de ^1H / ^{13}C , en el cual los compuestos **10**, **11** y **24** no presentaban las señales del carbono vinílico en C-7 (δ 5.3 / 117.8 ppm). Sin embargo, el espectro de RMN ^{13}C de **24** mostraba dos nuevas señales en δ 134.6 y 133.3 ppm que correspondían a carbonos vinílicos sin interacción con hidrógeno. También el compuesto **11** presentó señales semejantes en δ 139.4 y 134.1 ppm para dos carbonos cuaternarios vinílicos. Era evidente que el enlace doble original no se conservaba en C-7 / C-8, probablemente migraba hacia C-8 / C-9.

Para resolver el hecho que únicamente era posible la isomerización del doble enlace endocíclico, se optó por usar un compuesto esterificado, y no un ácido libre. Así el éster metílico **6** se trató con etanol anhidro en medio ácido. La espectroscopía del producto de reacción indicó que se trataba de una mezcla de dos compuestos, en una relación 1:1. Después de un minucioso análisis los productos se propusieron como isomastadienoato de metilo y 3-oxodamara-13-17*E*, 24*Z*-dien-26-ato de metilo. Por lo anterior, se formuló que en las condiciones de reacción, la doble ligadura endocíclica se isomerizaba, y esto podía ocurrir hacia dos sitios diferentes.

La formación del residuo éster sucede mediante la protonación del átomo de oxígeno en el ácido carboxílico, y la pérdida posterior de una molécula de agua (fig. 33). El mecanismo de isomerización del doble enlace endocíclico se propuso de la siguiente manera. La protonación de la doble ligadura origina un carbocatión terciario en C-8, cuya carga se restituye por la donación de un par electrónico de C-9, y genera la doble ligadura entre los anillos B y C. Hasta aquí, se explica la formación de los compuestos **10**, **11** y **24**. Sin embargo, el mismo carbocatión en C-8 puede compensarse por migraciones de tipo 1,2; primero el metilo en C-14 se desplaza hacia C-8, el nuevo carbocatión en C-14 se transpone hacia C-13 tras la migración del metilo. Finalmente, la carga del carbocatión se compensa por un par electrónico disponible después de la salida de un hidrógeno del C-17. Así se forma un enlace doble en los carbonos 13 y 17. Se propone que la configuración de la nueva ligadura podría ser *E*, debido a la salida del hidrógeno pro*R*. Lo anterior puede explicar la formación del producto adicional de la reacción con el derivado **6**.

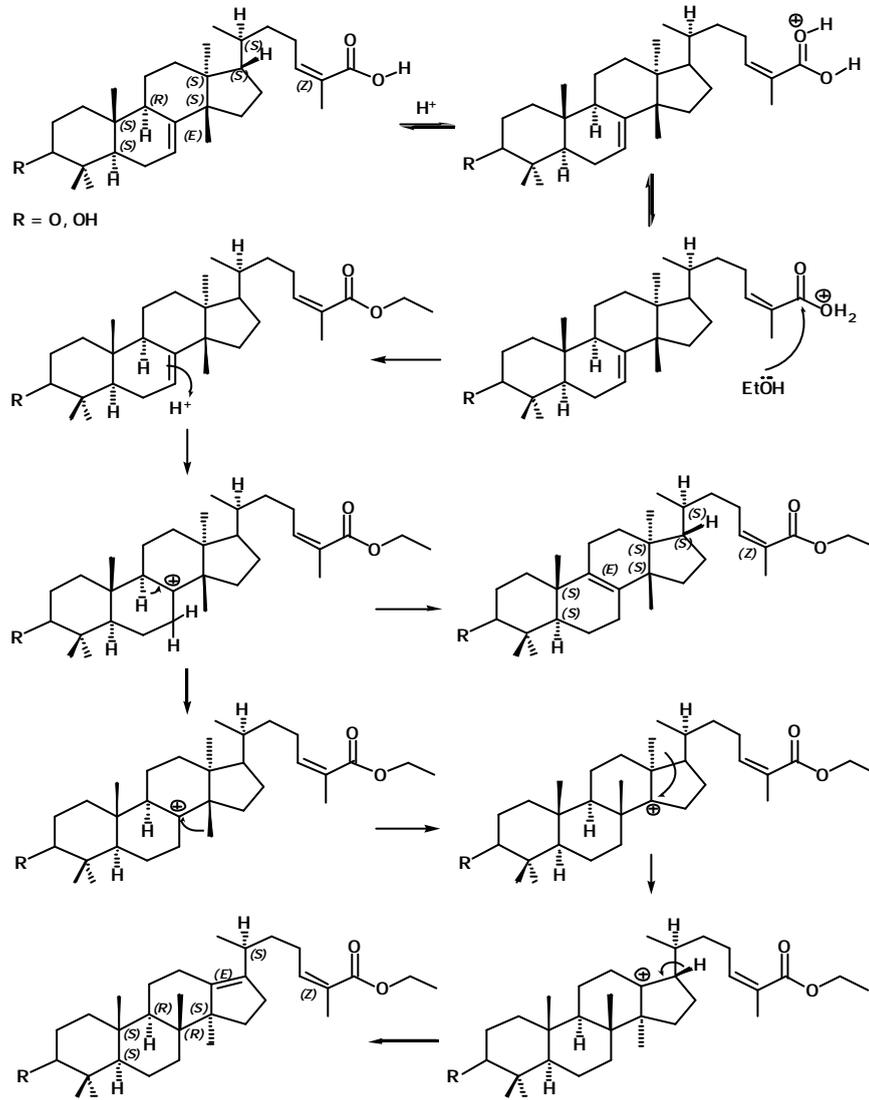


Figura 33

Mecanismo propuesto para la formación de ésteres etílicos

1.4. Epoxidación

Continuando con la obtención de derivados, el interés se centró en la doble ligadura endocíclica Δ^{7-8} . Evidentemente, una modificación en este sitio afectaría exclusivamente el núcleo triterpenoide. Con el fin de conferirle diferentes propiedades electrónicas, se planteó la formación de un grupo epóxido. Los

derivados epoxidados **12**, **15** y **26** se prepararon a partir de los respectivos alquenos **6**, **1** y **2** en tratamiento con ácido *m*-CPBA (fig. 34).

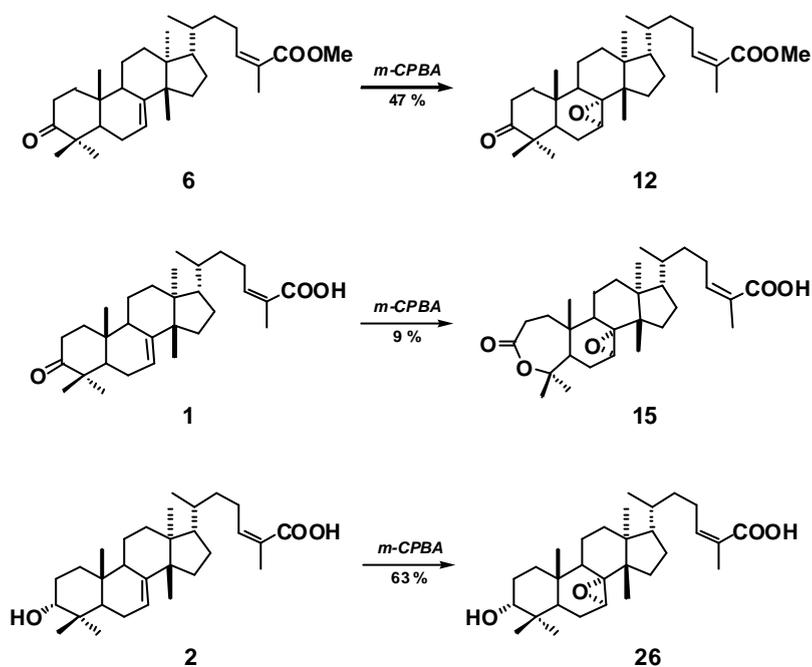


Figura 34

Obtención de epoxi derivados con *m*-CPBA

Con ácido peroxiacético ($\text{CH}_3\text{CO}_3\text{H}$) como agente oxidante, se obtuvieron los derivados **13**, **14**, **16** y **27** a partir de los compuestos **1**, **7**, **6** y **22**, respectivamente (fig. 35).

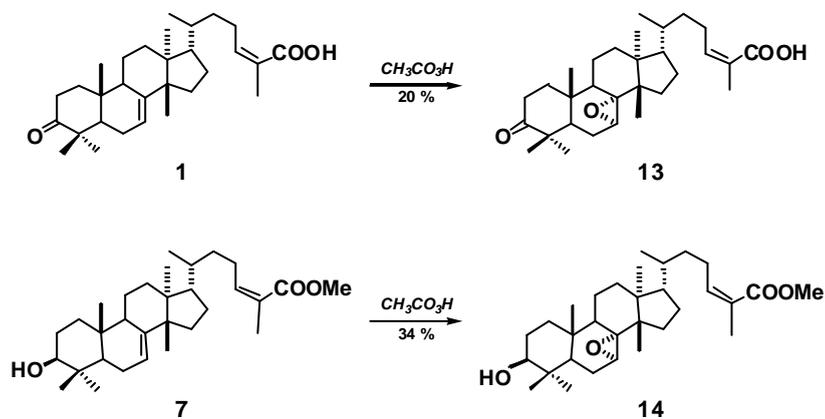
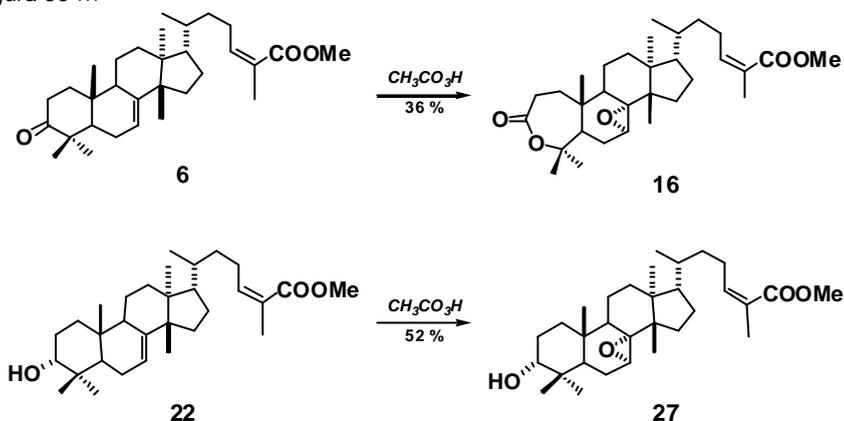


Figura 35

Obtención de epoxi derivados con $\text{CH}_3\text{CO}_3\text{H}$

Continuación figura 35 ...



Sin embargo, los rendimientos de obtención fueron regulares con los dos reactivos. Lo anterior posiblemente se explica por la generación de ácido benzoico o ácido acético (según el caso) en el seno de la reacción; la acidez favorece la apertura del grupo epóxido. Para neutralizar el pH ácido se efectuaron algunos experimentos en condiciones neutras, y la purificación se realizó mediante cromatografía en gel de sílice no activado. No obstante, los rendimientos no mejoraron.

La oxidación selectiva del doble enlace C-7 / C-8 se determinó mediante el análisis espectroscópico de resonancia de los productos. Los espectros mostraron la señal del hidrógeno vinílico en C-24 en aproximadamente δ 6.0 ppm, y no se encontró la señal en δ 5.3 ppm perteneciente al hidrógeno en C-7 de las moléculas precursoras. La selectividad del doble enlace endocíclico se atribuye a la incapacidad de acción de los reactivos utilizados sobre una doble ligadura conjugada con un ácido carboxílico.

Las formas cristalinas de **15** y **16** se analizaron mediante difracción de rayos X (figuras 16 y 17). Las estructuras cristalográficas revelaron la posición α del grupo epóxido. Como se sabe, los peroxiacidos transfieren oxígeno a la doble ligadura a través de un mecanismo en un solo paso, sin intermediarios y con una estereoquímica *syn* (fig. 36). En este caso, el átomo de oxígeno más lejano al grupo carbonilo del perácido accede por la cara inferior del enlace doble endocíclico. La reacción de epoxidación obedece un régimen estérico, así, la presencia del grupo metilo en C-14 impide el acceso del perácido por la cara superior del doble enlace.

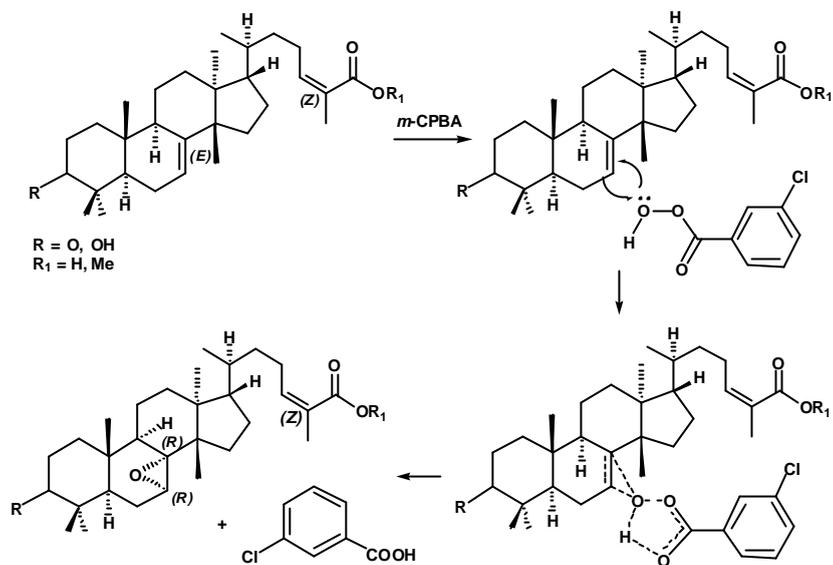


Figura 36
Mecanismo de epoxidación

La lactona de 7 miembros en el anillo A en **16** se explica por una transposición tipo Baeyer-Villiger a partir del carbonilo C-3 de **6** (fig. 37).

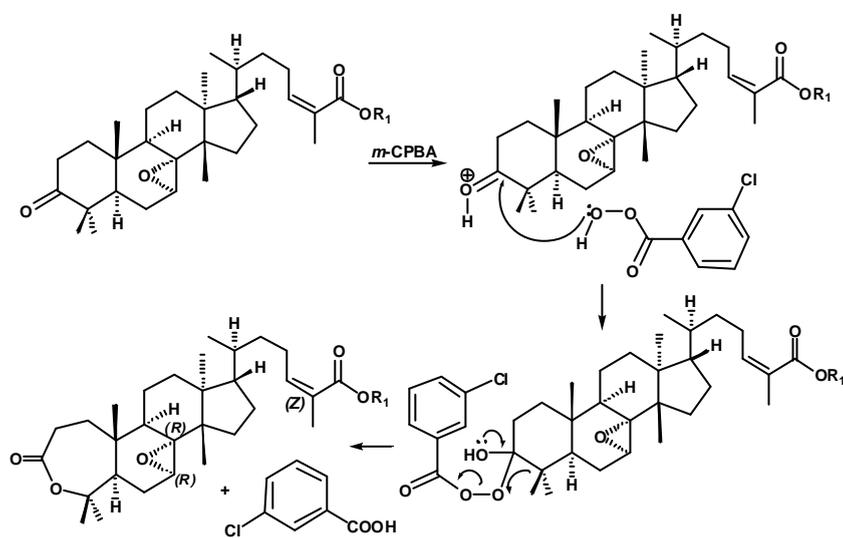


Figura 37
Transposición de tipo Baeyer-Villiger

Por otro lado, los datos espectroscópicos de RMN 1H adquiridos en $CDCl_3$ evidenciaron la inestabilidad

del grupo α -epóxido. Así, el espectro de **16** mostró la presencia de un grupo hidroxilo alílico (con señales en δ 4.13 / 63.9 ppm para C-7) y de un par adicional de carbonos vinílicos cuaternarios (en δ 139.4 y 134.8 ppm). Estos últimos correspondieron a los respectivos carbonos 8 y 9. Lo anterior demostró la apertura del epóxido y se formaron un hidroxilo en C-7 y una doble ligadura en C-8 y C-9. Así, se propuso la estructura **16a**.

En tanto, los compuestos **14a** y **27a** (provenientes de **14** y **27**) mostraron señales para dos protones vinílicos no acoplados (δ 5.3 y 5.2 ppm). Este patrón de señales se encontró en las espectroscopías de ciertos tirucalanos (Liu *et al.*, 2001), por lo que los compuestos **14a** y **27a** se propusieron como dihidroderivados con un sistema diénico en Δ^{7-8} y Δ^{9-11} . La formación de los sistemas encontrados en **14a**, **16a** y **27a** se explica por la apertura nucleofílica del grupo epóxido (en los compuestos **14**, **16** y **27**) en las condiciones suavemente ácidas (fig. 38).

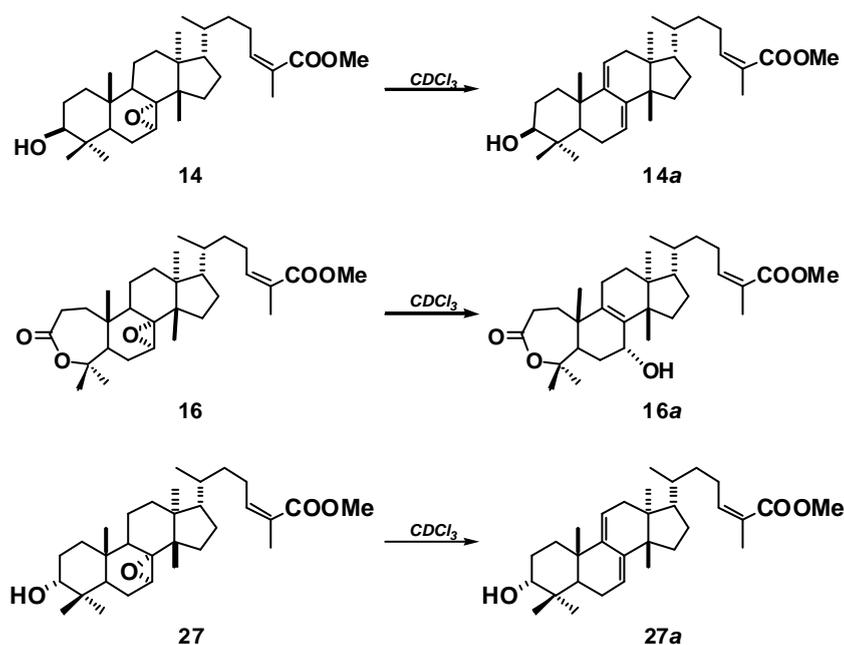


Figura 38
Productos de degradación de los epóxiderivados

La adquisición de los espectros de RMN ¹H y ¹³C, en disolución con C₆D₆, de los epóxiderivados mostró las señales esperadas para el grupo oxirano (δ 2.54 para H-7 y 63.2 ppm para C-8).

1.5. Acetilación

Los alcoholes **3** y **2** se trataron con anhídrido acético - piridina y se obtuvieron los acetatos **17** y **28**, respectivamente (fig. 39).

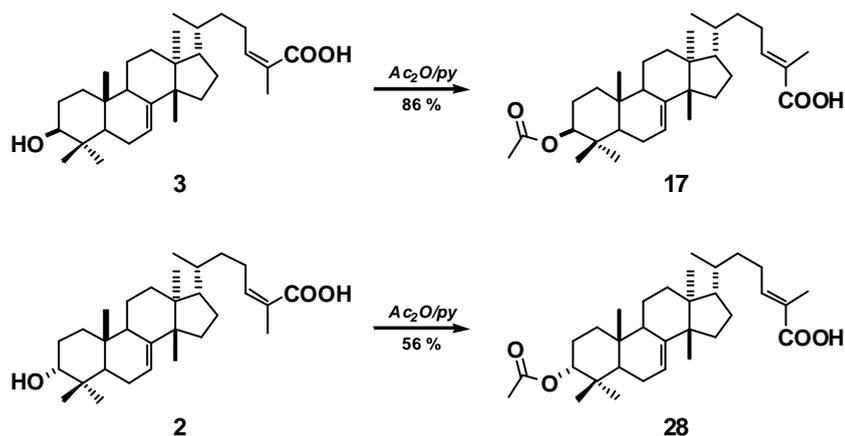


Figura 39
Obtención de los acetatoderivados

La espectroscopía de resonancia de los productos mostró la inserción del acetato en C-3 (δ 4.5 / 81.1 ppm). Sin embargo, sorprendentemente eran diferentes los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento de ciertas señales. La señal a campo bajo en δ 6.9 ppm se asignó al protón vinílico H-24, y la señal en δ 12.0 ppm (campo alto del ^{13}C), al grupo metilo C-27. Estas características evidenciaron que la doble ligadura Δ^{24-25} cambiaba de configuración, de Z a E.

Para determinar los factores que favorecen el cambio de configuración de la doble ligadura de la cadena lateral, el derivado hidroxilado **7** se sometió a reacción. Este compuesto contenía un residuo de éster metílico y no un ácido libre como en los compuestos **2** y **3**. La resonancia protónica del compuesto resultante (**18**) mostró las señales del grupo acetato, pero no las de la doble ligadura Δ^{24-25} observadas en los acetatos **17** y **28**. Puesto que el compuesto **18** conservó la doble ligadura Z en C-24 / C-25, éste se identificó como 3 β -acetoxi-tirucala-7E, 24Z-dien-26-ato de metilo (fig. 40). Por lo anterior, la isomerización del doble enlace se efectuaba únicamente en presencia del residuo de ácido libre.

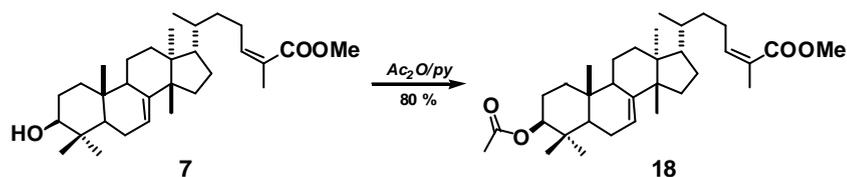


Figura 40
Obtención del compuesto 18

Se sabe que la formación de un acetato ocurre a través del ataque nucleofílico del átomo de oxígeno del hidroxilo sobre el carbonilo del complejo de acetato - piridina. Por su parte, la isomerización de la doble ligadura de la cadena lateral se propone de la siguiente manera. La base ioniza al ácido carboxílico y se origina un carboxilato. Uno de los átomos de oxígeno de este residuo actúa sobre el carbonilo del complejo acetato - piridina, y se forma el anhídrido correspondiente. Posteriormente, otra molécula de piridina actúa sobre el anhídrido y se regenera el carboxilato. Este residuo se acomoda simulando un ciclo de 6 miembros, de manera que, el H en C-23 se transfiere hacia un oxígeno. Tras los posibles movimientos de resonancia se forma un enlace simple en los C-24 y C-25. Este enlace puede girar libremente y se intercambia la posición del residuo de carboxilato. Al final se produce la configuración *E* del doble enlace en C-24 / C-25 (fig. 41).

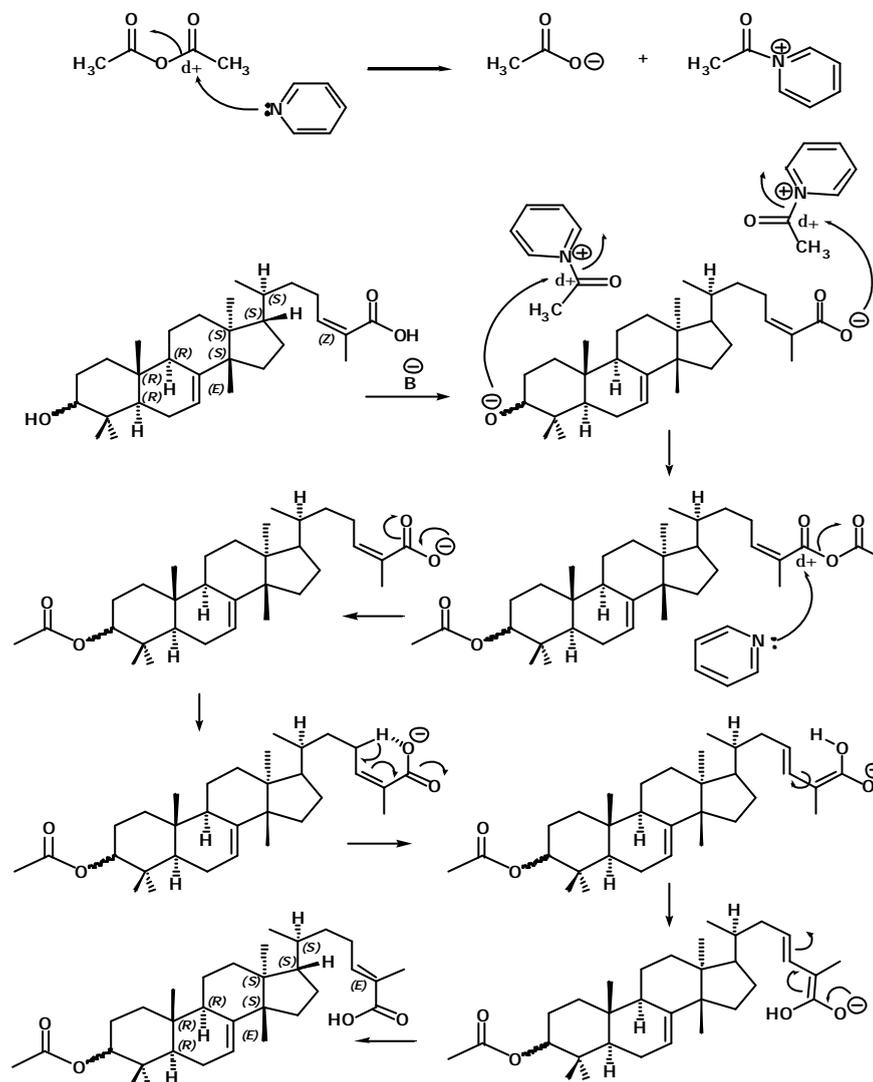


Figura 41

Mecanismo propuesto para la formación de acetatos

1.6. Formación de oximas

La reacción de formación de oximas no se contempló dentro del esquema inicial de modificaciones. Sin embargo, la reacción se efectuó por motivos circunstanciales, y ninguno de los productos se evaluó biológicamente. Los 3-hidroxiiminoderivados **19** y **20** se obtuvieron a partir de **1** y **6** por tratamiento con hidroxilamina en medio básico (fig. 42).

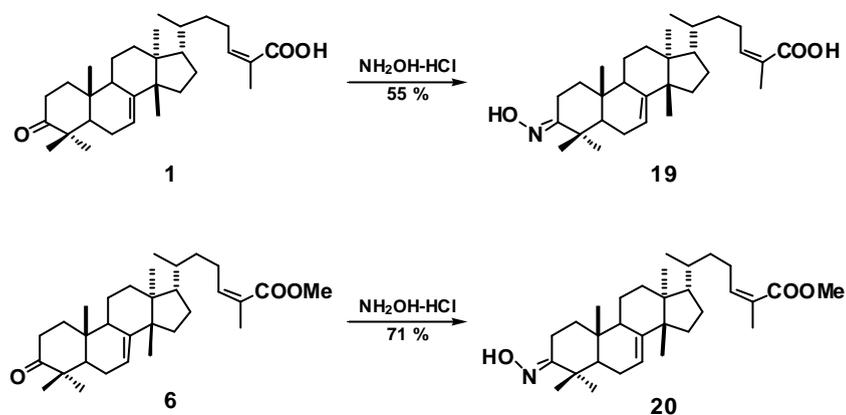


Figura 42
Obtención de los 3-hidroxiiminoderivados

Los datos de infrarrojo e impacto electrónico señalaron la presencia del residuo de oxima. Sin embargo, en la espectroscopía de resonancia no se presentaron las señales del átomo de hidrógeno unido al oxígeno de la oxima y del carbono sp^2 de la hidroxiimina en C-3. En consecuencia, se propuso la correspondiente forma tautomérica, el grupo nitroso. Sin otra evidencia, durante la adquisición de los datos de resonancia era posible que se encontraran ambas tautómeros (grupos oxima y nitroso).

2. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

La presente investigación contribuye con los primeros estudios preclínicos de las propiedades antiinflamatoria y antitumoral del cuachalalate, y su relación con la presencia de los ácidos **1** y **2**.

2.1. Modelo de edema inducido por TPA

2.1.1. Actividad de los extractos y los triterpenos **1** y **2**

El TPA induce el edema de forma inespecífica, es decir, con la participación de una variedad de mediadores químicos y celulares. Mediante este ensayo se puede saber si una sustancia es o no antiinflamatoria, pero no es posible conocer cómo interfiere en la inflamación. Sin embargo, el resultado que se obtiene suele ser de gran valor en la investigación de la actividad antiinflamatoria de la sustancia evaluada.

Los resultados de la actividad de los extractos acuoso y hexánico de *A. adstringens* y de los ácidos masticadienoico (**1**) y 3-epimasticadienolico (**2**), obtenidos en el modelo de edema inducido por TPA en la oreja de ratón (Cuadro 3, pág. 74) sustentan el uso popular de la especie como remedio antiinflamatorio.

Los extractos acuoso (**EA**) y hexánico (**EH**) mostraron efectos opuestos. Mientras que el extracto **EA** no presentó actividad, el concentrado orgánico inhibió la inflamación de forma dependiente de la dosis. Sin embargo, su máximo efecto de inhibición fue tan solo del 49.1 %, lo cual no permitió determinar la dosis efectiva media (DE₅₀) y simplemente se expresó como mayor de 1.0 mg/oreja. Por lo anterior, es factible especular que la diferente composición química de los extractos **EH** y **EA** es el factor que determina los efectos observados, y probablemente sus acciones sobre ciertos mecanismos en la inflamación.

Por su parte, el compuesto **2** mostró efectos dependientes de las dosis y su DE₅₀ fue de 0.80 ± 0.19 mg/oreja. El ácido masticadienoico (**1**) no presentó efectos dosis-dependientes, ninguna respuesta fue mayor del 50 % (en la última dosis inhibió en un 22.4 %). Por lo tanto, no se determinó la DE₅₀. También

se observó que el extracto **HE** y los triterpenos **1** y **2** mostraron respuestas similares en la dosis de 0.31 mg/oreja (aproximadamente 36 % de inhibición).

El ácido ursólico y la indometacina disminuyeron el edema conforme con el aumento en las dosis. No obstante, el ácido ursólico no alcanzó el 50 % del efecto, y no se determinó su dosis efectiva media. La DE_{50} de la indometacina fue de 0.20 ± 0.05 mg/oreja.

2.1.2. Actividad de los derivados producidos a partir de 1 y 2

Considerando los datos de actividad antiinflamatoria, los ácidos **1** y **2** se usaron como cabezas de serie. Las modificaciones moleculares por métodos químicos resultaron en 26 derivados. Sin embargo, la obtención de cantidades limitadas de los compuestos **11**, **13**, **15**, **18**, **19**, **20**, **22** y **23** no permitió su evaluación biológica. Por lo tanto, solamente se evaluaron 18 compuestos en el modelo de edema inducido por TPA. Los compuestos **3-17** resultaron del ácido **1** (Cuadro 4, pág. 75), y los compuestos **21-28**, del ácido **2** (Cuadro 5, pág. 77).

En el caso de los derivados del triterpeno **1**, los compuestos **3**, **4**, **6**, **7**, **9**, **14** y **16** mostraron tendencias de respuestas dependientes de las dosis y sus efectos máximos estuvieron por encima del 50 % de inhibición. También los compuestos **8**, **10** y **17** presentaron respuestas dependientes de las dosis; sin embargo, sus efectos no excedieron el 50 % a la dosis de 1.0 mg/oreja. El epoxiderivado **12** mostró efectos dependientes hasta la dosis de 0.31 mg/oreja, en la última dosis su respuesta disminuyó (62.2 %). El ácido 24-25S-dihidromasticadienólico (**5**) fue el compuesto menos activo de todos los evaluados; a las dosis de 0.1 y 0.31 mg/oreja inhibió en 17.2 y 14.2 %, respectivamente.

El análisis de relación estructura-actividad en este modelo, de los derivados del ácido **1** indicó que aquellos que presentaban un éster metílico α , β -insaturado en la cadena lateral (compuestos **6**, **7**, **12** y **16**, con excepción de **14**) mostraban mayor efectividad en comparación con aquellos con un éster etílico (compuesto **10**) o un ácido carboxílico (compuesto **3**).

También se observó que estos derivados eran más potentes que sus análogos no conjugados (compuestos **4**, **5**, **8**, **9**, y **17**). Por ejemplo, el β -hidroderivado **7**, el cual contenía un grupo éster metílico α , β -insaturado terminal fue 5 veces más activo (DE_{50} 0.34 ± 0.08 $\mu\text{mol/oreja}$) que su análogo dihidroderivado **9** (DE_{50} 1.77 ± 0.72 $\mu\text{mol/oreja}$). También, el compuesto **7** mostró aproximadamente 6 veces mayor actividad que el ácido correspondiente (compuesto **3**, DE_{50} 1.64 ± 0.57 $\mu\text{mol/oreja}$).

En cuanto a los derivados del triterpeno **2** (Cuadro 5, pág. 77), los compuestos evaluados (**21**, **25**, **26**, **27** y **28**) disminuyeron el edema conforme con las dosis crecientes. Por su parte, el 3-epiisomasticadienolato de etilo (**24**) mostró efectos dependientes hasta la tercera dosis de ensayo (63.8 % de inhibición), en la última dosis su respuesta descendió al 53.7 %. Entre el 24-25S-dihidro-3-epiisomasticadienolato de etilo (**25**) (DE_{50} 1.69 ± 0.23 $\mu\text{mol/oreja}$) y el ácido original **2** (DE_{50} 1.75 ± 0.43 $\mu\text{mol/oreja}$) no existieron diferencias significativas en sus respuestas de inhibición.

Los compuestos **21**, **24** y **27** (DE_{50} 0.40 ± 0.06 ; 0.36 ± 0.05 y 0.38 ± 0.13 $\mu\text{mol/oreja}$, respectivamente) superaron aproximadamente 4 veces la actividad del ácido **2**. Estos compuestos contenían un ácido carboxílico no conjugado (**21**), un éster etílico insaturado (**24**) y un éster metílico conjugado (**27**). El compuesto **26** se distinguió como el derivado más activo producido a partir del triterpeno **2**, su DE_{50} (0.15 ± 0.03 $\mu\text{mol/oreja}$) superó casi 12 veces la del ácido **2**.

Por otro lado, los epoxiderivados **12**, **16** y **26** con DE_{50} similares (**12**, 0.15 ± 0.05 ; **16**, 0.16 ± 0.06 ; y **26**, 0.15 ± 0.03 $\mu\text{mol/oreja}$) fueron los compuestos más activos de todos los evaluados. La comparación de los valores logarítmicos del inverso de sus DE_{50} ($\text{Log } 1/DE_{50}$) (Cuadro 6, pág. 78), permitió constatar que excedían por más de 10 veces las actividades de los triterpenos **1** y **2**. Los datos fueron 6.82, 6.81 y 6.83 para **12**, **16** y **26**; y 5.76 para el triterpeno **2**. Por otro lado, el epoxiderivado **27** también mostró una actividad relevante (DE_{50} 0.38 ± 0.13 $\mu\text{mol/oreja}$), aunque su potencia fue más de 4 veces mayor que la del ácido **2**, su actividad fue la mitad de aquella mostrada por el análogo **26**. Estos resultados indicaron la importancia de un éster metílico en C-26. Sin embargo, el epoxiderivado **14** que presentaba un grupo 3β -hidroxilo en C-3 y un éster metílico en C-26 registró la actividad más baja, su DE_{50} de 1.73 ± 0.36 $\mu\text{mol/oreja}$ ($\text{Log } 1/DE_{50}$ 5.76) fue similar a la mostrada por el triterpeno **2**. De ahí que, el anillo A también es importante para la actividad de epoxiderivado.

Una comparación de las estructuras de los epóxiderivados **12**, **14**, **16** y **27** con sus actividades biológicas permitió distinguir lo siguiente. Los compuestos presentaban un residuo de éster metílico α , β -insaturado, y diferían exclusivamente en el sustituyente de la posición 3 del anillo A. El derivado **12** poseía un grupo carbonilo, un hidroxilo 3β -ecuatorial en **14**, un hidroxilo 3α -axial en **27**, y una lactona de 7 miembros en **16**. Así bien, con excepción del sustituyente 3β -hidroxilo, los demás grupos funcionales conferían una excelente actividad biológica a las moléculas. La orientación β -ecuatorial del hidroxilo probablemente se relacione con la moderada actividad. Por su parte, el epóxiderivado **26**, también muy activo, contenía un alcohol α -axial y un ácido carboxílico α , β -insaturado.

Por otro lado, el derivado **6** (DE_{50} 0.28 $\mu\text{mol/oreja}$), con un éster metílico en C-26 resultó más activo que el ácido **1**. Inclusive, aún mucho más activo que **10** ($DE_{50} > 2.07 \mu\text{mol/oreja}$), el cual presentaba un éster etílico. Sin embargo, se debe señalar que los ésteres etílicos como el compuesto **10**, poseían dos dobles enlaces, el de la cadena lateral y el otro en las posiciones 8 y 9. Probablemente la presencia del enlace doble endocíclico se relacione con su escasa actividad biológica. En general, se observó que los derivados carboxílicos saturados mostraron mayor actividad que los correspondientes compuestos insaturados. Sin embargo, los ésteres insaturados presentaron menores efectos que sus análogos saturados.

Un análisis de la actividad biológica de los derivados con un grupo carbonilo, un hidroxilo (α -axial o β -ecuatorial) y un acetato en la posición 3 permitió distinguir lo siguiente:

a) En general, los derivados con un alcohol β mostraron actividades más escasas que aquellos que contenían un alcohol α o un carbonilo. Por ejemplo, en los derivados **4** (3-oxo), **21** (3α -hidroxilo) y **5** (3β -hidroxilo) se observó que el compuesto **21** (DE_{50} 0.40 $\mu\text{mol/oreja}$) fue más activo que **4** (DE_{50} 1.34 $\mu\text{mol/oreja}$) y **5** (DE_{50} no determinada).

b) Por su parte, el compuesto con el grupo acetato con orientación β (**17** $DE_{50} > 201 \mu\text{mol/oreja}$) fue menos activo que aquel con orientación α (**28**, DE_{50} 1.39 \pm 0.38 $\mu\text{mol/oreja}$). No obstante, ambos

compuestos (**17** y **28**) incluían un sistema conjugado con configuración *E* en la cadena lateral, y no *Z* como en su estructura original. Esta característica podría estar relacionada con su actividad.

c) Los epimeros **2** y **3** presentaron valores similares de DE_{50} (1.75 ± 0.43 y 1.64 ± 0.57 $\mu\text{mol/oreja}$, respectivamente). Por lo tanto, la orientación del grupo hidroxilo no constituyó un componente de selectividad biológica.

Por lo anterior, se constató que algunas partes de la molécula eran críticas, mientras que otras podían modificarse, y su alteración sólo ocasionaba pequeñas variaciones en la actividad. El análisis de las actividades biológicas de los derivados evaluados claramente indica que, un grupo α -epóxido en las posiciones 7 y 8 y el residuo de éster metílico α , β -insaturado en la cadena lateral son importantes para la actividad antiinflamatoria.

Finalmente, de los 18 compuestos evaluados en el modelo de edema inducido por TPA, los derivados **3, 4, 8, 9, 10, 14, 17, 25** y **28** poseían respuestas similares a los triterpenos **1** y **2**. El compuesto **5** fue el menos activo de todos los compuestos evaluados. En tanto, los compuestos **6, 7, 12, 16, 21, 24, 26** y **27** se distinguieron como los compuestos más activos, y superaron la actividad del fármaco de referencia (indometacina DE_{50} 0.570 $\mu\text{mol/oreja}$). A continuación se nombran en orden creciente de actividad:

1. Ácido 24-25 *S*-dihidro-3-epimasticadienólico (**21**) (DE_{50} 0.397 $\mu\text{mol/oreja}$)
2. 3*R*-hidroxi-7*R*-8*R*-epoxi-tirucal-24*Z*-en-26-ato de metilo (**27**) (DE_{50} 0.381 $\mu\text{mol/oreja}$)
3. 3-epiisomasticadienolato de etilo (**24**) (DE_{50} 0.363 $\mu\text{mol/oreja}$)
4. Masticadienolato de metilo (**7**) (DE_{50} 0.341 $\mu\text{mol/oreja}$)
5. Masticadienoato de metilo (**6**) (DE_{50} 0.279 $\mu\text{mol/oreja}$)
6. Lactona de 4-hidroxi-7*R*-8*R*-epoxi-3, 4-seco-tirucal-24*Z*-en-26-ato de metilo (**16**) (DE_{50} 0.155 $\mu\text{mol/oreja}$)
7. 3-oxo-7*R*-8*R*-epoxi-tirucal-24*Z*-en-26-ato de metilo (**12**) (DE_{50} 0.152 $\mu\text{mol/oreja}$)
8. Ácido 3*R*-hidroxi-7*R*-8*R*-epoxi-tirucal-24*Z*-en-26-ico (**26**) (DE_{50} 0.149 $\mu\text{mol/oreja}$)

2.2. Modelo de edema inducido por carragenina

2.2.1. Actividad de los extractos y triterpenos 1 y 2

El modelo de edema inducido por carragenina en la pata de la rata también se aplicó en la investigación de la actividad antiinflamatoria de *A. adstringens*. En el Cuadro 7 (pág. 82) se muestran los resultados de las evaluaciones antiinflamatorias de los extractos acuoso (**EA**) y hexánico (**EH**), así como de los ácidos masticadienoico (**1**) y 3-epimasticadienolico (**2**) (Oviedo-Chávez *et al.*, 2004).

En este ensayo los extractos **EA** y **EH** mostraron efectos opuestos. El extracto **EA** presentó la actividad inhibitoria más alta de todas las sustancias evaluadas; a la dosis de 31 mg/kg y en la última hora de exploración inhibió un 82.1 %; y a 100 mg/kg y en la 3ª hora del ensayo mostró un 82.6 % de inhibición. En ambas dosis, el extracto **EA** presentó datos semejantes de área bajo la curva, que representan la inhibición del edema total de 68.0 y 73.5 %, respectivamente. Por su parte, el extracto **EH** mostró la actividad más baja de todas las sustancias evaluadas; a la dosis de 31 mg/kg este extracto no fue activo; en tanto, a la dosis de 100 mg/kg se observó una tendencia de inhibición creciente conforme con el tiempo, y alcanzó una inhibición máxima de 33.3 % en la última hora de observación. Su respuesta total antiinflamatoria fue del 14.4 %.

Por otro lado, los triterpenos **1** y **2** mostraron efectos estadísticamente equivalentes y obedecieron una tendencia creciente conforme con las dosis, así como con el tiempo de experimentación. A la dosis de 100 mg/kg, el ácido **1** inhibió el edema en un 61.5 % en la 5ª hora; mientras el ácido **2** mostró sus efectos máximos a partir de la 3ª hora (60.9 % de inhibición). Sus respuestas comparables en todo el ensayo podrían indicar algún mecanismo de acción común en el proceso de inflamación.

Los fármacos de referencia (ácido ursólico e indometacina) mostraron los siguientes resultados. El ácido ursólico fue más activo a la dosis de 31 mg/kg que a 100 mg/kg. La respuesta global fue del 52.0 % de inhibición, y los efectos parciales a las 3ª y 5ª h de exploración fueron de 71.7 y 79.5 % de disminución. A la dosis de 100 mg/kg, sus efectos fueron de poco más de 40 % de inhibición desde la 3ª hora. Por su parte, la indometacina produjo respuestas equivalentes a los del ácido ursólico a la dosis

de 100 mg/kg. En esa misma dosis, ambos mostraron datos similares de inhibición del edema total (31.7 y 33.5 % para ácido ursólico e indometacina, respectivamente).

Los datos del curso temporal del edema se representan en la figura 20. Ahí se observan los efectos contrarios de los extractos **EA** y **EH**. El extracto acuoso, cuyos componentes no se aislaron en esta investigación, mostró la mayor actividad antiinflamatoria observada en este ensayo. Los triterpenos **1** y **2** presentaron una moderada respuesta inhibitoria y, además fueron más efectivos que el extracto **EH**. Los fármacos de referencia se comportaron de manera equivalente.

2.2.2. Actividad de los derivados producidos a partir de **1** y **2**

Los derivados **3**, **6**, **7** y **21** se evaluaron en el modelo de edema inducido por carragenina (Cuadro 8, pág. 83; fig. 21, pág. 85). Los demás compuestos se tenían en cantidades insuficientes, por lo cual no se evaluaron en este ensayo.

A la dosis de 31 mg/kg, los compuestos mostraron efectos inhibitorios menores. Y a la dosis de 100 mg/kg, apenas las actividades mejoraron poco. Los porcentajes de inhibición del edema global entre los derivados **6**, **7** y **21** fueron similares. Sin embargo, el compuesto **21** logró una inhibición máxima del 46.0 % en la 5ª hora del ensayo. De estos 3 compuestos, el derivado **6** fue el menos activo. El alcohol **3** mejoró su actividad a la dosis de 100 mg/kg, aunque los porcentajes de inhibición de edemas parciales estuvieron por debajo de los triterpenos **1** y **2**. No obstante, su efecto de antiedema global del 40.4 % fue equivalente con los de **1** y **2**.

En la dosis de 100 mg/kg, los triterpenos **1**, **2** y **3** fueron más efectivos que el ácido ursólico e indometacina (fármacos de referencia) a las dosis de 100 y 7.5 mg/kg.

De acuerdo con nuestros resultados, de los derivados **3**, **6**, **7** y **21** analizados en este modelo, solamente el hidroxiderivado **3** presentó un comportamiento comparable con los triterpenos originales. En tanto, los compuestos **6**, **7** y **21** mostraron efectos poco significativos. Por lo anterior, se dedujo que el grupo β -hidroxilo no incrementaba la actividad, mientras que la presencia de un éster metílico o la

saturación del enlace doble original en C-24 / C-25 disminuían la actividad en este modelo. Se debe recordar que los derivados **6**, **7** y **21** fueron efectivos en el modelo de edema inducido por TPA.

Tomando en cuenta que el edema inducido por la carragenina se atribuye principalmente a la acción de la enzima COX, probablemente los triterpenos **1**, **2** y **3** interfieren con la enzima. Mientras que los derivados **6**, **7** y **21** no pueden actuar sobre la COX.

2.3. Modelo de producción del óxido nítrico

2.3.1. Actividad de los extractos y triterpenos **1** y **2**

Una herramienta para evaluar la actividad antiinflamatoria la constituyó el modelo de producción *in vitro* de óxido nítrico (NO) en macrófagos peritoneales. El NO producido por bs macrófagos activados, origina sustancias proteolíticas y oxidantes con gran potencial nocivo. También, el NO se ha asociado en procesos cancerígenos. Por lo que, la inhibición de la producción del NO es de interés en la búsqueda de fármacos anticancerosos.

En esta sección se describen los efectos de los compuestos **1** y **2** y de los extractos **EH** y **EA** en el modelo de producción de óxido nítrico en macrófagos estimulados. La producción de NO ocurre en células sensibilizadas con LPS, y la cantidad de NO producido depende del tiempo de exposición. Tomando en cuenta lo anterior, en esta investigación se determinaron los efectos de las sustancias de ensayo en el curso de producción de NO. Para ello se planearon dos experimentos, en uno de ellos las sustancias de prueba y el LPS se aplicaron al mismo tiempo (protocolo I), y en el otro, las células se trataron con las sustancias y 4 h después con LPS (protocolo II). Los resultados se muestran en el Cuadro 9 (pág. 89). Los datos se publicaron en Oviedo-Chávez *et al.*, 2004.

La concentración de NO en los dos protocolos fueron diferentes entre los grupos de células sensibilizadas con LPS (experimentos I y II: 12.6 ± 0.4 y 9.9 ± 0.4 μM , respectivamente). En tanto, en los grupos cuyas células fueron además tratadas con las sustancias de ensayo, las cantidades del NO fueron similares y no importó el momento de aplicación del LPS.

El extracto **EA** fue más efectivo que el extracto **EH**. El **EA** inhibió la producción del NO en 57.0 y 50.9 % en los protocolos I y II, respectivamente; el extracto **EH** inhibió en 33.6 y 25.0 %. Se debe recordar que un comportamiento similar de los extractos se observó en el modelo de edema por carragenina.

Por su parte, los triterpenos **1** y **2** inhibieron la cantidad de NO por más del 80 %. Sin embargo, ambos compuestos disminuyeron notablemente la población celular. Probablemente, el efecto reductor del NO se atribuye a la escasez de células vivas. También se advirtió que **1** y **2** eran más activos que el extracto **EH**.

El ácido ursólico y la pristimerina, ambos de naturaleza triterpenoide, además de la aminoguanidina y la indometacina constituyeron el grupo de fármacos de referencia. La indometacina no afectó la cantidad de NO en ninguno de los protocolos. El ácido ursólico mostró efectos poco significativos, con porcentajes de inhibición de 35.1 y 14.8 % en los ensayos I y II, respectivamente. La aminoguanidina inhibió la liberación del NO en 75.7 y 62.1 %. Por último, la pristimerina impidió completamente la producción de NO, asimismo la viabilidad celular no alcanzó el 10 %.

En resumen, los ácidos **1** y **2** disminuyeron considerablemente la cantidad de NO en macrófagos activados, sin embargo, ocasionaron gran muerte celular. Probablemente, la reducción de la población de macrófagos contribuye con los efectos antiinflamatorios de los ácidos **1** y **2**.

2.3.2. Actividad de los derivados producidos a partir de 1 y 2

Se ha demostrado que algunos triterpenos poseen efectos opuestos sobre la producción del NO. Por ejemplo, el ácido ursólico puede incrementar la producción del NO en células en reposo y disminuirlo en células activadas por LPS (You *et al.*, 2001). El ácido deanolico y α -hederina también pueden inducir *per se* la producción del NO (Suh *et al.*, 1998; Jeong y Choi, 2002; Choi *et al.*, 2001; You *et al.*, 2001). Por lo anterior, se determinaron los efectos de los triterpenos **1** y **2** y los derivados **3**, **4**, **6**, **12** y **16** en macrófagos en reposo y activados por LPS. Se eligieron dosis desde 1 nanomolar (nM) hasta 10 μ M

considerando que los ácidos **1** y **2** fueron citotóxicos a la dosis de 100 μM . Los resultados se muestran en el Cuadro 10 (pág. 90). Algunos datos se publicaron en Oviedo-Chávez *et al.*, 2005.

La viabilidad de las células no disminuyó cuando se trataron solamente con los compuestos de ensayo. Sin embargo, cuando se trataron con LPS y los derivados **6**, **12**, **16** y ácido ursólico se encontraron aproximadamente un 20 % de células no viables. Por lo anterior, los efectos sobre la producción del NO se atribuyeron propiamente a las sustancias administradas.

En la mayoría de los casos, las cantidades de NO fueron superiores en las células estimuladas por LPS que en las células en reposo. En tanto, en células no sensibilizadas por LPS, los compuestos **1**, **2**, **3**, **6**, **12** y **16** con excepción del dihidroderivado **4** promovieron la producción de NO, de manera constante y no dependiente de las dosis. Lo anterior permitió suponer que estos triterpenos en pequeñas dosis, pueden inducir la producción de NO en macrófagos en reposo.

En las células activadas por LPS, en la dosis de 1 nM el triterpeno **2** presentó un nivel de concentración de NO ($61.8 \pm 2.7 \mu\text{M}$) superior al del grupo que recibió únicamente LPS ($44.7 \pm 1.8 \mu\text{M}$). Posteriormente, el NO disminuyó conforme aumentaban las dosis. Los demás compuestos mostraron datos estadísticamente equivalentes al del grupo control, en cualquiera de las dosis de ensayo. Lo anterior sugirió que, los triterpenos administrados en pequeñas dosis no interfieren con la producción del NO inducido por LPS.

En resumen, en macrófagos activados por LPS únicamente el ácido **2** aumentó la cantidad de NO (dosis de 1 nM), los demás compuestos fueron inactivos. En células en reposo, los compuestos **1**, **2**, **3**, **6**, **12** y **16** con excepción del dihidroderivado **4** promovieron la producción del NO.

2.4. Modelo de producción de leucotrieno B₄

Con el fin de comprender los mecanismos involucrados en las respuestas biológicas de los compuestos en estudio se desarrolló un ensayo biológico más específico. Para elegir el estudio adecuado se tomaron en cuenta las siguientes aportaciones: El ácido masticadienólico (**3**), aislado de *Pistacia*

terebinthus, inhibe la enzima 5-LO (Giner-Larza *et al.*, 2002); y además, en el edema inducido por TPA el LTB₄ participa de manera especial (Carlson *et al.*, 1985) Por lo anterior, se estableció el ensayo de producción de LTB₄ en LPMN activados por calcio iónoforo y se determinaron los efectos de los triterpenos **1** y **2**, así como los compuestos **6**, **12** y **16** (Cuadro 12, pág. 95). Los derivados **6**, **12** y **16** se seleccionaron por ser de los compuestos más activos en el modelo de edema inducido por TPA.

Los ácidos **1** y **2** administrados a 31 μM , mostraron valores de producción relativa de LTB₄ de 37.7 y 19.5 %. O bien, 62.3 y 80.5 % de inhibición, respectivamente.

Sin embargo, en el caso de los derivados **6**, **12** y **16** se observaron errores estándar mayores del 10 %. Por lo cual se asumió que sus efectos eran imprecisos. Lo anterior no permitió determinar si existía alguna relación entre sus actividades en el modelo de edema inducido por TPA y alguna acción sobre la enzima 5-LO.

Los fármacos de referencia, los ácidos ursólico, oleanólico y NDGA mostraron efectos inhibitorios dependientes de las dosis. El ácido NDGA inhibió en un 95 % la producción del LTB₄ a la dosis de 10 μM . En tanto, el ácido oleanólico fue más activo que el ursólico. El ácido oleanólico inhibió en un 89 %, a la dosis de 31 μM .

2.5. Citotoxicidad en líneas celulares

Se determinaron los efectos citotóxicos del extracto **EH**, de los triterpenos **1** y **2** y de los derivados **3**, **4**, **5**, **6**, **7**, **8**, **12**, **16** y **21** en 5 líneas de cáncer humano. Las dosis efectivas medias para el extracto, y los triterpenos **1**, **2**, **3**, **4** y **12** se muestran en el Cuadro 13 (pág. 99) (Oviedo-Chávez *et al.*, 2005). Por otro lado, en el Cuadro 14 (pág. 100) se presentan únicamente los porcentajes de inhibición de crecimiento celular de los compuestos **5**, **6**, **7**, **8**, **16** y **21**.

El extracto **EH** mostró mayor actividad contra las líneas de cáncer de mama y de leucemia (DE₅₀ 7.9 y 8.4 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). El triterpeno **1** fue muy efectivo contra el crecimiento de células cancerosas de mama y de sistema nervioso central (DE₅₀ 18.4 y 20.4 μM , respectivamente). También **1**

fue más activo que cualquiera de los derivados en estas dos líneas. Por su parte, el ácido **2** inhibió eficientemente la proliferación de células de leucemia (DE₅₀ 24.2 μM).

En las células tumorales de colon, los derivados **3** (DE₅₀ 20.2 μM) y **4** (DE₅₀ 22.9 μM) mostraron aproximadamente el doble de efectividad que el precursor **1** (DE₅₀ 42.1 μM). El epoxiderivado **12** (DE₅₀ 11.2 μM) fue el único compuesto que mejoró ligeramente la actividad del triterpeno **1** (DE₅₀ 18.4 μM) en células de cáncer de mama. Sin embargo, de todos los compuestos evaluados, **12** fue el menos activo contra las células de colon, SNC y leucemia. En la línea tumoral de SNC, los derivados **3**, **4** y **12** no superaron la actividad mostrada por el ácido **1**. En tanto, en la línea de cáncer de próstata, las dosis efectivas medias de los ácidos **1**, **2**, **3** y **4** fueron semejantes. Por último, en las células de leucemia los ácidos **2** y **3** mostraron una actividad superior que cualquiera de los compuestos evaluados (DE₅₀ 24.2 y 24.9 μM, respectivamente). También se pudo constatar que los epímeros **2** y **3** mostraron efectos citotóxicos similares en las 5 líneas de ensayo.

Respecto al ácido ursólico, el cual se usó como fármaco de referencia por sus conocidas propiedades citotóxicas y antiproliferativas (Chattopadhyay *et al.*, 2002), se observaron resultados similares a los publicados para las 5 líneas tumorales (Setzer y Setzer, 2003).

Por otro lado, los compuestos **5**, **6**, **7**, **8**, **16** y **21** inhibieron el crecimiento celular de las 5 líneas de ensayo (Cuadro 14, pág. 100). El dihidroderivado **5** inhibió aproximadamente en un 70 % la proliferación de las células tumorales de mama y próstata; 65.9 y 55.8 % en las líneas de cáncer de colon y SNC, y 39.4 % en las de leucemia. El derivado masticadienoato de metilo (**6**) no dañó las células de cáncer de colon, mama y leucemia, y afectó poco a las de próstata y de SNC. El derivado masticadienolato de metilo (**7**) fue sumamente citotóxico, afectó por arriba del 80 % el crecimiento de las células cancerosas de mama, SNC y leucemia, y alrededor del 50 % a las células de colon y de próstata. El compuesto 24-25S-dihidromasticadienoato de metilo (**8**) mostró selectividad por las células tumorales de SNC (100 % inhibición), las demás células fueron muy poco afectadas. El epoxiderivado **16** inhibió en un 53.2 % la proliferación de las células cancerosas de SNC, menos de 30 % las células de colon, próstata y leucemia, y fue inactivo contra las de mama. El dihidroderivado **21** fue el más citotóxico de los derivados evaluados en esta sección, su potencia abarcó las 5 líneas de ensayo.

Por lo anterior, la proliferación celular de las líneas tumorales se interrumpió, en mayor o menor grado, por estos derivados; no obstante, cualquiera de ellos afectó las células de cáncer de SNC.

Por otro lado, los efectos opuestos de ciertos triterpenos en la producción de NO por macrófagos no activados, se han asociado con sus propiedades citotóxicas y anticancerígenas (Suh *et al.*, 1998; Jeong y Choi 2002; You *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 2001). Tomando en cuenta lo anterior se trataron de explicar los efectos de citotoxicidad de los triterpenos **1** y **2**, y los derivados **3**, **4**, **5**, **6**, **7**, **8**, **12**, **16** y **21**. Se advirtió que, en las células de cáncer de colon, los compuestos **3** y **4** fueron más activos que **1**, y en las células de mama, los efectos fueron inversos. En las demás células tumorales, los compuestos mostraron respuestas similares. Probablemente, los efectos citotóxicos de **1** y **2**, y sus derivados se relacionen con sus facultades para promover la producción de NO.

Finalmente, un análisis de los grupos funcionales presentes en los compuestos **1**, **2**, **3**, **4**, **5**, **6**, **7**, **8**, **16** y **21** llevó a las siguientes distinciones: la presencia de un grupo ácido carboxílico no conjugado en la cadena lateral y un hidroxilo en C-3 les confiere capacidad citotóxica, la cual es reducida cuando, a su vez, existe un grupo éster metílico conjugado, un carbonilo en C-3, o un epóxido endocíclico. También, la presencia de un grupo β -hidroxilo en C-3 (compuesto **3**) o un enlace simple en C-24/C-25 (compuesto **4**) podrían ser importantes para los efectos citotóxicos contra el cáncer de colon y no contra las de mama y SNC. Por último, la configuración del hidroxilo en C-3 no es un factor de selectividad biológica.

3. ANÁLISIS CRISTALOGRAFICO Y SU RELACIÓN CON LA PLA₂

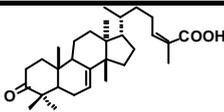
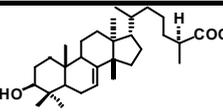
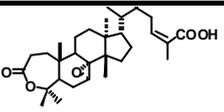
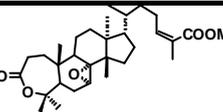
La enzima PLA₂ participa activamente en el proceso de inflamación promoviendo la liberación del ácido araquidónico, precursor de mediadores lipídicos importantes. Por otro lado, se ha demostrado que los ácidos **1** y **2** son inhibidores específicos competitivos de la enzima fosfolipasa A₂ (Jain *et al.*, 1995). Al respecto se indicó que las dimensiones y conformación moleculares de los triterpenos **1** y **2** son elementos esenciales en la inhibición de la PLA₂. Por lo anterior, fue de interés conocer los datos estructurales de los derivados analizados por difracción de rayos X y compararlos con los ácidos **1** y **2**.

Así bien, se analizaron los datos de los compuestos **5**, **15** y **16** (figuras 15, 16 y 17, respectivamente, Cuadro 18, pág. 136). Considerando que no se determinó la actividad antiinflamatoria del epoxid derivado **15**, además que el alcohol **5** fue poco activo, mientras que **16** fue mucho más efectivo que **1** en el modelo del edema inducido por TPA, se analizaron únicamente los datos de este último. Se compararon las dimensiones moleculares de **16** y **1**. Mientras que las longitudes de la molécula completa y del núcleo tetracíclico eran menores en **16**, la cadena lateral de **16** era más larga que en **1**. Probablemente, la presencia del grupo epóxido ocasionó la contracción del esqueleto triterpenoide, y en la cadena lateral, la presencia de un grupo éster metílico le confería mayor longitud en **16** que en el ácido **1**.

En vista de que el compuesto **16** no cumplía con las dimensiones estructurales óptimas para inhibir la enzima PLA₂, por lo tanto, su acción en el modelo de TPA probablemente no involucraba la PLA₂. Asimismo, tomando en cuenta que los ésteres metílicos de los respectivos ácidos **1** y **2** no mostraron actividad contra la PLA₂ (Jain *et al.*, 1995), los datos de **16** reiteraron la incapacidad de los ésteres metílicos para inhibir la PLA₂.

Cuadro 18

Valores de DE₅₀ en el modelo de edema inducido por TPA y las dimensiones estructurales de los compuestos **1**, **5**, **15** y **16**

Características	1	5	15	16
Estructura química				
DE ₅₀ (mmol/oreja)	> 2.199	> 0.676	ND	0.155
Longitud (Å)				
Molécula	19.100	18.181	17.511	18.911
Núcleo tetracíclico	11.800	10.402	10.195	9.899
Cadena lateral	7.300	8.465	7.530	9.576
Volumen (Å ³)	2701.4 (20)	2844.5 (5)	2817.6 (7)	2929.0 (3)

Los datos cristalográficos de ácido masticadienoico se tomaron de Jain *et al.*, (1995). ND, no determinado. Ácido masticadienoico (**1**); ácido 24-25-S-dihidromasticadienolico (**5**); lactona del ácido 4-hidroxi-7R-8R-epoxi-3, 4-seco-tirucal-24Z-en-26-ico (**15**); lactona del 4-hidroxi-7R-8R-epoxi-3, 4-seco-tirucal-24Z-en-26-ato de metilo (**16**).

4. ESTUDIO DE RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD

4.1. Análisis comparativo de potenciales de interacción

Los valores de DE_{50} obtenidos en el modelo de edema inducido por TPA se destinaron para el análisis de relación estructura-actividad. Mediante el método CoMFA se analizaron los compuestos **2**, **3**, **4**, **6**, **7**, **9**, **12**, **14**, **16**, **21**, **24**, **25**, **26**, **27** y **28**.

Los valores de los descriptores espaciales y estructurales de las moléculas analizadas se encuentran en el Cuadro 15 (pág. 103). A pesar de que se generaron un gran número de datos, se observaron las siguientes características. La atención se centró en los grupos constituidos por los compuestos más activos y los menos efectivos en el modelo de edema inducido por TPA. Dentro de los más activos se encuentran los epoxiderivados **12**, **16** y **26**, con valores de logaritmos de $1/DE_{50}$ de 6.82, 6.81 y 6.83, respectivamente. Mientras que, los compuestos **2**, **9** y **14** constituyeron el conjunto de menor actividad (Log de $1/DE_{50}$ de 5.76, 5.75 y 5.77, respectivamente).

Los epoxiderivados **12**, **16** y **26** poseían los valores de los orbitales moleculares HOMO (orbital de enlace) y LUMO (orbital de antienlace) más bajos que los demás compuestos. Por ejemplo, el derivado **26** presentó - 10.039 y - 0.014 eV de HOMO y LUMO, respectivamente. También se observó que exhibían los niveles de electronegatividad más altos; los valores respectivos fueron 5.02, 5.03 y 5.03 para **12**, **16** y **26**. Asimismo, estos derivados exhibían bajos índices de lipofilicidad (7.23, 6.07 y 6.48, respectivamente). También, los derivados **16** y **26** presentaron dipolos moleculares altos: 6.33 y 4.57, respectivamente.

Por su parte, los derivados menos activos **2**, **9** y **14** poseían altas energías de HOMO (- 9.135, - 9.130 y - 9.247, respectivamente) y bajos valores de electronegatividad (4.58, 3.97 y 4.63, respectivamente). No se observó alguna tendencia en los demás descriptores.

Por lo anterior, los derivados **12**, **16** y **26** poseían los valores de orbitales moleculares HOMO y LUMO más bajos, y además, altos niveles de electronegatividad y dipolos moleculares. Contrariamente, los derivados **2**, **9** y **14** poseían altas energías de HOMO y bajos índices de electronegatividad. Probablemente la efectividad de los derivados se relacione con sus propiedades nucleofílicas; en tanto que, la electrofilicidad se asociaría con una deficiencia en la actividad antiinflamatoria. Por lo tanto, es

factible que las moléculas menos activas se desempeñen como electrófilos, y las más activas como nucleófilos. En consecuencia, se sugiere que los probables sitios de acción de los triterpenos más activos serían porciones con escasa densidad electrónica.

Por otro lado, la matriz de correlación entre las DE_{50} y los parámetros fisicoquímicos (Cuadro 16, pág. 103) señaló una mayor relación entre la energía del orbital de enlace HOMO y la electronegatividad con la actividad biológica ($r = -0.522$ y 0.524 , respectivamente). Considerando que estas características electrónicas se podrían relacionar con la actividad, se reitera que las propiedades nucleofílicas de las moléculas se vincularían con la efectividad biológica.

Las técnicas de validación cruzada y no validación permitieron conocer la predecibilidad y linealidad del sistema, respectivamente. Los resultados (Cuadro 17, pág. 104) señalaron una buena linealidad ($r^2 = 0.648$), pero una mala predicción ($Q^2 = -0.244$). De ahí que, el modelo generado es incapaz de predecir la actividad de algún compuesto análogo (no sintetizado). También, se reafirmó que las propiedades electrónicas se relacionan mejor con la actividad biológica, puesto que los factores estéricos y electrónicos correspondieron con valores aproximados a 0.3 y 0.7 de contribución con la actividad.

También se aplicó una rutina de COMSIA (análisis comparativo de índice de similitud molecular), la cual asume que las propiedades estéricas, electrostáticas, hidrofóbicas, y de donación o aceptación de puentes de hidrógeno con el ligando explican sus capacidades de unión con un receptor. Los resultados no mejoraron en la linealidad y predecibilidad del modelo (datos no mostrados).

Por último, los poliedros coloreados resultantes en cada mapa señalaron las regiones donde las diferencias de actividad observadas se encontraban más relacionadas con las propiedades estéricas o electrostáticas, los cuales se suponen como sitios de interacción potencial. Esos lugares de unión corresponderían con los espacios donde un átomo perteneciente a un grupo funcional del ligando puede establecer interacciones favorables con algún receptor.

A pesar de que los campos se generaron para el cúmulo de moléculas alineadas, se analizaron únicamente los observados en el compuesto **12**, el cual fue muy activo en el modelo de edema inducido por TPA. Así, los campos estéricos (figura 25 pág. y 43 A) sugirieron que la presencia de algún

sustituyente voluminoso en la posición 31 incrementaría la actividad. Sin embargo, los derivados **10** y **25** con un residuo de etilo terminal, presentaron actividades bajas. Probablemente, el grupo etilo no contribuía con el volumen suficiente para cubrir la zona estérica; por lo tanto, probablemente el residuo (voluminoso) debe ser más grande que un grupo etilo. Por su parte, los campos electrónicos en **12** (figuras 25 pág. 105 y 43 B) advirtieron que la presencia de sustituyentes electropositivos en C-27 y electronegativos en C-3 favorecerían la actividad biológica. Por lo anterior, el compuesto **12** funcionaría como molécula cabeza de serie, a partir de la cual y considerando los resultados obtenidos en esta investigación, se podrían desarrollar (en un futuro) nuevas moléculas antiinflamatorias.

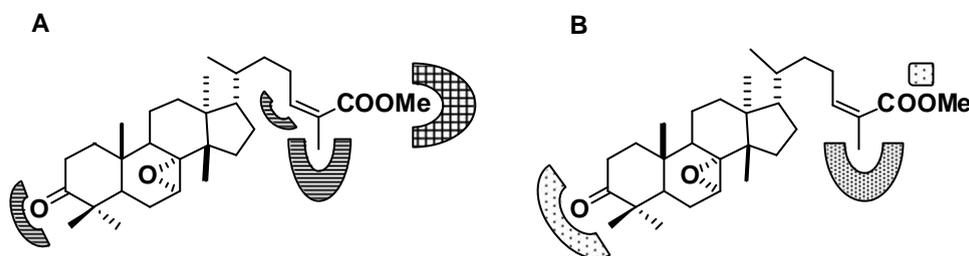


Figura 43

Representación gráfica de los contornos de interacciones estérica (A) y electrostática (B) de 3-oxo-7R-8R-epoxi-tirucal-24Z-en-26-ato de metilo (12)

Los campos estéricos que favorecen (■) y no favorecen (▨) la actividad; campos de carga electropositiva (⋯) electronegativa (▨) que contribuyen con la actividad.

VI. CONCLUSIONES

A continuación se presentan las principales contribuciones de la presente investigación.

1. El estudio de cristalografía de rayos X proporciona las estructuras tridimensionales con estereoquímica y configuraciones absolutas de los derivados **5**, **15** y **16**: El compuesto **5** presenta un centro S en la posición 25, y los compuestos **15** y **16** muestran una lactona de 7 miembros en el anillo A y un α -epóxido en el anillo B.
2. En algunas reacciones químicas se suscitan reacciones adicionales, como la isomerización del doble enlace en C-7 / C-8 en los compuestos **10**, **11** y **24** hacia los carbonos 8 y 9; la formación de una lactona en el anillo A de los productos **15** y **16**; y la obtención de la doble ligadura Δ^{24-25} con configuración *E* en los acetatos **17** y **28**.
3. La evaluación *in vivo* de la actividad antiinflamatoria de los extractos acuoso (**EA**) y hexánico (**EH**) de *A. adstringens* y de los ácidos **1** y **2** sustenta el uso popular de la especie como remedio antiinflamatorio.
4. La evaluación *in vitro* de la actividad citotóxica sobre diferentes líneas de cáncer humano del extracto **EH** y de los ácidos **1** y **2** apoya, en parte, uso etnobotánico antitumoral de la especie.
5. Los extractos **EH** y **EA** se comportaron de forma opuesta en los dos modelos de inflamación *in vivo*. Se presume que la diferente composición química de ambos extractos es el factor que determina los efectos observados, y probablemente sus acciones sobre ciertos mecanismos en la inflamación.
6. En el modelo de edema inducido por TPA, los compuestos más activos son **16** (DE_{50} 0.155 $\mu\text{mol/oreja}$), **12** (DE_{50} 0.152 $\mu\text{mol/oreja}$) y **26** (DE_{50} 0.149 $\mu\text{mol/oreja}$). Considerando en los grupos funcionales presentes estos compuestos se advierte que, la presencia de un grupo epóxido entre los carbonos C-7 y C-8, una lactona de 7 miembros en el anillo A, un grupo carbonilo o un alcohol con configuración α en el C-3, y un sustituyente éster metílico α,β -insaturado en la cadena lateral confieren una importante actividad antiinflamatoria.

7. La actividad antiinflamatoria es mínima cuando existe un éster etílico y un sistema conjugado con configuración *E* en la cadena lateral, además una doble ligadura entre los anillos B y C.
8. El estudio de relación estructura-actividad sugiere que la efectividad de los epoxiderivados **12**, **16** y **26** se relaciona con sus propiedades nucleofílicas, por lo que, es probable que los sitios de acción de estos triterpenos consistan en porciones con escasa densidad electrónica. Por el contrario, la baja actividad se asocia con la electrofilicidad de las moléculas.
9. El compuesto **12** se propone como una nueva molécula cabeza de serie a partir de la cual se podrían desarrollar nuevas moléculas antiinflamatorias. Las modificaciones propuestas para incrementar la actividad son adicionar un sustituyente voluminoso en C-31, grupos electropositivos en C-27 y electronegativos en C-3.
10. El grupo éster metílico terminal y el enlace simple en C-24 / C-25 no contribuyen con la actividad en el modelo de edema inducido por carragenina. Considerando que la carragenina actúa principalmente a través de la enzima COX, es factible que los triterpenos **1**, **2** y **3** interfieran con la enzima. Por el contrario, probablemente los derivados **6**, **7** y **21** no actúan sobre la COX.
11. Los ácidos **1** y **2** reducen considerablemente la producción de NO en macrófagos activados por LPS, sin embargo, ocasionan gran muerte celular. Aunque, los efectos de estos ácidos contra el NO son reflejo de sus toxicidades, probablemente, la reducción de la población de macrófagos contribuye con los efectos antiinflamatorios de los ácidos **1** y **2**.
12. Las efectivas respuestas de los derivados **6**, **12** y **16** en el modelo de edema inducido por TPA no se asocian con alguna acción sobre la enzima 5-lipoxigenasa, ya que los compuestos mostraron datos imprecisos en el ensayo de producción de LTB₄ en LPMN activados.
13. Se demostraron los efectos de citotoxicidad en 5 líneas celulares de cáncer humano de los triterpenos **1** y **2**, y los derivados **3**, **4**, **5**, **6**, **7**, **8**, **12**, **16** y **21**. Probablemente, los efectos observados se relacionan con sus habilidades para promover la producción del NO.

14. El análisis de los grupos funcionales presentes en los compuestos evaluados en el ensayo de citotoxicidad descubre lo siguiente: la presencia de un grupo ácido carboxílico no conjugado en la cadena lateral y un hidroxilo en C-3 confieren capacidad citotóxica. Por el contrario, la presencia de un grupo éster metílico conjugado, un carbonilo en C-3, o un epóxido endocíclico se relaciona con una baja actividad.
15. El compuesto **16** no semeja las dimensiones estructurales óptimas de los ácidos **1** y **2** propuestas por Jain (1995) para inhibir la enzima PLA₂. Por lo tanto, la eficiencia de **16** en el modelo de TPA no involucra alguna acción sobre esta enzima.
16. La importancia de los resultados obtenidos en esta investigación se encuentra en los siguientes artículos.

Principles of the bark of *Amphipterygium adstringens* (Julianaceae) with anti-inflammatory activity. Oviedo-Chávez, I., Ramírez-Apan, T., Soto-Hernández, M., Martínez-Vázquez, M. *Phytomedicine*. **11**: 436–445, **2004**.

Cytotoxic activity and effect on nitric oxide production of tirucallane-type triterpenes. Oviedo-Chávez, I., Ramírez-Apan, T., Martínez-Vázquez, M. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **57**: 1087–1091, **2005**.

BIBLIOGRAFÍA

- Abe, I.; Rohmer, M.; Prestwich, G. D. Enzymatic cyclization of squalene and oxidosqualene to sterols and triterpenes. *Chemical Reviews*. **1993**; 93: 2189-2206.
- Adcock, I. M. Molecular mechanisms of glucocorticoids actions. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*. **2000**; 13: 115-126.
- Aggarwal, B. B.; Sethi, G.; Nair, A.; Ichikawa, H. Nuclear factor- κ B: A holy grail in cancer prevention and therapy. *Current Signal Transduction Therapy*. **2006**; 1: 25-52.
- Akihisa, T. & Yasukawa, K. Antitumor-promoting and anti-inflammatory activities of triterpenoids and sterols from plants and fungi. En: *Studies in Natural Products Chemistry*, Vol. 25. Ed. por Atta-Ur-Rahman, Elsevier Science, Amsterdam, **2001**; 43-87.
- Albert, D.; Buerkert, E.; Steinhilber, D.; Werz, O. Induction of 5-lipoxygenase activation in polymorphonuclear leukocytes by 1-oleoyl-2-acetyl-glycerol. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*. **2003**; 1631: 85-93.
- Albertella, M. R.; Lau, A.; O'Connor, M. J. The overexpression of specialized DNA polymerases in cancer. *DNA Repair*. **2005**; 4: 583-593.
- Anwarul, H. G. & Atta-ur-Rahman. Perspective paper: Trends in ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*. **2005**; 100: 43-49.
- Argueta, V. A.; Cano, L.; Rodarte, M. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Instituto Indigenista. México. **1994**; 542-543.
- Argumedo, D. R.; Parra-Delgado, H.; Ramírez, A. M. T.; Nieto, C. A.; Martínez-Vázquez, M. Isolation and chemical transformations of some anti-inflammatory triterpenes from *Salvia mexicana* L. var. *minor* Benth. *Revista de la Sociedad Química de México*. **2003**; 47: 167-172.
- Arrieta, J.; Benítez, J.; Flores, E.; Castillo, C.; Navarrete, A. Purification of gastroprotective triterpenoids from the stem bark of *Amphipterygium adstringens*; role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons. *Planta Medica*. **2003**; 69: 905-909.
- Assimopoulou, A. N. & Papageorgiou, V. P. GC-MS analysis of penta- and tetra-cyclic triterpenes from resins of *Pistacia* species. Part I. *Pistacia lentiscus* var. *Chia*. *Biomedical Chromatography*. **2005**; 19: 285-311.
- Barton, D. H. R. & Seoane, E. Triterpenoids. Part XXII. The constitution and stereochemistry of masticadienonic acid. *Journal of the Chemical Society*. **1956**; 4150-4157.
- Borne, R. F. Non-steroidal anti-inflammatory drugs. In: Foye, W. O.; Lemke, T. L.; Williams, D. A. *Principles of Medical Chemistry*. 4^a ed. Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore, EU. **1995**, 535-580.
- Boudsocq, F.; Benaim, P.; Canitrot, Y.; Knibiehler, M.; Ausseil, F.; Capp, J. P.; Bieth, A.; Long, C.; David, B.; Shevelev, I.; Frierich-Heinecken, E.; Hübscher, U.; Amalric, F.; Massiot, G.; Hoffmann, J. S.; Cazaux, C. Modulation of cellular response to cisplatin by a novel inhibitor of DNA polymerase β . *Molecular Pharmacology*. **2005**; 67: 1485-1492.
- Bowden, G. T. Prevention of non-melanoma skin cancer by targeting ultraviolet-B-light signalling. *Nature Reviews Cancer*. **2004**; 4: 23-35.
- Bradley, M. & Waller, C. L. Polarizability fields for use in three-dimensional quantitative structure-activity relationship (3D-QSAR). *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*. **2001**; 41: 1301-1307.

- Çalis, I.; Yuruker, A.; Tasdemir, D.; Wright, A. D.; Sticher, O.; Luo, Y. D.; Pezzuto, J. M. Cycloartane triterpene glycosides from the roots of *Astragalus melanophurius*. *Planta Medica*. **1997**; 63: 183-186.
- Calixto, J. B.; Campos, M. M.; Otuki, M. F.; Santos, A. R. S. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Medica*. **2004**; 70: 93-103.
- Calixto, J. B.; Otuki, M. F.; Santos, A. R. S. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor κ B (NF- κ B). *Planta Medica*. **2003**; 69: 973-983.
- Cantrell, C. L.; Lu, T.; Fronczek, F. R.; Fischer, N. H.; Adams, L. B.; Franzblau, S. G. Antimycobacterial cycloartanes from *Borrchia frutescens*. *Journal of Natural Products*. **1996**; 59: 1131-1136.
- Chattopadhyay, D.; Arunachalam, G.; Mandal, A. B.; Sur, T. K.; Mandal, S. C.; Bhattacharya, S. K. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of folklore: *Mallotus peltatus* leaf extract. *Journal of Ethnopharmacology*. **2002**; 82: 229-237.
- Choi, C. Y.; You, H. J.; Jeong, H. G. Nitric oxide and tumor necrosis factor- α production by oleanolic acid via nuclear factor- κ B activation in macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **2001**; 288: 49-55.
- Cirino, G. Multiple controls in inflammation. *Biochemical Pharmacology*. **1998**; 55: 105-111.
- Connelly, L.; Palacios-Callender, M.; Ameixa, C.; Moncada, S.; Hobbs, A. J. Biphasic regulation of NF- κ B activity underlies the pro- and anti-inflammatory actions of nitric oxide. *Journal of Immunology*. **2001**; 166: 3873-3881.
- Connolly, J. D. & Hill, R. A. Triterpenoids. *Natural Product Reports*. **2005**; 22: 487-503.
- Coussens, L. M. & Werb, Z. Inflammation and cancer. *Nature*. **2002**; 420: 860-867.
- Cramer, R. D. III; Patterson, D. E.; Bunce, J. D. Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA). 1. Effect of Shape on Binding of Steroids to Carrier Proteins. *Journal of the American Chemical Society*. **1988**; 110: 5959-5967.
- D'Acquisto, F.; May, M. J.; Ghosh, S. Inhibition of nuclear factor kappa B (NF- κ B): An Emerging Theme in Anti-Inflammatory Therapies. *Molecular Interventions*. **2002**; 2: 22-35.
- Davis, K. L.; Martin, E.; Turko, I. V.; Murad, F. Novel effects of nitric oxide. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. **2001**; 41: 203-236.
- De Young, L. M.; Kheifets, J. B.; Ballaron, S. L.; Young, J. M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents and Actions*. **1989**; 26: 335-341.
- Del Rayo, C. M.; Mata, R.; Castañeda, P.; Kirby, G. C.; Warhurst, D. C.; Croft, S. L.; Phillipson, J. D. Bioactive compounds from *Celaenodendron mexicanum*. *Planta Medica*. **2000**; 66: 463-468.
- Di Rosa M. & Willoughby D. A. Screens for anti-inflammatory drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **1971**; 23: 297-300.
- Di Rosa, M. Biological properties of carrageenan. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **1972**; 24: 89-102.

- Di Rosa, M.; Giroud, J. P.; Willoughby, D. A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *Journal of Pathology*. **1971**; 104: 15-29.
- Dirsch, V. M.; Stuppner, H.; Vollmar, A. M. The Griess assay: Suitable for a bio-guided fractionation of anti-inflammatory plant extract?. *Planta Medica*. **1998**; 64: 423-426.
- Domínguez, X. A.; Franco, R.; García, S.; Porras, M. E.; Vázquez, G.; Amescua, B. Plantas medicinales mexicanas. XLVIII: Estructura del ácido instipolinácico separado de la corteza del cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*). *Revista Latinoamericana de Química*. **1983**; 14: 99-100.
- Domínguez, X. A.; Soriano, M.; Vera, L. C.; Butruille, D. L'acide masticadienonique de *Pistacia mexicana*. *Phytochemistry*. **1974**; 13: 656.
- España, F. F.; Medina, P. B.; Navarro, S. R.; Estellés, A. C.; Aznar, J. L. El Sistema multifuncional de la Proteína C. *Haematologica*. **2004**; 89: 20-25.
- Espinós, D.; López, A.; Calvo, E. Bases farmacológicas y tratamiento de la inflamación. En: Monografía XV, Nuevos avances en medicamentos. Eds. Avendaño, C. & Tamargo, J. Real Academia Nacional de Farmacia-España. **2004**; 237-286.
- Fantone J. C. & Ward P. A. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *American Journal of Pathology*. **1982**; 110: 963-968.
- Feihl, F.; Oddo, M.; Waeber, B.; Liaudet, L. Inhibitors of nitrogen oxide species production in animal models of inflammation and future directions for therapy in inflammatory disorders. *Current Medicinal Chemistry – Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents*. **2004**; 3: 239-259.
- Ferreira, S. H.; Moncada, S.; Vane, J. R. Indomethacin and aspirin abolish prostaglandin release from the spleen. *Nature: New Biology*. **1971**; 231: 237-239.
- Fung, H. B. & Kirschenbaum H. L. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors for the treatment of arthritis. *Clinical Therapeutics*. **1999**; 21: 1131-1157.
- Fürstenberger, G.; Berry, D. L.; Sorg, B.; Marks, F. Skin tumor promotion by phorbol esters is a two-stage process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A*. **1981**; 78: 7722-7726.
- Fürstenberger, G.; Gross, M.; Marks, F. Eicosanoids and multistage carcinogenesis in NMRI mouse skin: role of prostaglandins E and F in conversion (first stage of tumor promotion) and promotion (second stage of tumor promotion). *Carcinogenesis*. **1989**; 10: 91-96.
- Fushiya, S.; Kabe, Y.; Ikegaya, Y.; Takano, F. (+)-Rhododendrol and epi-rhododendrin suppress the NO production by activated macrophages *in vivo*. *Planta Medica*. **1998**; 64: 598-602.
- Gan, K. H.; Fann, Y. F.; Hsu, S. H.; Kuo, K. W.; Lin, C. N. 1998. Mediation of the cytotoxicity of lanostanoids and steroids of *Ganoderma tsugae* through apoptosis and cell cycle. *Journal of Natural Products*. **1998**; 61: 485-487.
- Giner-Larza, E. M.; Máñez, S.; Giner, R. M.; Recio, M. C.; Prieto, J. M.; Cerdá-Nicolás, M.; Ríos, J. L. Anti-inflammatory triterpenes from *Pistacia terebinthus* galls. *Planta Medica*. **2002**; 68: 311-315.
- González, E. E. & Delgado, J. N. Phytochemical investigation of *Amphipterygium adstringens*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **1962**; 51: 786-790.

- Hayakawa, M.; Miyashita, H.; Sakamoto, I.; Kitagawa, M.; Tanaka, H.; Yasuda, H.; Karin, M.; Kikugawa, K. Evidence that reactive oxygen species do not mediate NF- κ B activation. *European Molecular Biology Organization Journal*. **2003**; 22: 3356-3366.
- Hayden, M. S. & Ghosh, S. Signaling to NF- κ B. *Genes & Development*. **2004**; 18: 2195-2224.
- Hecker, E. Cocarcinogenic principles from the seed oil of *Croton tiglium* and from other Euphorbiaceae. *Cancer Research*. **1968**; 28: 2338-2349.
- Hersch-Martínez, P. Comercialization of wild medicinal plants from southwest Puebla-México. *Economic Botany*. **1995**; 49: 197-206.
- Hoult, J. R. S.; Moroney, M. A.; Payá, M. Action of flavonoids and coumarins on lipoxygenase and cyclooxygenase. En: *Methods in Enzymology*, Vol. 234, Academic Press, Nueva York, **1994**; 443-454.
- Hübscher, U.; Maga, G.; Spadari, S. Eukaryotic DNA polymerases. *Annual Reviews of Biochemistry*. **2002**; 71: 133-163.
- Jain, M. K.; Yu, B. Z.; Rogers, J. M.; Smith, A. E.; Boger, E. T. A.; Ostrander, R. L.; Rheingold, A. L. Specific competitive inhibitor of secreted phospholipase A₂ from berries of *Schinus terebinthifolius*. *Phytochemistry*. **1995**; 39: 537-547.
- Jeong, H. G. & Choi, C. Y. Expression of inducible nitric oxide synthase by α -hederin in macrophages. *Planta Medica*. **2002**; 68: 392-396.
- Karin, M. & Greten, F. R. NF- κ B: Linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nature Reviews Immunology*. **2005**; 5: 749-759.
- Kier, L. B.; Lehn, J. M.; Ourisson, G. Nuclear magnetic resonance (N.M.R.) of natural products. IV. Structure and stereochemistry of terebinthone and of schinol. *Bulletin de la Société Chimique de France*. **1963**; 4: 911-912.
- Langridge, R.; Ferrin, T. E.; Kuntz, I. D.; Connolly, M. L. Real-time color graphics in studies of molecular interactions. *Science*. **1981**; 211: 661-666.
- Lawrence, T.; Willoughby, D. A.; Gilroy, D. W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nature Reviews Immunology*. **2002**; 2: 787-795.
- Laye, J. P. & Gill, J. H. Phospholipase A₂ expression in tumours: a target for therapeutic intervention? *Drug Discovery Today*. **2003**; 8: 710-716.
- Liu, H.; Heilmann, J.; Rali, T.; Sticher, O. New tirucallane-type triterpenes from *Dysoxylum variable*. *Journal of Natural Products*. **2001**; 64: 159-163.
- Mahato, S. B. & Sen, S. Advances in triterpenoid research, 1990-1994. *Phytochemistry*. **1997**; 44: 1185-1236.
- Makino, M.; Motegi, T.; Fujimoto, Y. Tirucallane-type triterpenes from *Juliania adstringens*. *Phytochemistry*. **2004**; 65: 891-896.
- Malgor, L. A. & Valsecia, M. E. Prostaglandinas y productos relacionados. En: *Farmacología Médica* Vol. 4. **2000**; 93-111. Disponible en http://med.unne.edu.ar/catedras/farmacologia/temas_farma/indice_v4.htm.
- Martínez, M. Plantas medicinales de México. 6ª ed. Botas. México. **1992**; 404.
- Martínez, R. E. & Flores, G. R. **2003**. Estudio de la acción anti-clastogénica del cuachalalate (*Amphipterygium*

- adstringens*) sobre la inducción de micronúcleos producidos por ifosfamida. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, México. 32-50.
- Martínez, R.; Avila, Z. G.; Duran, M. E.; Ramírez, A. T.; Cañas, R. Synthesis of novel furo, thieno and benzazetoazepines and evaluation of their cytotoxicity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2002**; 12: 1675-1677.
- Mata, R.; Calzada, F.; Navarrete, A.; Del Río, F.; Delgado, G. Long-chain phenols from the bark of *Amphipterygium adstringens*. *Journal of Ethnopharmacology*. **1991**; 34: 147-154.
- Monaco, P.; Caputo, R.; Palumbo, G.; Mangoni, L. Triterpene components of galls on the leaves of *Pistacia terebinthus*, produced by *Pemphigus semilunarius*. *Phytochemistry*. **1974**; 13: 1992-1993.
- Moncada, S.; Palmer, R. M.; Higgs, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews*. **1991**; 43: 109-142.
- Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paul, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A.; Gray-Goodrich, M.; Campbell, H.; Mayo, J.; Boyd, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*. **1991**; 38: 757-766.
- Montuschi, P.; Barnes, P. J.; Roberts II, L. J. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *FASEB Journal*. **2004**; 18: 1791-1800.
- Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. **1983**; 65: 55-63.
- Mulholland, D. A. & Nair, J. J. Triterpenoids from *Dysoxylum peltigrewianum*. *Phytochemistry*. **1994**; 37: 1409-1411.
- Nam, K. Y.; Morino, A.; Kimura, S.; Fujiki, H.; Imanishi, Y. Modulation of phospholipase A2 activity by the tumour promoters phorbol esters and teleocidin. *Biochemical Journal*. **1990**; 268: 169-173.
- Nathan, C. Points of control in inflammation. *Nature*. **2002**; 420: 846-852.
- Navarrete A. **1982**. Estudio químico y pruebas farmacológicas preliminares de la corteza de *Juliania adstringens* (cuachalalate). Tesis profesional. ENEP-Zaragoza, UNAM. México.
- Navarrete, A.; Martínez-Urbe, L. S.; Reyes, B. Gastroprotective activity of the stem bark of *Amphipterygium adstringens* in rats. *Phytotherapy Research*. **1998**; 12: 1-4.
- Navarrete, A.; Mata, R.; Delgado, G. Alkylacardic acids from *Amphipterygium adstringens*. *Planta Medica*. **1989**; 55: 579.
- Navarrete, A.; Oliva, I.; Sánchez-Mendoza, M.; Arrieta, J.; Cruz-Antonio, L.; Castañeda-Hernández, G. Gastroprotection and effect of the simultaneous administration of cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) on the pharmacokinetics and anti-inflammatory activity of diclofenac in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **2005**; 57: 1629-1636.
- Nevalainen, T. J.; Haapamäki, M. M.; Grönroos, J. M. Roles of secretory phospholipases A₂ in inflammatory diseases and trauma. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. **2000**; 1488: 83-90.
- Newton, R. Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? *Thorax*. **2000**; 55: 603-613.

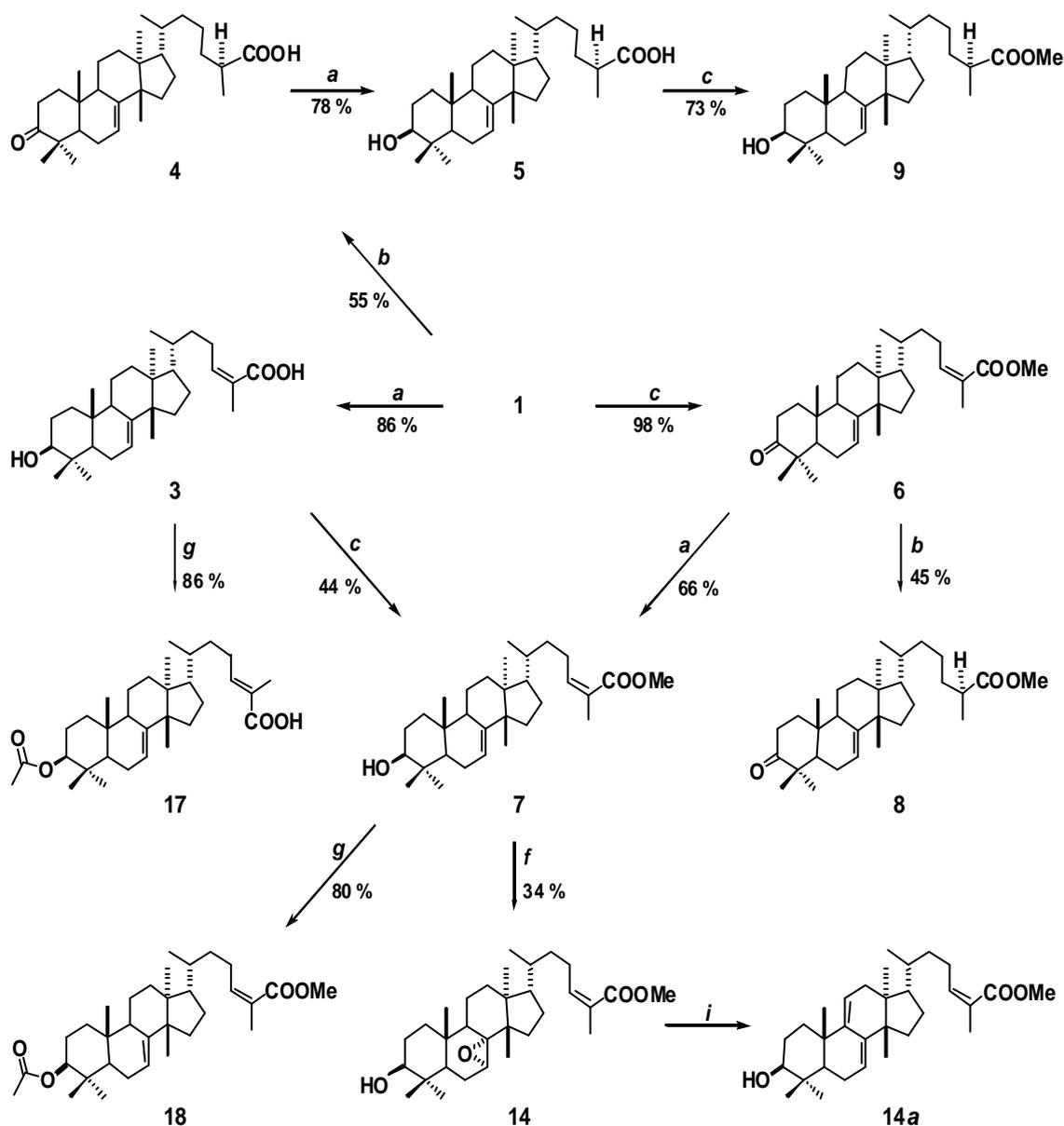
- Olivera, O. G.; Soto, H. M.; Martínez, V. M.; Terrazas, S. T.; Solares, A. F. Phytochemical study of cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* Schiede ex. Schlecht). *Journal of Ethnopharmacology*. **1999**; 68: 109-113.
- Omote, K.; Hazama, K.; Kawamata, T.; Kawamata, M.; Nakayaka, Y.; Toriyabe, M.; Namiki, A. Peripheral nitric oxide in carrageenan-induced inflammation. *Brain Research*. **2001**; 912: 171-175.
- Oviedo-Chávez, I., Ramírez-Apan, T., Soto-Hernández, M., Martínez-Vázquez, M. Principles of the bark of *Amphipterygium adstringens* (Julianaceae) with anti-inflammatory activity. *Phytomedicine*. **2004**; 11: 436-445.
- Oviedo-Chávez, I., Ramírez-Apan, T., Martínez-Vázquez, M. Cytotoxic activity and effect on nitric oxide production of tirucallane-type triterpenes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **2005**; 57: 1087-1091.
- Papageorgiou, V. P.; Bakola-Christianopoulou, M. N.; Apazidou, K. K.; Psarros, E. E. Gas chromatographic-mass spectroscopic analysis of the acidic triterpenic fraction of mastic gum. *Journal of Chromatography A*. **1997**; 769: 263-273.
- Patocka, J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. *Journal of Applied Biomedicine*. **2003**; 1: 7-12.
- Posadas, I.; Bucci, M.; Roviezzo, F.; Rossi, A.; Parente, L.; Sautebin, L.; Cirino G. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *British Journal of Pharmacology*. **2004**; 142: 331-338.
- Pozzo-Balbi, T.; Nobile, L.; Scapini, G.; Cini, M. The triterpenoid acids of *Schinus molle*. *Phytochemistry*. **1978**; 17: 2107-2110.
- Prasad, R.; Beard, W. A.; Chyan, J. Y.; Maciejewski, M. W.; Mullen, G. P.; Wilson, S. H. Functional analysis of the amino-terminal 8-kDa domain of DNA polymerase β as revealed by site-directed mutagenesis. DNA binding and 5'-deoxyribose phosphate lyase activities. *Journal of Biological Chemistry*. **1998**; 273: 11121-11126.
- Rao, C. V. & Reddy, B. S. NSAIDs and chemoprevention. *Current Cancer Drug Targets*. **2004**; 4: 29-42.
- Ricupero, D.; Taylor, L.; Tlucko, A.; Navarro, J.; Polgar, P. Mechanisms in bradykinin stimulated arachidonate release and synthesis of prostaglandin and platelet activating factor. *Mediators of Inflammation*. **1992**; 1: 133-140.
- Rivero-Cruz, I.; Acevedo, L.; Guerrero, J. A.; Martínez, S.; Bye, R.; Pereda-Miranda, R.; Franzblau, S.; Timmermann, B. N.; Mata, R. Antimycobacterial agents from selected mexican medicinal plants. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **2005**; 57: 1117-1126.
- Rubbo, H.; Radi, R.; Trujillo, M.; Telleri, R.; Kalyanaraman, B.; Barnes, S.; Kirk, M.; Freeman, B. A. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. *Journal of Biological Chemistry*. **1994**; 269: 26066-26075.
- Safayhi, H. & Sailer, E. R. Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes. *Planta Medica*. **1997**; 63: 487-493.
- Salvemini, D.; Wang, Z. Q.; Wyatt, P. S.; Bourdon, D. M.; Marino, M. H.; Manning, P. T.; Currie, M. G. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *British Journal of Pharmacology*. **1996**; 118: 829-838.
- Setzer, W. N. & Setzer, M. C. Plant-derived triterpenoids as potential antineoplastic agents. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. **2003**; 3: 540-556.

- Shanley, T. P.; Warner, R. L.; Ward, P. A. The role of cytokines and adhesion molecules in the development of inflammatory injury. *Molecular Medicine Today*. **1995**; 1: 40-45.
- Shishodia, S.; Majumdar, S.; Banerjee, S.; Aggarwal, B. B. Ursolic acid inhibits nuclear factor- κ B activation induced by carcinogenic agents through suppression of κ B α kinase and p65 phosphorylation: Correlation with down-regulation of cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 9, and cyclin D1. *Cancer Research*. **2003**; 63: 4375-4383.
- Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of National Cancer Institute*. **1990**; 82: 1107-1112.
- Smith, W. L.; DeWitt, D. L.; Garavito, M. R. Cyclooxygenases: Structural, cellular, and molecular biology. *Annual Review of Biochemistry*. **2000**; 69: 145-182.
- Soriano-García, M.; Toscano, R. A.; Ortiz, B.; Navarrete, A.; Sánchez-Obregón, R.; Barrios, H.; Yuste, F. Structure and stereochemistry of the methyl ester of (5 α , 13 α , 14 β , 17 α , 20S, 24Z)-3-oxolanosta-7, 24-dien-26-oic acid (masticadienonic acid). *Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications*. **1987**; C43: 990-992.
- Suh, N.; Honda, T.; Finlay, H. J.; Barchowsky, A.; Williams, C.; Benoit, N. E.; Xie, Q. W.; Nathan, C.; Gribble, G. W.; Sporn, M. B. Novel triterpenoids suppress inducible nitric oxide synthase (iNOS) and inducible cyclooxygenase (COX-2) in mouse macrophages. *Cancer Research*. **1998**; 58: 717-723.
- Tallarida, R. J. & Murray, R. B. Part I: Computational procedures. En: Manual of pharmacologic calculations with computer programs. Springer, Nueva York, EU. **1981**; 5-10, 47-57.
- Tardón-García, A. Biología molecular y celular del cáncer. En: Astures: Boletín informativo de la Sociedad Asturiana de medicina y seguridad en el trabajo. Asturias, Oviedo, España. **2001**; 11: 3-6.
- Thannickal, V. J. & Fanburg, B. L. Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. **2000**; 279: L1005-L1028.
- Tithof, P. K.; Peters-Golden, M.; Ganey, P. E. Distinct phospholipases A_2 regulate the release of arachidonic acid for eicosanoid production and superoxide anion generation in neutrophils. *Journal of Immunology*. **1998**; 160: 953-960.
- Titos-Rodríguez, E. **2004**. Biosíntesis de mediadores lipídicos derivados de la 5-lipooxigenasa en el sinusoide hepático. Implicaciones en la fibrogénesis hepática. Tesis de Doctorado. Universidad de Barcelona, Barcelona, España. 1-3.
- Watson, W. H.; Domínguez, X. A.; Vázquez, G.; García, S. Cuachalalic acid, a new triterpene from *Amphipterygium adstringens*. *Revista Latinoamericana de Química*. **1987**; 18: 89-90.
- Wendt, K. U.; Schulz, G. E.; Corey, E. J.; Liu, D. R. Enzyme mechanisms for polycyclic triterpene formation. *Angewandte Chemie-International Edition*. **2000**; 39: 2812-2833.
- Werz, O.; Klemm, J.; Samuelsson, B.; Rådmark, O. *Blood*. **2001**; 97: 2487-2495.
- Willoughby, D. A. In vivo models of inflammation. En: Inflammation protocols. Methods in Molecular Biology. Editado por Willoughby, D. A. & Winyard, P. G. Humana Press. Totowa, EUA. **2003**; 109-138.

-
- Wink D. A. & Mitchell J. B. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radical Biology and Medicine*. **1998**; 25: 434-456.
- Winter, C. A.; Risley, E. A.; Nuss, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. **1962**; 111: 544-547.
- Wu, C. C. Nitric oxide and inflammation. *Current Medicinal Chemistry—Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents*. **2004**; 3: 217-222.
- Yamamoto, Y. & Gaynor, R. B. Therapeutic potential of inhibition of the NF- κ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. *Journal of Clinical Investigation*. **2001**; 107: 135-142.
- Yogeeswari, P. & Sriram, D. Betulinic acid and its derivatives: A review on their biological properties. *Current Medicinal Chemistry*. **2005**; 12: 657-666.
- You, H. J.; Choi, C. Y.; Kim, J. Y.; Park, S. J.; Hahm, K. S.; Jeong, H. G. Ursolic acid enhances nitric oxide and tumor necrosis factor- α production via nuclear factor- κ B activation in the resting macrophages. *FEBS Letters*. **2001**; 509: 156-160.

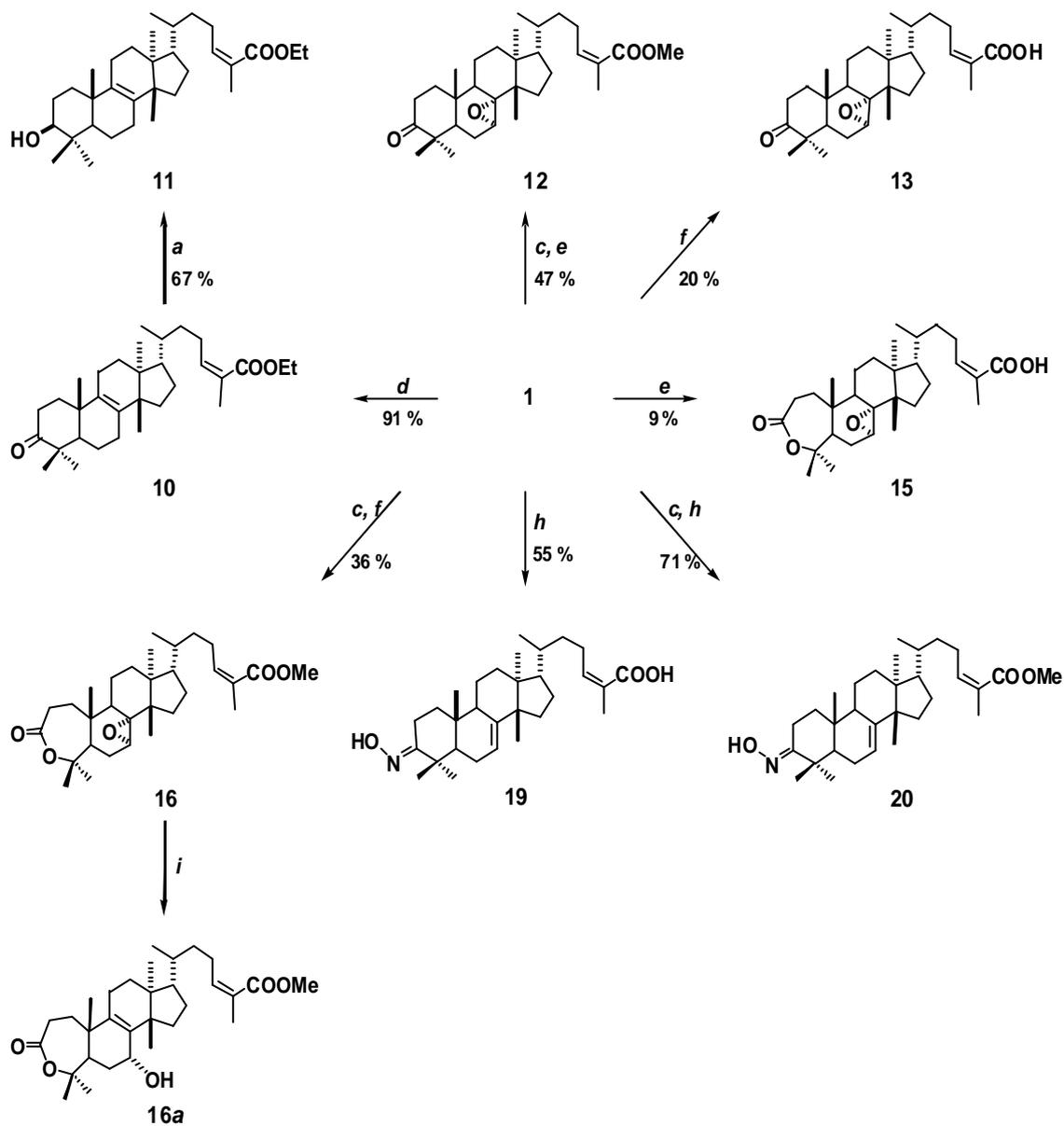
***ANEXO A
REACCIONES
QUÍMICAS***

MODIFICACIONES QUÍMICAS DEL ÁCIDO MASTICADIENOICO (1)



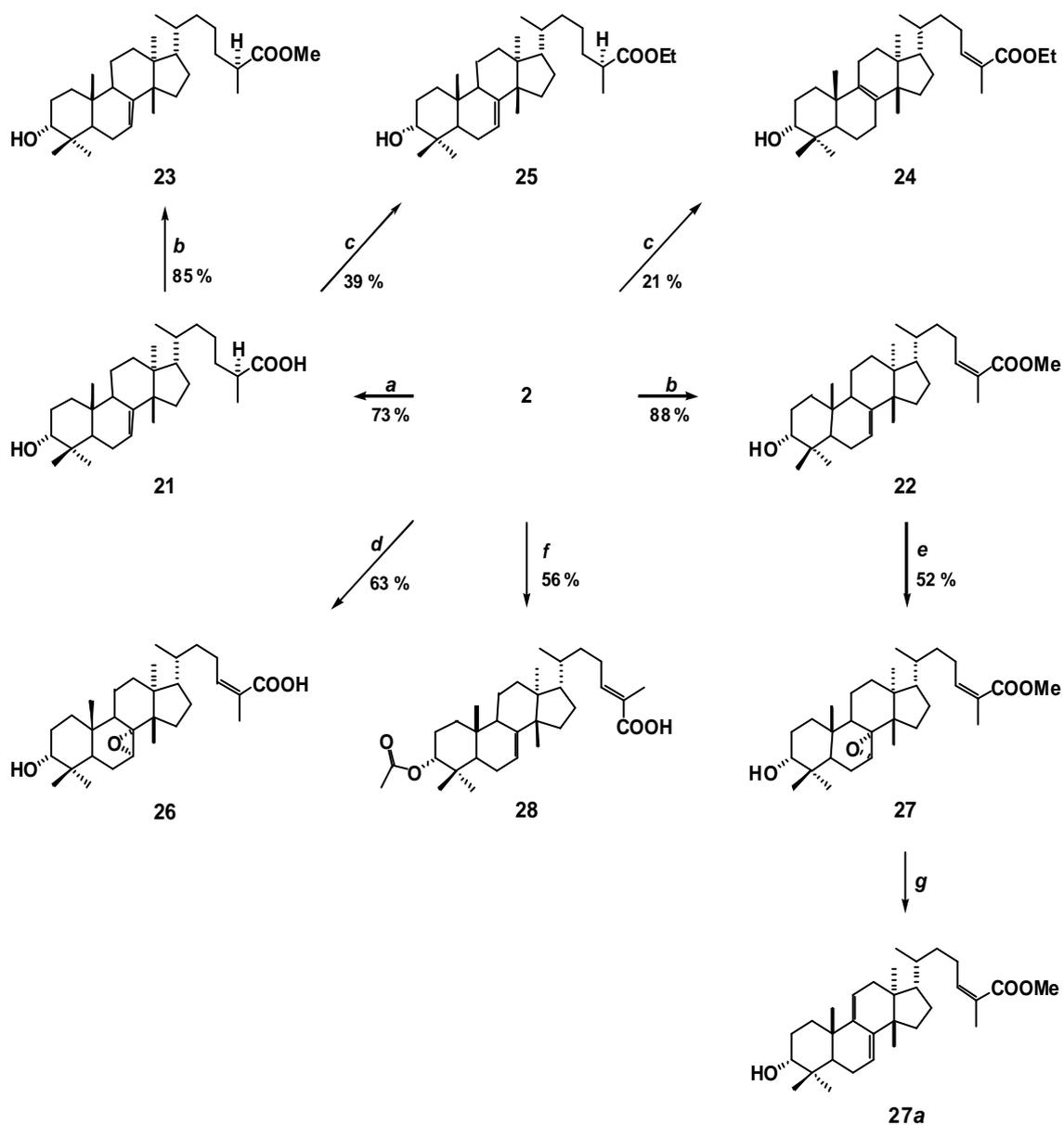
a: NaBH₄, MeOH/H₂O; *b:* H₂, Pd/C, AcOEt; *c:* CH₂N₂, Et₂O; *d:* EtOH, H; *e:* *m*-CPBA, CH₂Cl₂/NaHCO₃; *f:* CH₃CO₃H, AcOEt o CH₂Cl₂/NaHCO₃ o Na₂CO₃; *g:* Ac₂O, piridina; *h:* NH₂OHHCl, AcONa/MeOH o piridina; *i:* CDCl₃.

Continuación modificaciones químicas de 1



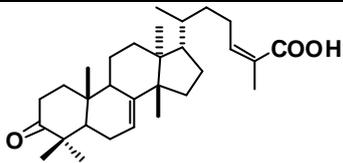
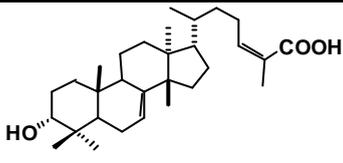
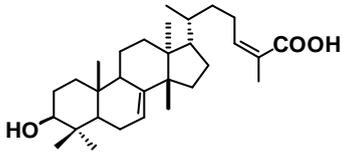
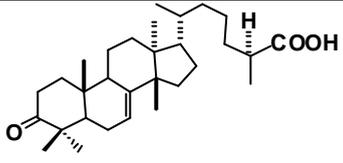
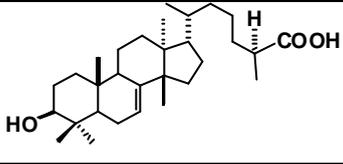
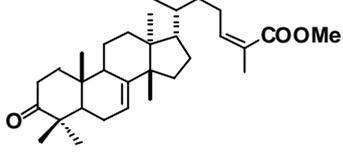
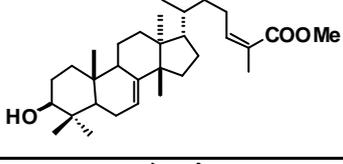
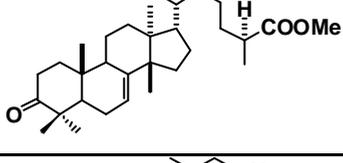
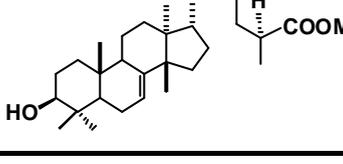
a: NaBH₄, MeOH/H₂O; *b*: H₂, Pd/C, AcOEt; *c*: CH₂N₂, Et₂O; *d*: EtOH, H; *e*: *m*-CPBA, CH₂Cl₂/NaHCO₃; *f*: CH₃CO₃H, AcOEt o CH₂Cl₂/NaHCO₃ o Na₂CO₃; *g*: Ac₂O, piridina; *h*: NH₂OHHCl, AcONa/MeOH o piridina; *i*: CDCl₃.

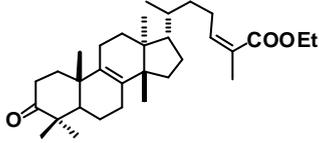
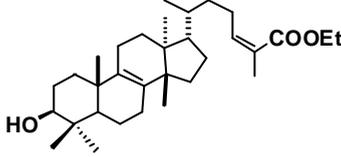
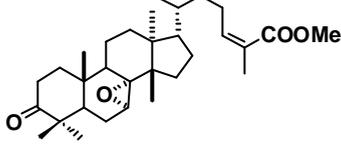
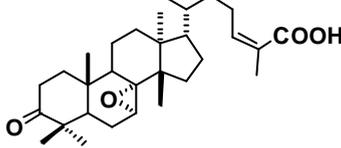
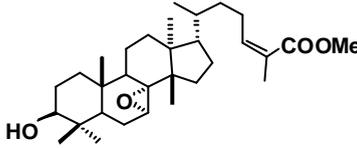
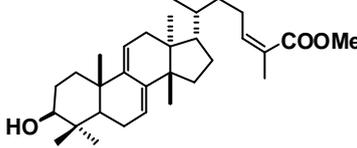
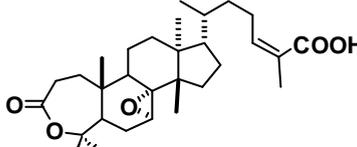
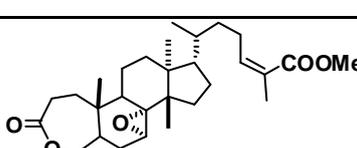
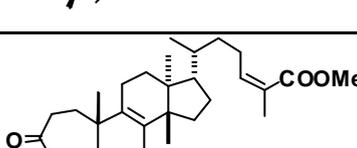
MODIFICACIONES QUÍMICAS DEL ÁCIDO 3-EPIMASTICADIENOLICO (2)

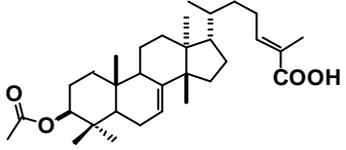
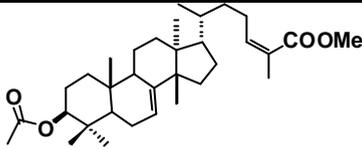
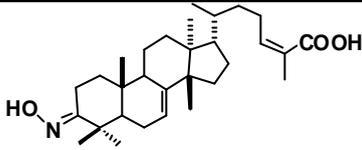
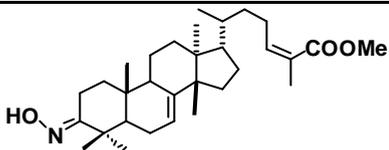
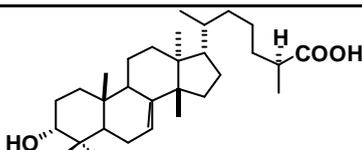
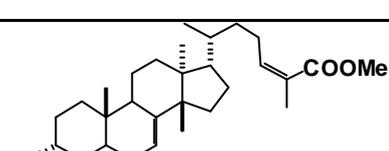
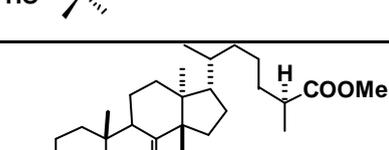
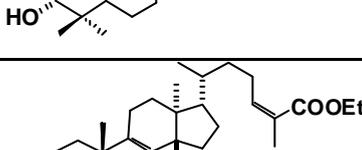
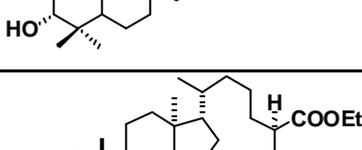


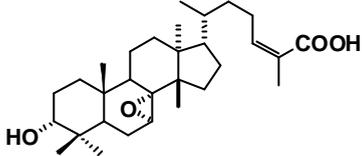
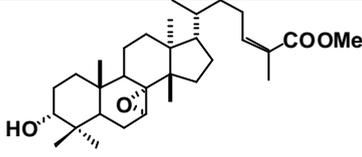
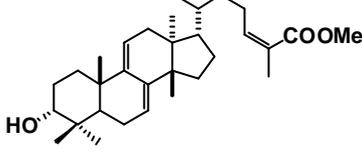
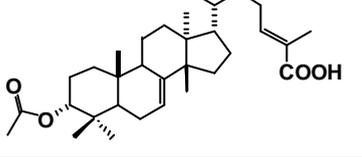
a: H₂, Pd/C, AcOEt; **b:** CH₂N₂, CH₂Cl₂ o Et₂O; **c:** EtOH, H⁺; **d:** *m*-CPBA, MeOH/CH₂Cl₂; **e:** CH₃CO₂H, CH₂Cl₂/NaHCO₃; **f:** Ac₂O, piridina; **g:** CDCl₃.

ANEXO B
TRITERPENOS EN
ESTUDIO

Compuesto	Estructura química	Fórmula química	Peso fórmula	pf (°C)
Ácido masticadienoico (1)		C ₃₀ H ₄₆ O ₃	454.68	164-172
Ácido 3-epimasticadienólico (2)		C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456.70	142-150
Ácido masticadienólico (3)		C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456.70	160-170
Ácido 24-25S-dihidromasticadienoico (4)		C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456.70	140-142
Ácido 24-25S-dihidromasticadienólico (5)		C ₃₀ H ₅₀ O ₃	458.72	170-178
Masticadienoato de metilo (6)		C ₃₁ H ₄₈ O ₃	468.71	120-122
Masticadienolato de metilo (7)		C ₃₁ H ₅₀ O ₃	470.73	98-108
24-25S-dihidromasticadienoato de metilo (8)		C ₃₁ H ₅₀ O ₃	470.73	67-74
24-25S-dihidromasticadienolato de metilo (9)		C ₃₁ H ₅₂ O ₃	472.74	ND (acéte)

Isomasticadienoato de etilo (10)		$C_{32}H_{50}O_3$	482.74	ND (aceite)
Isomasticadienolato de etilo (11)		$C_{32}H_{52}O_3$	484.75	75-80
3-oxo-7 <i>R</i> -8 <i>R</i> -epoxi-tirucal-24 <i>Z</i> -en-26-ato de metilo (12)		$C_{31}H_{48}O_4$	484.71	106-112
Ácido 3-oxo-7 <i>R</i> -8 <i>R</i> -epoxi-tirucal-24 <i>Z</i> -en-26-ico (13)		$C_{30}H_{46}O_4$	470.68	100-110
3 <i>S</i> -hidroxi-7 <i>R</i> -8 <i>R</i> -epoxi-tirucal-24 <i>Z</i> -en-26-ato de metilo (14)		$C_{31}H_{50}O_4$	486.73	68-78
3 <i>S</i> -hidroxi-tirucal-7 <i>Z</i> , 9 <i>Z</i> , 24 <i>Z</i> -trien-26-ato de metilo (14a)		$C_{31}H_{48}O_3$	468.71	ND
Lactona de ácido 4-hidroxi-7 <i>R</i> -8 <i>R</i> -epoxi-3, 4-seco-tirucal-24 <i>Z</i> -en-26-ico (15)		$C_{30}H_{46}O_5$	486.68	116-122
Lactona de 4-hidroxi-7 <i>R</i> -8 <i>R</i> -epoxi-3, 4-seco-tirucal-24 <i>Z</i> -en-26-ato de metilo (16)		$C_{31}H_{48}O_5$	500.71	144-150
Lactona de 4, 7 <i>R</i> -dihidroxi-3, 4-seco-tirucal-8 <i>Z</i> , 24 <i>Z</i> -dien-26-ato de metilo (16a)		$C_{31}H_{48}O_5$	500.71	ND

Ácido 3 β -acetoxi-tirucala-7 <i>E</i> , 24 <i>E</i> -dien-26-ico (17)		C ₃₂ H ₅₀ O ₄	498.74	170-172
3 β -acetoxi-tirucala-7 <i>E</i> , 24 <i>Z</i> -dien-26-ato de metilo (18)		C ₃₃ H ₅₂ O ₄	512.76	56-64
Ácido 3-hidroxiimino-masticadienoico (19)		C ₃₀ H ₄₇ NO ₃	469.70	85-90
3-hidroxiimino-masticadienoato de metilo (20)		C ₃₁ H ₄₉ NO ₃	483.73	126-128
Ácido 24-25 <i>S</i> -dihidro-3-epimasticadienólico (21)		C ₃₀ H ₅₀ O ₃	458.72	100-110
3-epimasticadienolato de metilo (22)		C ₃₁ H ₅₀ O ₃	470.73	ND (aceite)
24-25 <i>S</i> -dihidro-3-epimasticadienolato de metilo (23)		C ₃₁ H ₅₂ O ₃	472.74	ND (aceite)
3-epiisomasticadienolato de etilo (24)		C ₃₂ H ₅₂ O ₃	484.75	111-114
24-25 <i>S</i> -dihidro-3-epimasticadienolato de etilo (25)		C ₃₂ H ₅₄ O ₃	486.77	ND (aceite)

Ácido 3 <i>R</i> -hidroxi-7 <i>R</i> -8 <i>R</i> -epoxi-tirucal-24 <i>Z</i> -en-26-ico (26)		C ₃₀ H ₄₈ O ₄	472.70	128-132
3 <i>R</i> -hidroxi-7 <i>R</i> -8 <i>R</i> -epoxi-tirucal-24 <i>Z</i> -en-26-ato de metilo (27)		C ₃₁ H ₅₀ O ₄	486.73	68-72
3 <i>R</i> -hidroxi-tirucala-7 <i>Z</i> , 9 <i>Z</i> , 24 <i>Z</i> -trien-26-ato de metilo (27a)		C ₃₁ H ₄₈ O ₃	468.71	ND
Ácido 3α-acetoxi-tirucala-7 <i>E</i> , 24 <i>E</i> -dien-26-ico (28)		C ₃₂ H ₅₀ O ₄	498.74	120-122

ND = no determinado.

ANEXO C
PUBLICACIONES

Principles of the bark of *Amphipterygium adstringens* (Julianaceae) with anti-inflammatory activity

I. Oviedo-Chávez^a, T. Ramírez-Apan^a, M. Soto-Hernández^b, M. Martínez-Vázquez^{a,*}

^a Instituto de Química, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, México, D.F., Mexico

^b Colegio de Postgraduados, Km. 35.5, carretera México-Texcoco, Estado de México, Mexico

Received 7 November 2002; accepted 15 May 2003

Abstract

Despite the fact that *Amphipterygium adstringens* (usually known as “cuachalalate”) is used intensively in traditional medicine throughout México, there are, to our knowledge, no previous studies concerning the actual therapeutic, anti-inflammatory properties of this species. This lack of data prompted us to evaluate the aqueous (AE) and hexane (HE) extracts from *A. adstringens* in two models of acute inflammation: 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced ear edema and carrageenan-induced paw edema.

The results showed that HE possesses dose-dependent activity, while AE showed no anti-inflammatory effect on TPA-induced edema.

Reverse effects were found in the carrageenan test, wherein AE showed a 73.5% of inhibition of edema, while HE showed only a 14.4% activity at 100 mg/kg body weight. These results could indicate that AE and HE possess different anti-inflammatory mechanisms of action.

On the other hand, it is known that masticadienonic (**1**) and 3 α -hydroxymasticadienonic (**2**) acids are the main constituents of the organic extract of *A. adstringens* bark. Because of this knowledge, we tested **1** and **2** in the same experimental models. The results showed that **2** possesses a dose-dependent effect, while **1** does not show a dose-dependent response in TPA-induced edema. In carrageenan-induced edema tests, both **1** and **2** showed almost the same activity (approximately 44% inhibition at 100 mg/kg body weight).

In order to determine whether the anti-inflammatory activities of AE, HE, **1** and **2** are involved in the alteration of inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity, we evaluated these substances by examining nitric oxide generation in lipopolysaccharide (LPS)-activated peritoneal macrophages. The results showed that **1** presented the highest activity (93.3%), followed by **2** (86.5%), while AE (57%) and HE (33.6%) showed the lowest. In the cytotoxic MTT assay, however only **1** and **2** showed any activity whatsoever.

© 2004 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Keywords: *Amphipterygium adstringens*; Anti-inflammatory activity; Masticadienonic acid; 3 α -hydroxymasticadienonic acid; Inducible nitric oxide synthase

Introduction

Amphipterygium adstringens Schiede ex Schlecht (syn *Juliania adstringens*, Family Julianaceae) is a medicinal tree known as “cuachalalate” (Standley, 1961; Rzedowski, 1978; Pennington and Sarukhán, 1968). This

*Corresponding author. Tel.: +56224403; fax: +56162203.

E-mail address: marvaz@servidor.unam.mx
(M. Martínez-Vázquez).

plant-tree is usually used for the treatment of cholelithiasis, fevers, fresh wounds, hypercholesterolemia, gastritis, gastric ulcers, gastrointestinal cancer and various inflammatory conditions (Olivera et al., 1999). Pharmacological studies on this species have shown that the methanol and hexane extracts presented anti-ulcer and hypocholesterolemic activities, respectively (Navarrete et al., 1998; Mata et al., 1991).

Previous chemical studies on this plant have revealed the presence of masticadienonic (Soriano-García et al., 1987), instipolinacic (Dominguez et al., 1983), cuachalalic (Watson et al., 1987), 3-epi-hydroxymasticadienonic, 3 α -hydroxymasticadienonic, epi-oleanolic and isomas-ticadienonic acids, β -sitosterol and three alkyl anacardic acids (Navarrete et al., 1989).

The masticadienonic (**1**) and 3 α -hydroxymasticadienonic (**2**) acids (Fig. 1) are the principal constituents of the bark of *A. adstringens*. Both compounds are tirucallane-type triterpenes. Acids **1** and **2** have also

been isolated from *Schinus terebinthifolius* and *Pistacia terebinthus*, showing an anti-PLA₂ activity (Jain et al., 1995; Ríos et al., 2002). Furthermore, it has been suggested that there is a direct interaction between the active site region of PLA₂ and the carboxylic residue of the triterpene acids (Jain et al., 1995). It has also been reported that **1** and **2** were able to reduce the magnitude of the inflammatory processes in TPA chronic tests. Furthermore, compound **2** suppressed completely the production of leukotriene B₄ (LTB₄) from polymorphonuclear leukocytes cells (PMNL) at 100 μ M (Ríos et al., 2002). This evidence suggests that the anti-inflammatory activities of **1** and **2** likely depend on their ability to prevent the production of some pro-inflammatory mediators.

In spite of the intensive studies of the biological activities of **1** and **2**, to our knowledge, there are no reports concerning the actual anti-inflammatory activities of *A. adstringens*. This lack of data prompted us to

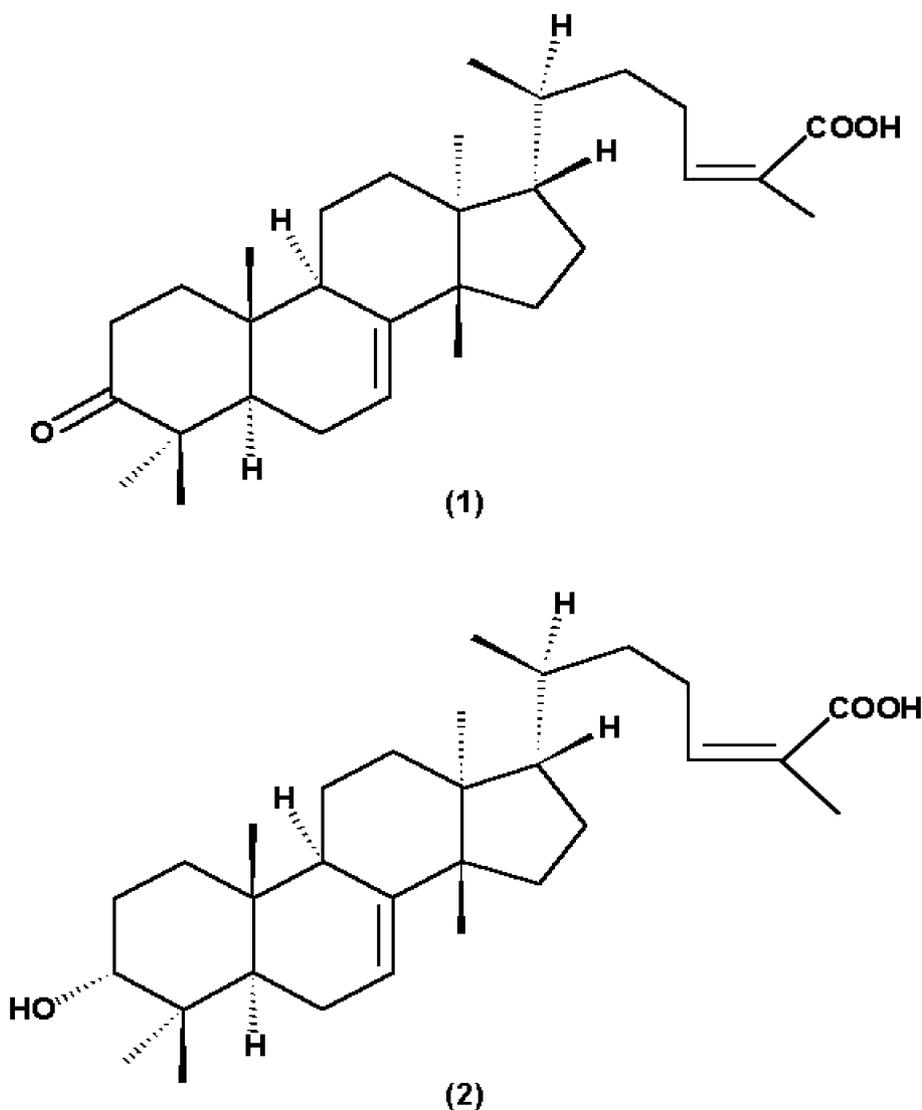


Fig. 1. Compounds from the bark of *A. adstringens*. 1-masticadienonic acid; 2 = 3 α -hydroxymasticadienonic acid.

evaluate the aqueous (**AE**) and hexane (**HE**) extracts of *A. adstringens* in the TPA and carrageenan inflammatory acute models. The results showed that only **HE** was active in the TPA test. The opposite was true for the carrageenan model, wherein **AE** was the most active. In order to determine whether **1** and **2** could account for the anti-inflammatory activity of the extracts, they were tested in the same experimental models. Finally, **AE**, **HE**, **1** and **2** were evaluated by means of nitric oxide generation in lipopolysaccharide (LPS)-activated peritoneal macrophages.

Materials and methods

General

The melting points (uncorrected) were determined on a Fisher–Johns apparatus. HPLC analysis was carried out in a Waters Model Delta Prep 4000 chromatograph, coupled with an absorbance detector UV Waters model 486 and equipped with a C-18 silica column (Pegasil ODS column, 15 cm × 4.6 mm I. D., Senshu Scientific Co.). IR spectra were recorded as KBr pellets on a Nicolet spectrophotometer model Magna 750. Mass spectra were recorded at 70 eV on a Jeol JMS-AX505HA mass spectrometer. NMR spectra were measured using Varian-Gemini 200 and Varian VXR-300 (¹H, 200 or 300 MHz; ¹³C, 75.4 MHz) spectrometers in CDCl₃ and DMSO-*d*₆ with TMS as internal standard.

Plant material

The bark of *A. adstringens* was obtained from Barranca Honda (Tlaltizapan, Morelos, Mexico) in 1997. A voucher specimen has been deposited in the Especialidad de Botánica del Colegio de Postgraduados (Texcoco, México) under register number 1531. The air-dried plant material was pulverized.

Preparation of extracts

Aqueous extract: 10 g of powdered, air-dried bark was extracted with 90 ml of boiling water, then cooled, filtered and lyophilized. The process yielded 1.44 g (14.4% w/w) of a reddish-brown solid material. *Hexane extract*. Two hundred grams of the bark were extracted exhaustively with hexane (31) for 12 h at room temperature. Evaporation of the solvent in vacuo afforded an oily residue (12 g).

Fractionation of organic extract

The organic residue (12 g) was adsorbed onto 100 g of Si-gel (Silica gel G60, 70–230 mesh, Merck) and applied

to a column of Si-gel. A gradient of hexane-EtOAc was used to elute the column, collecting 120 fractions of 200 ml each. Fractions showing similar TLC data were combined, affording five pools (F1–F5): F1 (0.5 g, fractions 1–9, eluted with hexane); F2 (1.2 g, fractions 10–38, eluted with hexane-EtOAc 9:1); F3 (0.8 g, fractions 39–45, eluted with hexane-EtOAc 8:2); F4 (0.6 g, fractions 46–79, eluted with hexane-EtOAc 7:3); and F5 (2.9 g, fractions 80–120, eluted with hexane-EtOAc 1:1 and EtOAc). Masticadienonic acid (**1**) (0.98 g, 0.49%); was isolated from F2, and 3 α -hydroxymasticadienonic acid (**2**) (0.43 g, 0.215%) from F4.

The structures of the compounds (see Fig. 1) were established by comparing spectral and physical data obtained with those reported in the literature (Barton and Seoane, 1956; Soriano-García et al., 1987; Navarrete et al., 1989; Papageorgiou et al., 1997). The purity of **1** and **2** were determined by HPLC analysis, under the following conditions: acetonitrile: water (80: 20) as mobile phase, flow rate 1 ml/min, 24 min, UV 220 nm.

Copies of the original spectra and chromatograms are obtainable from the corresponding author.

Animals

Male Wistar rats and male CD-1 mice, weighing 150–200 g and 20–25 g each, respectively, were used. Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México provided the experimental animals. All animals were held under standard laboratory conditions in the animal house (temperature 27 ± 1°C) with 12/12 light-dark cycle. They were fed laboratory diet and water ad libitum. All experiments were carried out using 4–8 animals per group.

Drugs and dosage

12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), carrageenan (carrageenan kappa-type III), indomethacin and LPS (*Escherichia coli*, Serotype 055:B5) were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Phosphate buffered-saline (PBS), Dulbecco's modified essential medium (DMEM) and fetal bovine serum (FBS) were obtained from GIBCO (Grand Island, NY, USA). Brewer thioglycollate medium was obtained from DIFCO. All other reagents were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). The reference triterpenes ursolic acid (**UA**) and pristimerin (**P**) were isolated from *Mortonia diffusa* and *Hippocratea excelsa*, respectively. The test substances (**AE**, **HE**, **1** and **2**), reference triterpenes (**UA** and **P**), and reference drugs (indomethacin, **I**, or aminoguanidine, **AG**) were tested in the following assays.

TPA-induced edema model

Effects of the test substances on TPA-induced ear edema in mice were studied as described by De Young et al. (1989), with slight modifications. The substances, applied topically, were administered from 0.031–1.0 mg/ear. Oral doses of 3.1–100 mg/kg were used for AE. Different solvents were used to dissolve the substances (see Table 1).

A solution of TPA (2.5 µg) in EtOH (10 µl) was applied topically to both faces (5 µl each face) of the right ear of the mice, 10 min after the test substances were applied (10 µl each face). The left ear received

ethanol (10 µl) first, and 20 µl of the respective solvent subsequently.

Four hours later the mice were killed by cervical dislocation. A 7-mm-diameter plug was removed from each ear. The swelling was assessed as the difference in weight between right and left ear plugs (Carlson et al., 1985). Inhibition of edema (EI, %) was calculated by the equation:

$$EI(\%) = 100 - [B \times 100/A]$$

with A = edema induced by TPA alone, and B = edema induced by TPA plus sample.

Table 1. Effect of AE, HE, and compounds **1** and **2** in the TPA-induced Edema Model

Groups	Dose (mg/ear)	Weight of ears (mg)	EI (%)	ED ₅₀ (mg/ear) value
TPA + 0.85% saline solution AE ^a	—	13.73 ± 0.25	—	
	3.1	12.80 ± 1.68	6.74	ND
	10.0	13.56 ± 0.58	1.20	
	31.0	13.56 ± 0.71	1.20	
	100.0	13.65 ± 0.44	0.55	
TPA + EtOH HE	—	14.19 ± 0.22	—	
	0.031	11.60 ± 0.72	18.2	ED ₅₀ > 1.0
	0.10	10.57 ± 0.75**	25.5**	
	0.31	9.09 ± 0.71**	36.0**	
	1.00	7.21 ± 0.65**	49.1**	
TPA + EtOH: acetonitrile (1:1) 1	—	14.90 ± 0.35	—	
	0.031	13.90 ± 0.43	6.7	ND
	0.10	12.75 ± 0.25	14.4	
	0.31	9.52 ± 1.25**	36.1**	
	1.00	11.56 ± 0.58**	22.4**	
TPA + EtOH: acetone (1:1) 2	—	14.55 ± 0.35	—	
	0.031	11.93 ± 0.92	18.0	ED ₅₀ = 0.748
	0.10	10.48 ± 0.49*	28.0**	$r = 0.993$
	0.31	9.23 ± 1.22**	36.6**	
	1.00	6.45 ± 0.80**	55.7**	
TPA + DMSO: EtOH (7.2: 92.8) UA	—	13.29 ± 0.58	—	
	0.01	12.34 ± 0.18	7.1	ED ₅₀ > 1.0
	0.031	11.93 ± 0.35	10.2	
	0.1	8.54 ± 0.69**	35.7**	
	0.31	7.51 ± 1.05**	43.4**	
TPA + EtOH: acetone (1:1) I	—	14.55 ± 0.35	—	
	0.031	11.48 ± 0.23	21.1	ED ₅₀ = 0.211
	0.10	10.15 ± 0.65**	30.2**	$r = 0.999$
	0.31	6.18 ± 1.67**	57.6**	
	1.00	5.23 ± 0.62**	64.1**	

The weight of ears was presented as mean ± SEM (standard error of mean) of 4–8 mice. Edema inhibition (EI, %) was calculated from the drug-treated group with reference to the TPA group. The effective dose 50 ED₅₀ value is shown with its corresponding correlation coefficient (r). AE = aqueous extract, HE = hexane extract, **1** = masticadienonic acid, **2** = 3 α -hydroxymasticadienonic acid, UA = ursolic acid, **I** = indomethacin, ND = no determination.

^aDose mg/kg. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Data were expressed as the mean \pm SEM of 4–8 mice. The effective dose 50 (ED₅₀) values were estimated from non-linear regression equations calculated with significant data. The coefficient of correlation (*r*) was figured to show association of dose and response.

Carrageenan-induced edema model

The effects of **AE**, **EH**, **1** and **2** on rat paw edema induced by carrageenan were studied as described by Winter et al. (1962), with particular changes. The substances were tested at 31 and 100 mg/kg. The solutions **A** (Tween 0.1%: methyl cellulose 0.5%, 1:3), and **B** (NaHCO₃ 0.5% in water) were prepared. Test substances were dissolved in DMSO/solution **A** (1:9). Indomethacin (in solution **B**/solution **A**, 1:9) was tested at 7.5-mg/kg dose.

Before any treatment, the average volume (of 3 or 4 measurements) of the right paw of each animal was determined (*V*₀, basal volume) using a plethysmometer (Plethysmometer 7150, Ugo Basile). Immediately after, the test substances were administered by means of intraperitoneal injection (*i.p.*). The control group received only the corresponding vehicle.

Sixty minutes later, paw edema was induced by subcutaneous injection of 0.1 ml carrageenan (0.1%) into the plantar surface of the right hind paw of all animals. The paw volume was measured 1, 3 and 5 h after the injection. These individual records allowed quantification of the average volume for each group (*V*_t) and then for the variation of edema, by comparison with the average volume obtained for each group before any treatment (*V*₀).

Since the time course of the effect was followed, it was possible to use the cumulative anti-inflammatory effect during the whole observation period as the area under the curve (AUC). Because the AUC curve represents the integrated anti-inflammatory effect (variation of edema) during the observation period, it then includes both the maximal response and the duration of action. The AUC relating variation of edema to time was obtained using the trapezoidal rule (Tallarida and Murray, 1981). Total inhibition (TI, %) was obtained for each group and at each record, using the following ratio: TI (%) = [AUC_{control} – AUC_{treat}] \times 100/AUC_{control}.

Data were expressed as mean \pm standard error of mean (SEM) or as percentages.

Determination of NO concentration

Isolation and culture of murine peritoneal macrophages: The LPS-activated macrophages were obtained as described by Fushiya et al. (1998). Briefly, CD-1 mice were injected with Brewer thioglycollate medium (3% in 1 ml, *i.p.*). Three days later, peritoneal exudate cells

(PEC) were washed out using DMEM (culture medium supplemented with 50 μ g/ml penicillin, 50 U/ml streptomycin and 5% FBS) administered through the anterior abdominal wall. After the addition of PEC suspended in DMEM at 1×10^6 cells/well, the product was incubated for 2 h in 24-well tissue culture plates (Becton Dickinson, Oxnard, CA, USA) in a 5% CO₂ incubator. Non-adherent cells were gently washed out twice with fresh medium.

Adherent cells (more than 95% macrophages) were cultured with the same medium containing 10 μ g/ml LPS in the absence or presence of the test compounds or extracts, for 24 h.

We used two protocols. In protocol **I**, the test substances were incubated simultaneously with LPS, while in the protocol **II**, the test substances were added 4 h before LPS.

HE, **1** and **2** were dissolved as stock solution (100 \times) in EtOH. The final concentration of EtOH in the cell culture supernatant was \leq 0.1%, a concentration that did not interfere with the test system. Other substances were dissolved in water. The substances were tested at 100 μ M. **UA** and **P** were evaluated at 10 μ M and 0.5 μ M, respectively.

Nitrite production in activated peritoneal macrophages: Nitrite accumulation was used as an indicator of NO production in the medium and was studied by means of the Griess reaction (Dirsch et al., 1998). In order to measure the amount of nitrite, 100 μ l of culture supernatants (LPS-activated cells with or without test substances) were mixed with 100 μ l of Griess reagent [1% sulfanilamide in 5% H₃PO₄/0.1% *N*-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride in water] in a 96-well plate. After the chromophore was formed at room temperature for 10 min, absorbance was determined at 515 nm using an Ultra Microplate Reader (Elx 808, BIO-TEK Instruments, Inc). Nitrite concentrations in the supernatants were determined by comparison with a sodium nitrite standard curve (Fig. 2). The experiments were performed at last three times in triplicate. Results were expressed in absolute absorbance readings. A decrease of absorbance indicates a reduction in nitrite accumulation. The inhibition of nitrite production (I, %) was calculated using the equation: I (%) = 100 – [B \times 100/A], with A = nitrite concentration (μ M) by LPS alone, and B = nitrite concentration (μ M) by LPS plus sample.

Cellular viability/MTT assay

Cell respiration, an indicator of cell viability, was determined by modified MTT colorimetric assay (Mossman, 1983). This assay is based on the reduction of the yellow-colored, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma, St. Louis,

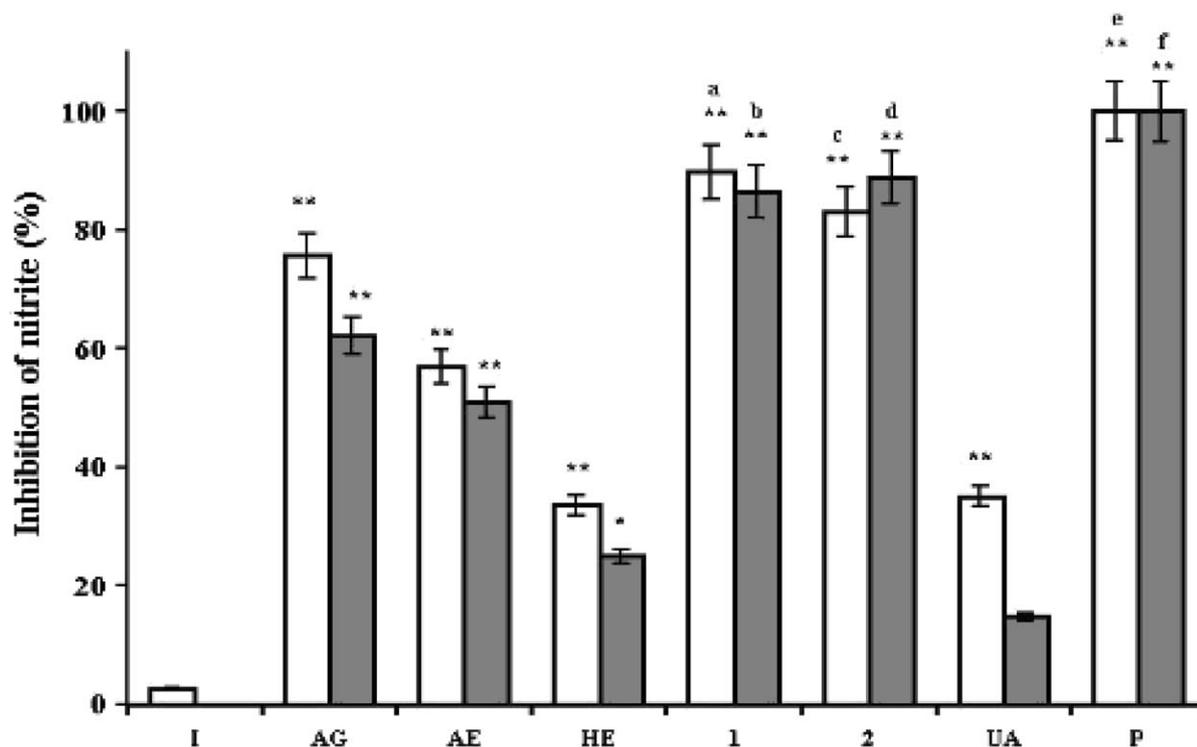


Fig. 2. Inhibition of nitric accumulation (%) in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. Bar represent % inhibition of nitrite production (mean \pm SEM) of at least three individual experiments, performed in triplicate. \square Protocol I: the substance were incubated simultaneously with LPS. \blacksquare Protocol II LPS were added 4 h after the application of the substances. **a–f:** Cytotoxic effects were observed. **a**=94.5%, **b**=99.2%, **c**=82.6%, **d**=92.2%, **e**=91.6% and **f**=92.3% of cytotoxicity in LPS-activated peritoneal macrophages. **I**=indomethacin; **AG**=aminoguanidine; **AE**=aqueous extracted; **HE**=hexane extract; **1**=masticadienic acid; **2**=3 α -hydroxymasticadienic acid; **UA**=ursolic acid; **P**=pristimerin. * P <0.05, ** P <0.01.

Missouri, USA) by mitochondrial dehydrogenases of metabolically active cells, to a blue formazan, which can be measured spectrophotometrically. Briefly, after 24-h incubation with test substances, MTT (10 μ l, 5 mg/ml in PBS) solution was added to the wells. After 4 h culture, the colored metabolite (formazan) was dissolved in DMSO and measured using an Ultra Microplate Reader (Elx 808, BIO-TEK Instruments, Inc.), with a test wavelength of 515 nm and a reference wavelength of 690 nm. Results are expressed as absolute absorbance readings and a decrease of absorbance indicates a reduction in cell viability. Data are expressed as cytotoxicity (%).

Statistics

The one-way analysis of variance (ANOVA) and Dunnett's t or Tukey–Kramer HSD-tests were used to compare several groups with a control. Values of P <0.05 (*) or P <0.01 (**) were considered significant.

Results

TPA-induced edema model

The evaluation of the acute anti-inflammatory activity of extracts and triterpenes of *A. adstringens* was performed in the model of mouse ear edema induced by TPA (see Table 1).

Due to the difficulty involved in applying **AE** topically, it was orally administrated. Nevertheless, **AE** was not active in this assay.

On the other hand, **HE** attenuated TPA-induced edema dose dependently. In the highest dose, however, it only showed 49.1% inhibition; therefore, the ED_{50} value was >1.0 mg/ear.

The anti-inflammatory activity of **1** was not dose dependent, while **2** showed a dose-dependent effect (ED_{50} value of 0.748 mg/ear, $r = 0.993$); **1**, **2** and **HE** presented a profile similar to anti-inflammatory agents at between 0.031 and 0.31 mg/ear dose (Table 1).

It is known that **UA** (ED_{50} value of >1.0 mg/ear) inhibits TPA-induced edema (Recio et al., 1995); thus, it was used as positive control. The activity of this

triterpene showed dose dependency; however; it was less active than **2**. Indomethacin showed a dose-dependent activity at 64.1% maximum inhibition and an ED₅₀ value of 0.211 mg/ear ($r = 0.999$).

Carrageenan-induced edema model (Table 2)

AE was the most effective drug of all substances tested. At the 31-mg/kg dose and 5 h after the injection of carrageenan, **AE** showed 82.1% inhibition, and a similar value (82.6%) was achieved at the 100 mg/kg dose 3 h after carrageenan treatment. At both doses, **AE** presented similar values of inhibition of total edema (area under time-course curve): 68% and 73.5%, respectively. On the other hand, **HE** showed only a 14.4% inhibition of total edema at 100 mg/kg (Table 2).

Both **1** and **2** attenuated the edema dose dependently. The values of the total anti-edema effect were similar

(43.6% and 44.6%, respectively, at 100 mg/kg) for both compounds.

When **UA** was administered at 100 mg/kg, a moderate activity was found. Maximum inhibition of 45.7% at 3 h was observed. Indomethacin showed a time-dependent effect, with 46.9% inhibition at 5 h. The values of total anti-edema activity were 31.7% and 32.8% for **UA** and **I**, respectively.

Nitrite production in activated peritoneal macrophages (see Fig. 2)

In order to investigate whether our extracts and compounds altered the NO synthesis of lipopolysaccharide (LPS)-stimulated macrophages, we determined the concentration of nitrite, an indicator of NO synthesis, in the cell-culture supernatant. Data are shown in Fig. 2.

Table 2. Effect of **AE**, **HE**, and compounds **1** and **2** in the Carrageenan-induced paw Edema Model

Groups	Dose (mg/kg)	Variation of edema (ml)			TI (%)
		Time (h)			
		1	3	5	
Carrageenan + vehicle 1	—	0.37 ± 0.03	0.46 ± 0.06	0.39 ± 0.06	—
AE	31	0.18 ± 0.05** (51.4) ^a	0.18 ± 0.03** (60.9) ^a	0.07 ± 0.03** (82.1) ^a	68.0 ± 9.0
	100	0.13 ± 0.00** (64.9) ^a	0.08 ± 0.03** (82.6) ^a	0.09 ± 0.02** (76.9) ^a	73.5 ± 2.5
HE	31	0.37 ± 0.02 (NI) ^a	0.51 ± 0.04 (NI) ^a	0.44 ± 0.06 (NI) ^a	NI
	100	0.35 ± 0.03 (5.4) ^a	0.37 ± 0.03 (19.6) ^a	0.26 ± 0.03 (66.7) ^a	14.4 ± 7.5
1	31	0.31 ± 0.02 (16.2) ^a	0.37 ± 0.01 (19.6) ^a	0.33 ± 0.02 (15.4) ^a	17.0 ± 4.4
	100	0.27 ± 0.04 (27.0) ^a	0.20 ± 0.03** (56.5) ^a	0.15 ± 0.02** (61.5) ^a	43.6 ± 7.2
2	31	0.27 ± 0.03 (27.0) ^a	0.37 ± 0.03 (19.6) ^a	0.31 ± 0.03 (20.5) ^a	24.0 ± 5.7
	100	0.27 ± 0.03 (27.0) ^a	0.18 ± 0.04** (60.9) ^a	0.16 ± 0.02** (59.0) ^a	44.6 ± 7.5
UA	100	0.31 ± 0.02 (16.2) ^a	0.25 ± 0.03** (45.7) ^a	0.23 ± 0.02 (41.0) ^a	31.7 ± 3.5
Carrageenan + vehicle 2	—	0.44 ± 0.05	0.61 ± 0.07	0.49 ± 0.06	—
I	7.5	0.36 ± 0.04 (18.2) ^a	0.36 ± 0.03* (41.0) ^a	0.26 ± 0.02** (46.9) ^a	32.8 ± 6.3

Each value represents the mean ± SEM of 4–6 observations.

^aData of partial edema inhibition (% PEI) (at 1, 3 or 5 h) are expressed in parentheses, and were calculated from the drug-treated group with reference to the control, which received the inflammatory agent plus vehicle. The total inhibition of edema (TI, %) was calculated with AUC by trapezoidal rule. Vehicle 1: DMSO/solution **A**, 1:9. Solution **A** = Tween 0.1%: methyl cellulose 0.5%, 1:3. Vehicle 2: solution **B**/solution **A**, 1:9. Solution **B** = NaHCO₃ 0.5% in water. **NI**, not inhibition; **AE**, aqueous extract; **HE**, hexane extract; **1**, masticadienonic acid; **2-3α**-hydroxymasticadienonic acid; **UA**, ursolic acid; **I**, indomethacin. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

In order to determine whether the test compounds could modify the nitrite concentrations, they were administered prior to or simultaneous with the stimulus; therefore, two protocols were used. The tested substances were incubated simultaneously with LPS in protocol **I**. In protocol **II**, LPS was added 4 h after application of the substances.

In general, the values of nitrite concentration were higher in protocol **I**. These results suggest that the time of exposure to LPS is important to production of NO in stimulated macrophages. **AE**, however, showed a significant inhibitory effect on NO production in the two protocols ($5.41 \pm 0.89 \mu\text{M}$ and $4.86 \pm 1.11 \mu\text{M}$, or inhibition of 57% and 50.9%, respectively). On the other hand, **HE** (33.5% and 25.0%) was less active than **AE**.

Both **1** and **2** suppressed NO generation efficiently, with inhibitions of over 90%, in two protocols, being the more active compounds. The strongest deleterious effects, however, were observed with **1** and **2** in the MTT assay.

UA showed the lower activity, with a production of nitrite of $8.16 \pm 0.12 \mu\text{M}$ (inhibition of 14.8%) for protocol **II**, and $8.43 \pm 0.20 \mu\text{M}$ (35.1% reduction) for protocol **I**. **UA** was not a cytotoxic compound. Pristimerin exhibited the highest inhibitory activities in two protocols and **P** was also a cytotoxic compound. Indomethacin had no detectable effect in the two protocols.

Aminoguanidine, a known specific inhibitor of NO synthase enzyme activity, was employed. **AG** inhibited iNOS enzyme activity at 75.7% (concentration of nitrite of $3.06 \pm 0.39 \mu\text{M}$) and 62.1% ($3.75 \pm 0.37 \mu\text{M}$), in protocols **I** and **II**, respectively.

Discussion

TPA-induced edema model

The TPA-induced edema test is a screening method to evaluate the ability of test compounds to prevent an inflammatory reaction in response to the edemogen.

It is known that phorbol esters, such as TPA, induce skin inflammation and a hyperproliferative response with an infiltration of neutrophils (De Young et al., 1989). It is also known that TPA stimulates PLA₂, and that consequently a release of arachidonic acid (AA) and prostaglandins occurs (Fuerstenberger et al., 1981). Although the mechanism by which TPA causes inflammation is not completely clear, it seems to be related in part to the release of eicosanoid mediators. Inhibitors of prostaglandin and leukotriene biosynthesis have been shown to be active in the TPA model and it has therefore been used extensively as a compound screen for this class of compounds (Carlson et al., 1985).

The fact that lipoxygenase inhibitors are effective in resolving cell infiltration in this model suggests that lipoxygenase products, such as LTB₄, may play a role in this inflammation. A previous study showed that 3 α -hydroxymasticadienonic acid suppressed the production of LTB₄ by PMNL cells at 100 μM (Ríos et al., 2002). Therefore, the anti-inflammatory effect shown by **1** and **2** in this assay could be due to inhibition of neutrophil infiltration and LTB₄ production, and anti-PLA₂ activity (Jain et al., 1995; Ríos et al., 2002). This proposal is supported by the fact that **HE**, which contains large quantities of **1** and **2**, was active, while **AE**, which did not contain **1** and **2**, was inactive.

Carrageenan-induced edema model

The cellular and molecular mechanism of carrageenan-induced inflammation is well known. It seems that the early phase (1–2 h) is related to the production of histamine, 5-hydroxy-tryptamine, bradykinin, leukotrienes, platelet-activating factor, and possibly cyclooxygenase products. The delayed phase of inflammatory response (3–4 h) has been linked to an infiltration of neutrophils and the production of neutrophil-derived free radicals, as well as to the release of other neutrophil-derived mediators (Di Rosa et al., 1971; Omote et al., 2001; Seibert et al., 1994; Salvemini et al., 1996).

Following the intraplantar injection of carrageenan, TNF- α , IFN- γ , IL-1 and IL-2 are produced; these molecules have been shown to induce iNOS (Moncada and Higgs, 1993). COX-2 is also induced within 2 h after carrageenan administration (Seibert et al., 1994). The iNOS and COX-2 pathways appear to operate together to amplify the inflammatory response (Salvemini et al., 1996).

In general, **AE**, **HE**, **1** and **2** presented the maximum inhibitory effects after the third hour. Therefore, we suggest that the tested substances could be involved in the alteration of mediators of the later phase of carrageenan-induced edema. **AE** showed the highest inhibitory activity among all the drugs tested.

It is known that the induction of edema by carrageenan and TPA follows different pathways. In the former, the AA cascade plays an important role, while the latter appears to be mediated by a variety of factors, including the activation of protein kinases (especially PKC) and the activation of transcription factors such as nuclear factor κB (NF- κB) (Fuerstenberger et al. 1981; Stanley et al., 1991).

HE and **2** showed selective activity in the TPA assay, indicating that these drugs could inhibit one or several specific steps in the response to TPA. **AE** showed a selective activity in carrageenan-induced edema, so the anti-inflammatory activity of this extract could be

attributed, in part, to the inhibition effect on the metabolic pathway of AA.

Nitrite production in activated peritoneal macrophages

The family of NOS enzymes, especially iNOS, is involved in a pathological aspect with the overproduction of nitric oxide (NO), a free inorganic radical. It is involved in physiological and pathological processes, such as vasodilatation, non-specific host defense and chronic or acute inflammation (Matsuda et al., 1999).

In this assay (nitrite production in activated peritoneal macrophages), we found that **1** and **2** prevent the production of NO by the reduction of this mediator level in culture medium of LPS-activated macrophages. The inhibition of NO production is a favorable feature for an anti-inflammatory profile, and could be related to a direct inhibition of enzyme activity, or to expression of iNOS gene.

Both **1** and **2** inhibited nitrite accumulation virtually equally in the two protocols. However, on MTT assay, **1** and **2** did show cytotoxic effects. Elevated production of NO in macrophages has been recognized as an essential anti-bacterial defense mechanism in the rodent. NO can react with transition metals and reactive oxygen species, leading to the generation of very toxic and reactive products. All these products mediate the toxicity of bacterial assailants (Pierre-Jacques et al., 2002). Pierre-Jacques et al. (2002) demonstrated that in vitro exposure of peritoneal macrophages to 5 µg/ml LPS led to a substantial reduction of the growth rate and number of surviving cells after 24 h. Therefore, **1** and **2** could contribute to the activity of toxic reactive products generated in stimulated macrophages. Pristimerin, like **1** and **2**, showed a significant inhibitory activity of NO production, and was also a cytotoxic compound.

AE showed moderate inhibition of NO production, and it also showed no cytotoxic effect. So, we suggested that **AE** inhibits inflammatory processes by a different mechanism than **HE**, **1** and **2**, which showed contrary effects in the inflammatory models.

Previous studies have shown that treatment with **UA** leads to a reduction of LPS-inducible NO production, and of iNOS expression through inhibition of NF-κB activation (Suh et al., 1998). We also confirmed that **UA** decreased LPS-inducible NO production, and has no cytotoxic effect.

In conclusion, this study has shown that **AE**, **HE**, **1** and **2** were able to prevent response in two models of acute inflammation: TPA-induced ear edema and carrageenan-induced paw edema. The anti-inflammatory properties of **AE**, **HE**, **1** and **2** could be due to the inhibition of some pro-inflammatory mediators involved in these edema models.

It has recently been suggested that the anti-inflammatory effects of **1** and **2** can be assigned, at least to a certain extent, to the inhibition of PLA₂ activity, and the inhibition of LTB₄ generation. In this context, we demonstrated that **1** and **2** could inhibit NO production. However, these compounds showed cytotoxic properties. The findings presented here might, therefore, provide a scientific basis for the phytomedicinal use of *A. adstringens* against inflammatory diseases.

Acknowledgements

The authors wish to thank M. Sc. Antonio Nieto Camacho, Q. Angeles Pérez, Q. Héctor Ríos, Q. Rocío Patiño, M. Sc. Carmen Márquez and M. Sc. Javier Pérez for technical assistance, and Dr. Enrique Hong for his kind and critical suggestions. Partial financial support from UNAM (DGAPA, IN-203198) is acknowledged.

References

- Barton, D.H., Seoane, E., 1956. Triterpenoids. Part XXII. The constitution and stereochemistry of masticadienonic acid. *J. Chem. Soc.* 4150–4157.
- Carlson, R.P., O'Neil-Davis, L., Chang, J., Lewis, A.J., 1985. Modulation of mouse ear edema by cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors and other pharmacologic agents. *Agents Actions* 17, 197–204.
- De Young, L.M., Kheifets, J.B., Ballaron, S.L., Young, J.M., 1989. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions* 26, 335–341.
- Dirsch, V.M., Stuppner, H., Vollmar, A.M., 1998. The Griess Assay: suitable for a bio-guided fractionation of anti-inflammatory plant extract? *Planta Med.* 64, 423–426.
- Di Rosa, M., Giroud, J.P., Willoughby, D.A., 1971. Studies of mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenin and turpentine. *J. Pathol.* 104, 15.
- Domínguez, X.A., Franco, R., García, S., Porrás, M.E., Vázquez, G., Amescua, B., 1983. Plantas medicinales mexicanas. XLVIII: estructura del ácido instipolinámico separado de la corteza del cuachalalate (*amhipterygium adstringens*). *Rev. Latinoam. Quím.* 14, 99–100.
- Fuerstenberger, G., Richter, H., Fusenig, N.E., Marks, F., 1981. Arachidonic acid and prostaglandin E₂ release and enhanced cell proliferation induced by the phorbol ester TPA in a murine epidermal cell line. *Cancer Lett.* 11, 191–198.
- Fushiya, S., Kabe, Y., Ikegaya, Y., Takano, F., 1998. (+)-Rhododendrol and epi-rhododendrin suppress the NO production by activated macrophages in vivo. *Planta Med.* 64, 598–602.
- Jain, M.K., Yu, B.Z., Rogers, J.M., Smith, A.E., Boger, E.T., Ostrander, R.L., Rheingold, A.L., 1995. Specific competi-

- tive inhibitor of secreted phospholipase A_2 from berries of *Schinus terebinthifolius*. *Phytochemistry* 39, 537–547.
- Mata, R., Calzada, F., Navarrete, C.A., Del Río, P.F., Delgado, 1991. Long-chain phenols from the bark of *Amphipterygium adstringens*. *J. Ethnopharmacol.* 34, 147–154.
- Matsuda, H., Kageura, T., Toguchida, I., Murakami, T., Kishi, A., Yoshikawa, M., 1999. Effects of sesquiterpenes and triterpenes from the rhizome of *Alisma orientale* on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated macrophages: absolute stereostructures of alismaketones-b 23-acetate and -c 23-acetate. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9, 3081–3086.
- Moncada, S., Higgs, A., 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway. *New Engl. J. Med.* 329, 2002–2012.
- Mossman, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: applications to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- Navarrete, A., Mata, R., Delgado, G., 1989. Alkylannacardic acids from *Amphipterygium adstringens*. *Planta Med.* 55, 579.
- Navarrete, A., Martínez-Urbe, L.S., Reyes, B., 1998. Gastro-protective activity of the stem bark of *Amphipterygium adstringens* in rats. *Phytother. Res.* 12, 1–4.
- Olivera, O.G., Soto, H.M., Martínez, V.M., Terrazas, S.T., Solares, A.F., 1999. Phytochemical study of cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht). *J. Ethnopharmacol.* 68, 109–113.
- Omote, K., Hazama, K., Kawamata, T., Kawamata, M., Nakayaka, Y., Toriyabe, M., Namiki, A., 2001. Peripheral nitric oxide in carrageenan-induced inflammation. *Brain Res.* 912, 171–175.
- Papageorgiou, V.P., Bakola-Christianopoulou, M.N., Apazidou, K.K., Psarros, E.E., 1997. Gas chromatographic-mass spectroscopic analysis of the acidic triterpenic fraction of mastic gum. *J. Chromatogr. A* 769, 263–273.
- Pennington, T.D., Sarukhán, J., 1968. Manual para la identificación de campo de los principales árboles tropicales de México: 413. INIF-SAG, FAO, México.
- Pierre-Jacques, P., Emmanelle, S., Olivier, N., Fradelizi, D., 2002. Auto-protective redox buffering systems in stimulated macrophages. *BMC Immunol.* 3, 1–14.
- Recio, M.C., Giner, R.M., Máñez, S., Gueho, J., Julien, H.R., Hostettmann, K., Ríos, J.L., 1995. Investigations of the steroidal anti-inflammatory activity of triterpenoids from *Diospyros leucomelas*. *Planta Med.* 61, 9–12.
- Ríos, J.L., Giner-Larza, E.M., Máñez, S., Giner, R.M., Recio, M.C., Prieto, J.M., Cerdá-Nicolás, M., 2002. Anti-inflammatory triterpenes from *Pistacia terebinthus galls*. *Planta Med.* 68, 311–315.
- Rzedowski, J., 1978. *Vegetación de México*: 210. Limusa, México.
- Salvemini, D., Wang, Z.Q., Wyatt, P.S., Bourdon, D.M., Marino, M.H., Manning, P.T., Currie, M.G., 1996. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *Br. J. Pharmacol.* 118, 829–838.
- Seibert, K., Zhang, Y., Leahy, K., Hauser, S., Masferrer, J.L., Perkins, W., Lee, L., Isakson, P., 1994. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 12013–12017.
- Soriano-García, M., Toscano, R.A., Ortiz, B., Navarrete, A., Sánchez-Obregón, R., Barrios, H., Yuste, F., 1987. Structure and stereochemistry of the methyl ester of (5 α ,13 α ,14 β ,17 α ,20S,24Z)-3-oxolanosta-7,24-dien-26-oic acid (masticdienonic acid). *Acta Crystallogr. C* 43, 990–992.
- Standley, P.C., 1961. Trees and shrubs of Mexico, In: Swalley, J.R. (Ed.), *Contributions from the US National Herbarium*, Vol. 23, Washington, 672–673.
- Stanley, P.L., Steiner, S., Havens, M., Tramposch, K.M., 1991. Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Skin Pharmacol. Appl.* 4, 262–271.
- Suh, N., Honda, T., Finlay, H.J., Barchowsky, A., Williams, C., Benoit, N.E., Xie, Q.W., Nathan, C., Gribble, G.W., Sporn, M.B., 1998. Novel triterpenoids suppress inducible nitric oxide synthase (iNOS) and inducible cyclooxygenase (COX-2) in mouse macrophages. *Cancer Res.* 58, 717–723.
- Tallarida, R.J., Murray, R.B., 1981. In: *Manual of Pharmacologic Calculations*. Springer, New York.
- Watson, W.H., Domínguez, X.A., Vázquez, G., García, S., 1987. Cuachalallic acid, a new triterpene from *Amphipterygium adstringens*. *Rev. Latinoamer. Quím.* 18, 89–90.
- Winter, C.A., Risley, E.A., Nuss, G.W., 1962. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 111, 544–547.

Cytotoxic activity and effect on nitric oxide production of tirucallane-type triterpenes

Ibeth Oviedo Chávez, Teresa Ramírez Apan and
Mariano Martínez-Vázquez

Abstract

Hexane extract from the bark of *Amphipterygium adstringens*, as well as its principal constituents, masticadienonic acid (**1**) and 3 α -hydroxymasticadienolic acid (**2**), inhibited the growth of five human cancer cell lines. Derivatives of **1**, namely 24,25S-dihydromasticadienonic acid (**3**) and masticadienolic acid (**4**), were also evaluated. The results showed that both **3** and **4** had greater activity than **1** on colon cancer cell lines. The effects of **1–4** on the production of nitric oxide (NO) from both resting and lipopolysaccharide-activated macrophages were determined. It was found that **1**, **2** and **4** caused an increase in NO release from resting macrophages; in lipopolysaccharide-activated macrophages, only **2** and **4** caused an increase in NO production.

Introduction

Masticadienonic acid (**1**) (3-oxotirucalla-7,24Z-dien-26-oic acid, terebinthone) and 3 α -hydroxymasticadienolic acid (**2**) (3-epimasticadienolic acid or schinol) were isolated as the main constituents of several species, including *Amphipterygium adstringens* (syn. *Juliania adstringens*, trivial name "cuachalalate") (Soriano-García et al 1987; Watson et al 1987; Navarrete et al 1989; Olivera et al 1999). This species has been widely used in traditional medicine as a gastroprotective (Navarrete et al 1998; Arrieta et al 2003), hypocholesterolaemic (Mata et al 1991), anti-inflammatory (Oviedo-Chávez et al 2004), antiprotozoal (Del Rayo et al 2000) and cytotoxic (Makino et al 2004) agent. Many of these properties have been attributed to the presence of **1** and **2**.

Despite the fact that *A. adstringens* has been traditionally used in the treatment of gastrointestinal cancer (Olivera et al 1999), to our knowledge, there is only one study relating to its anticancer properties. Makino et al (2004) reported that seven tirucallane-type triterpenes isolated from the bark of *A. adstringens* inhibited the growth of mouse leukaemia cell lines (L-1210). However, there are no studies dealing with their probable cytotoxic activity in human cancer cell lines. This prompted us to evaluate the cytotoxic activity of the hexane extract, as well as both **1** and **2** on five human cancer cell lines. In addition, in order to determine if the presence of a double bond at C-24/C-25, as well as the carbonyl moiety at C-3, are involved in the cytotoxic activity of 1,24,25S-dihydromasticadienonic acid (**3**) and masticadienolic acid (**4**), both derivatives of **1**, were also evaluated.

It is well known that macrophages play a prominent role in host defence by inducing cellular damage in infectious agents and tumours. One mechanism that the macrophages use to exert their cytotoxic and cytostatic effects on target cells is that of releasing nitric oxide (NO). NO is derived from L-arginine by the enzymatic activity of inducible nitric oxide synthase (iNOS), functioning as an antitumour and antimicrobial molecule in-vitro and in-vivo (Davis et al 2001). Thus, we evaluated the modulation of NO production by **1–4** in both resting and lipopolysaccharide (LPS)-activated macrophages.

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

Ibeth Oviedo Chávez

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

Teresa Ramírez Apan

Correspondence: Mariano Martínez-Vázquez, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán, C. P. 04510, México, D.F., México. E-mail: marvaz@servidor.unam.mx

Acknowledgements and funding: We thank Angeles Pérez, Héctor Ríos, Rocío Patiño, Carmen Márquez, Javier Pérez, Antonio Nieto and Gabriela Salcedo for technical assistance. I. Oviedo Chávez thanks Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP-UNAM) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for scholarship support. Partial financial support from UNAM (DGAPA, IN-203198) is acknowledged.

Materials and Methods

Chemicals

Reagents and cell culture materials were obtained from the following sources: sulforhodamine B (SRB), *Escherichia coli* 055:B5 LPS, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), superoxide dismutase (SOD), RPMI-1640, dimethylsulfoxide (DMSO) and doxorubicin were from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA); phosphate-buffered saline, Dulbecco's modified essential medium (DMEM), fetal calf serum (FCS) and amphotericin B were from GIBCO (Grand Island, NY, USA); brewer thioglycollate medium was from BD Bioxon (Becton Dickinson de México). Other reagents were purchased from Sigma Chemical Co. Colon cancer (HCT-15), breast cancer (MCF-7), leukaemia (K-562 CML), central nervous system (U-251 Glioblastoma, CNS) and prostate cancer (PC-3) cell lines were supplied by the National Cancer Institute (Bethesda, MD, USA). The reference triterpene, ursolic acid, was isolated from *Salvia mexicana* L. var. *minor* Benth. (Argumedo et al 2003).

Isolation of 1 and 2

Compounds **1** and **2** were isolated from the hexane extract of *A. adstringens* as previously described (Oviedo-Chávez et al 2004). The structures of **1** and **2** are shown in Figure 1.

Preparation of compound 3 (Figure 2)

A suspension of **1** (160 mg, 0.352 mmol) and palladium-carbon 5% (60 mg) in EtOAc (20 mL) was stirred for 48 h, under hydrogen atmosphere. When thin-layer chromatography (hexane/EtOAc 1:1) indicated complete reaction, the mixture was diluted with EtOAc, filtered through Celite, and the filtrate was evaporated under reduced pressure. The residue

was chromatographed on SiO₂ (hexane/EtOAc as mobile phase). After the usual workup, compound **3** (88 mg, 55%, mp 140–142°C) was obtained as a colourless solid. The structure of **3** (Figure 1) was established by comparing the physical data obtained with data reported in the literature (Barton & Seoane 1956) and by the analysis of ¹³C and ¹H NMR data.

Preparation of compound 4 (Figure 2)

A solution of NaBH₄ (260 mg) in H₂O (3 mL) was added to a solution of **1** (217.4 mg, 0.598 mmol) in MeOH (20 mL). The mixture was stirred at 20°C for 18 h. It was then diluted with H₂O and extracted with EtOAc. The organic layer was dried and evaporated under reduced pressure. Crystallization from EtOAc afforded a white amorphous powder (234.6 mg, 86%, mp 160–170°C), which was identified as compound **4** (Figure 1) by comparing the spectral and physical data obtained with data reported in the literature (Barton & Seoane 1956; Monaco et al 1974; Papageorgiou et al 1997).

The purity of **1–4** was determined by high-performance liquid chromatography analysis under the following conditions: acetonitrile/water (80:20) as mobile phase, flow rate 1 mL min⁻¹, 24 min, UV 220 nm (spectra and chromatograms of compounds **1–4** are not shown).

Cell culture and assay for cytotoxic activity

The cytotoxic activity of **1–4** and the hexane extract on tumour cells was determined using the protein-binding dye SRB (Monks et al 1991). Cell lines were cultured in RPMI-1640, supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 100 IU mL⁻¹ penicillin G, 100 µg mL⁻¹ streptomycin sulfate, and 0.25 µg mL⁻¹ amphotericin B. They were maintained at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. For the assay, 100 µL/well of 5 × 10⁴ cell mL⁻¹ (K562, MCF-7), 7.5 × 10⁴ cells/well (U251, PC-3) and 10 × 10⁴ cells/well (HCT-15) were seeded in 96-well microtitre plates and incubated for 24 h. In addition, 100 µL of each test compound (hexane extract, compounds **1–4**), ursolic acid and doxorubicin (reference substances) were added to the respective wells. All the test substances were dissolved in DMSO. The equivalent volume of DMSO added to control dishes had no effect on the cell lines.

After 48 h, adherent cell cultures were fixed in-situ by adding 50 µL of cold 50% (wt/vol) trichloroacetic acid and incubated for 60 min at 4°C. The supernatant was discarded and the plates were washed three times with water and air-dried. Cultures fixed with trichloroacetic acid were stained for 30 min with 100 µL of 0.4% SRB solution. Protein-bound dye was extracted with 10 mM unbuffered Tris base and the optical density (OD) was read on a microplate reader (Elx 808; Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) with a test wavelength of 515 nm. Percentage growth inhibition was calculated by the following equation: growth inhibition (%) = 100 - [B × 100/A], where A is the OD of cells only, and B is the OD of cells plus test sample. A dose-response curve was plotted for each compound, and the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) was estimated from

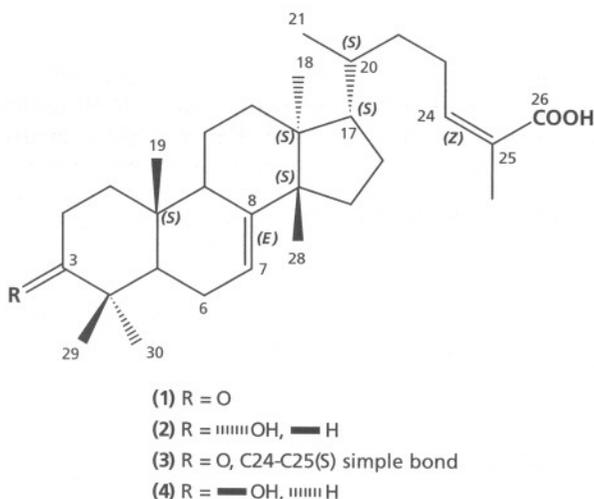


Figure 1 Tirucallane triterpenoid compounds: masticadienonic acid (**1**), 3- α -hydroxymasticadienonic acid (**2**), 24,25S-dihydromasticadienonic acid (**3**) and masticadienolic acid (**4**).

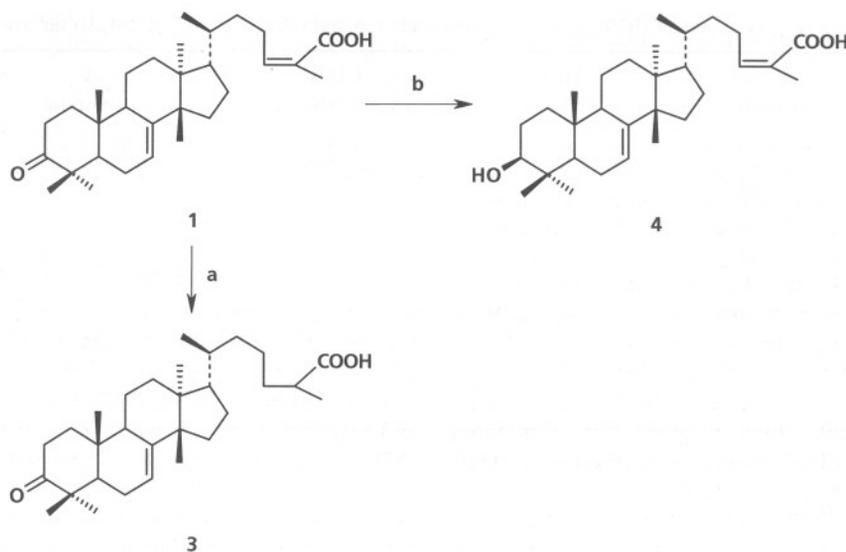


Figure 2 Reactions of masticadienonic acid (**1**) to produce 24,25S-dihydromasticadienonic acid (**3**) (55% yield), and masticadienolic acid (**4**) (86% yield). a, 5% Pd-C/EtOAc; b, NaBH₄/MeOH.

non-linear regression equations using JMP software (version 3.2.1.; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Determination of NO concentration

Isolation and culture of primary peritoneal macrophages (Fushiya et al 1998)

Swiss female mice, 25–30 g, were treated in accord with the Animal Care and Use Committee (PROY-NOM 087-ECOL-SSA1–2000). Mice were injected intraperitoneally with 1 mL of 3% (wt/vol) thioglycollate 3 days before harvesting. Peritoneal exudate cells were harvested, washed and suspended in DMEM. Peritoneal exudate cells were seeded into 24-well plates (Becton Dickinson, Oxnard, CA, USA) at a concentration of 1×10^6 cells mL⁻¹, and then incubated for 2 h at 37°C in a 5% CO₂ incubator. Non-adherent cells were washed off and cultured in DMEM supplemented with 10% FCS. Cells were treated for 24 h at 37°C, with 60 U mL⁻¹ SOD, with or without 10 µg mL⁻¹ LPS, both in the absence and presence of test compounds (**1–4**) and ursolic acid. Concentrations of 0.001–10 µM for **1–4**, and 0.001–1 µM for ursolic acid were used. All the test substances were dissolved in EtOH. The final concentration of EtOH in the cell culture supernatant was ≤0.1%. This concentration did not have any effect on the assays.

Nitrite production in peritoneal macrophages (Dirsch et al 1998)

Nitrite accumulation was determined by mixing equal volumes (100 µL each) of cell culture medium and Griess reagent (1% sulfanilamide/0.1% *N*-(1-naphthyl)-ethylene-diamine dihydrochloride/5% H₃PO₄) at 20°C for 10 min, and the OD was read on a microplate reader at 515 nm.

The nitrite concentration (µM) was determined by interpolation of standard curves constructed with known concentrations of NaNO₂.

Cell viability

Cell respiration, an indicator of cell viability, was determined in the remaining macrophages by the modified MTT method (Mosmann 1983). Briefly, 10 µL of MTT (5 mg mL⁻¹ in phosphate-buffered saline) was added to the remaining cells in 96-well plates and incubated for 4 h at 37°C. Incorporated dye was dissolved in DMSO (100 µL). Absorbance was measured on a microplate reader at 515 nm. Results were expressed as the percentage of MTT incorporated into treated cells compared with control cells.

Statistical analysis

All experiments were performed at least three times in four replicates. For the cytotoxicity assay, IC₅₀ results are presented as the mean ± s.e. For multiple comparisons, a one-way analysis of variance was carried out followed by post-hoc Dunnett's test. For NO production, results are presented as mean ± s.e. For multiple comparisons, a one-way analysis of variance was carried out, followed by post-hoc Dunnett's test. Values of *P* < 0.05 and *P* < 0.01 were considered significant. Statistical analysis was carried out using JMP software (version 3.2.1.; SAS Institute Inc.).

Results and Discussion

Cytotoxic activity

Compounds **1** and **2** were isolated and identified as previously described (Oviedo-Chávez et al 2004). Evaluation

Table 1 Cytotoxic effects of hexane extract (IC₅₀ μg mL⁻¹), compounds 1–4 and reference drugs (IC₅₀ μM) on five cancer cell lines

Compound	HCT-15 (Colon)	MCF-7 (Breast)	U251 (CNS)	PC-3 (Prostate)	K562 (Leukaemia)
Hexane extract	13.7 ± 1.0	7.9 ± 1.9	35.3 ± 1.5	38.3 ± 2.0	8.4 ± 0.1
1	42.1 ± 6.4	18.4 ± 1.0	20.4 ± 2.2	27.4 ± 3.9	36.8 ± 9.4
2	27.6 ± 6.0	31.5 ± 6.8*	31.6 ± 5.4*	29.2 ± 0.3	24.2 ± 0.7*
3	22.9 ± 5.2*	26.0 ± 2.9*	48.2 ± 13.5*	29.2 ± 2.9	33.1 ± 5.6
4	20.2 ± 8.4*	28.0 ± 14.0	29.1 ± 6.8	32.6 ± 4.0	24.9 ± 6.3
Ursolic acid	17.5 ± 6.8	17.5 ± 1.1	15.1 ± 4.9	30.5 ± 0.5	17.2 ± 2.3
Doxorubicin ^a	0.23 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.09 ± 0.02	0.32 ± 0.02	0.28 ± 0.01

1, Masticadienonic acid; 2, 3- α -hydroxymasticadienonic acid; 3, 24,25S-dihydromasticadienonic acid; 4, masticadienonic acid. Results are expressed as the mean \pm s.e., n = 3–5. * P < 0.05 compared with 1 (Dunnett's test). ^aData from Martínez et al (2002).

of the cytotoxic activity of the hexane extract and 1–4 was performed by the SRB test on five tumour cell lines. The IC₅₀ values are shown in Table 1. The hexane extract was more effective against breast cancer and leukaemia cell lines (IC₅₀: 7.9 \pm 1.9 and 8.4 \pm 0.1 μ g mL⁻¹, respectively) than the other cell lines tested. Compound 1 was most active on breast and CNS cancer cell lines (IC₅₀: 18.4 \pm 1.0 and 20.4 \pm 2.2 μ M, respectively), and 2 was effective on leukaemia cell lines (IC₅₀: 24.2 \pm 0.7 μ M). To determine if the presence of the double bond at C-24/C-25 and the carbonyl moiety at C-3 were involved in the cytotoxic activity of 1, compounds 3 and 4 (derivatives of 1) were also evaluated (Figure 2; Table 1).

On colon cancer cell lines, both 3 (IC₅₀ 22.9 \pm 5.2 μ M) and 4 (IC₅₀ 20.2 \pm 8.4 μ M) inhibited growth by roughly 2-fold compared with the parent compound 1 (IC₅₀: 42.1 \pm 6.4 μ M). However, 1 was more active on breast cancer (IC₅₀: 18.4 \pm 1.0 μ M) and CNS cancer (IC₅₀: 20.4 \pm 2.2 μ M) cell lines than compounds 2–4. Although the presence of the hydroxyl group at C-3, as in 3, or the sp³ bond in C-24/C-25, as in 4, could be important for the cytotoxic effect on the colon cancer cell line, the presence of these moieties are not important for the cytotoxic activity of 1 on breast cancer and CNS cancer cell lines.

On leukaemia cells, 2 and 4 were more active (IC₅₀: 24.2 \pm 0.7 μ M and 24.9 \pm 6.3 μ M, respectively) than 1 and 3. The cytotoxic effects of 1–4 on prostate cancer cell lines were not statistically different. Furthermore, the cytotoxic effects of epimers 2 and 4 were similar on the five tumour cell lines. Hence, the configuration of the hydroxyl group at C-3 was not considered relevant.

Ursolic acid was used as the reference drug since it is one of the best known pentacyclic triterpenes with cytotoxic and antiproliferative properties (Chattopadhyay et al 2002). Our results are in agreement with those previously published (see Table 1).

NO production in peritoneal macrophages

We evaluated the effects of 1–4 on the production of nitric oxide from mouse peritoneal macrophages (Table 2). Our results showed that 1, 2 and 4 significantly enhanced the nitrite release from resting macrophages. However, the

Table 2 Effects of compounds 1–4 and ursolic acid on the accumulation of nitrite in cell culture supernatants of mouse peritoneal macrophages

Compound	Dose (μ M)	NO (μ M)	
		Without LPS	With LPS
Control		24.4 \pm 1.4	44.3 \pm 1.7
1	0.001	42.7 \pm 2.8**	54.3 \pm 0.6
	0.01	38.4 \pm 3.0**	54.7 \pm 4.9
	0.1	35.9 \pm 0.9*	47.2 \pm 3.2
	1.0	39.2 \pm 1.2**	54.5 \pm 4.5
	10.0	40.1 \pm 4.1**	51.1 \pm 5.7
2	0.001	39.0 \pm 0.3**	61.8 \pm 2.7**
	0.01	39.4 \pm 0.9**	58.0 \pm 1.6*
	0.1	38.5 \pm 2.6**	53.4 \pm 5.2
	1.0	42.6 \pm 4.5**	53.6 \pm 1.8
	10.0	34.7 \pm 2.6*	47.2 \pm 4.9
3	0.001	30.5 \pm 3.4	44.2 \pm 4.2
	0.01	30.8 \pm 4.2	45.5 \pm 3.8
	0.1	27.6 \pm 2.5	45.1 \pm 2.5
	1.0	29.5 \pm 3.7	45.7 \pm 4.3
	10.0	26.4 \pm 1.8	33.3 \pm 3.7*
4	0.001	36.9 \pm 5.7	50.8 \pm 2.4
	0.01	36.3 \pm 4.0	51.6 \pm 2.2
	0.1	39.8 \pm 2.4*	52.0 \pm 2.4
	1.0	38.2 \pm 3.1*	54.6 \pm 3.0*
	10.0	36.7 \pm 4.0	50.3 \pm 1.9
Ursolic acid	0.001	33.8 \pm 1.8	48.1 \pm 5.8
	0.01	35.9 \pm 1.8*	54.5 \pm 4.4
	0.1	38.7 \pm 0.9**	54.0 \pm 5.1
	1.0	38.4 \pm 3.6**	51.3 \pm 3.9
	10.0	28.9 \pm 2.3	38.0 \pm 13.7

1, Masticadienonic acid; 2, 3- α -hydroxymasticadienonic acid; 3, 24,25S-dihydromasticadienonic acid; 4, masticadienonic acid. LPS, lipopolysaccharide. Results are expressed as the mean \pm s.e., n = 3–5. * P < 0.05 and ** P < 0.01, significantly different compared with the control (Dunnett's test). Cell viability for triterpenes 1–4 was up to 95%; ursolic acid only showed cytotoxicity above 80% at 10 μ M (MTT test).

effects shown by the different concentrations of 1 tested were not significantly different; the same was true for 2 and 4. These results indicated a constant production of

NO, at least for **1**, **2** and **4** at the concentrations tested. Compound **3** did not show any significant effect. These results indicate that the sp² bond at C-24/C-25 in the triterpenoid structure could be required for the up-release of NO from resting macrophages.

The effects of **1–4** on NO production by LPS-treated macrophages were also evaluated. Macrophages showed enhanced nitrite release when they were activated with LPS (NO concentration: 44.3 ± 1.7 μM). However, only **2** and **4** showed significant enhanced effects. Also, in both cases, the NO production was almost constant. These results suggest that a hydroxyl group at C-3 or double bond in C-24/C-25 could be necessary for the enhancement of NO production in LPS-activated cells.

Although the amount of the NO release by LPS-treated cells was significantly different in resting cells, the NO production was increased in both cases. A different behaviour was shown by ursolic acid, which stimulates the NO release in resting macrophages (You et al 2001) and reduces the NO production by LPS-activated macrophages (Suh et al 1998).

Nevertheless, in our hands, ursolic acid did not show any significant effect on nitrite release by LPS-activated macrophages (Table 2). This may indicate that at low concentrations, such as we used in the present study, the reduction of NO production by ursolic acid does not occur. However, the discrepancy may also be attributed to the different experimental conditions used here compared with those previously reported, such as different animal type, number of macrophages tested, and the use of SOD enzyme. The inclusion of this enzyme was meant to avoid the presence of the superoxide anion that could be produced when the macrophages are activated, avoiding the reaction with NO to generate peroxynitrite, which may also be responsible for the Griess reaction.

In conclusion, the hexane extract of *A. adstringens*, as well as its principal constituents **1** and **2**, showed moderate cytotoxic activity against several human cancer cell lines. In addition, we found that **1** and **2**, as well the derivative **4**, enhanced the NO production by both resting and LPS-activated macrophages in-vitro. These properties could account for the use of *A. adstringens* in Mexican traditional medicine.

References

- Argumedo, D. R., Parra-Delgado, H., Ramírez, A. M. T., Nieto, C. A., Martínez-Vázquez, M. (2003) Isolation and chemical transformations of some anti-inflammatory triterpenes from *Salvia mexicana* L. var. *minor* Benth. *Rev. Soc. Quím. Méx.* **47**: 167–172
- Arrieta, J., Benítez, J., Flores, E., Castillo, C., Navarrete, A. (2003) Purification of gastroprotective triterpenoids from the stem bark of *Amphipterygium adstringens*; role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons. *Planta Med.* **69**: 905–909
- Barton, D. H. R., Seoane, E. (1956) Triterpenoids. Part XXII. The constitution and stereochemistry of masticadienonic acid. *J. Chem. Soc.* 4150–4157
- Chattopadhyay, D., Arunachalam, G., Mandal, A. B., Sur, T. K., Mandal, S. C., Bhattacharya, S. K. (2002) Antimicrobial and anti-inflammatory activity of folklore: *Mallotus peltatus* leaf extract. *J. Ethnopharmacol.* **82**: 229–237
- Davis, K. L., Martin, E., Turko, I. V., Murad, F. (2001) Novel effects of nitric oxide. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **41**: 203–236
- Del Rayo, C. M., Mata, R., Castañeda, P., Kirby, G. C., Warhurst, D. C., Croft, S. L., Phillipson, J. D. (2000) Bioactive compounds from *Celaenodendron mexicanum*. *Planta Med.* **66**: 463–468
- Dirsch, V. M., Stuppner, H., Vollmar, A. M. (1998) The Griess assay: suitable for a bio-guided fractionation of anti-inflammatory plant extract? *Planta Med.* **64**: 423–426
- Fushiya, S., Kabe, Y., Ikegaya, Y., Takano, F. (1998) (+)-Rhododendrol and epi-rhododendrin suppress the NO production by activated macrophages in vivo. *Planta Med.* **64**: 598–602
- Makino, M., Motegi, T., Fujimoto, Y. (2004) Tirucallane-type triterpenes from *Juliania adstringens*. *Phytochemistry* **65**: 891–896
- Martínez, R., Avila, Z. G., Duran, M. E., Ramírez, A. T., Cañas, R. (2002) Synthesis of novel furo, thieno and benzazetoazepines and evaluation of their cytotoxicity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12**: 1675–1677
- Mata, R., Calzada, F., Navarrete, A., Del Río, F., Delgado, G. (1991) Long-chain phenols from the bark of *Amphipterygium adstringens*. *J. Ethnopharmacol.* **34**: 147–154
- Monaco, P., Caputo, R., Palumbo, G., Mangoni, L. (1974) Triterpene components of galls on the leaves of *Pistacia terebinthus*, produced by *Pemphigus semilunarius*. *Phytochemistry* **13**: 1992–1993
- Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paul, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., Gray-Goodrich, M., Campbell, H., Mayo, J., Boyd, M. (1991) Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Natl Cancer Inst.* **38**: 757–766
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**: 55–63
- Navarrete, A., Mata, R., Delgado, G. (1989) Alkylanicaradic acids from *Amphipterygium adstringens*. *Planta Med.* **55**: 579
- Navarrete, A., Martínez-Urbe, L. S., Reyes, B. (1998) Gastroprotective activity of the stem bark of *Amphipterygium adstringens* in rats. *Phytother. Res.* **12**: 1–4
- Olivera, O. G., Soto, H. M., Martínez, V. M., Terrazas, S. T., Solares, A. F. (1999) Phytochemical study of cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* Schiede ex. Schlecht). *J. Ethnopharmacol.* **68**: 109–113
- Oviedo-Chávez, I., Ramírez-Apan, T., Soto-Hernández, M., Martínez-Vázquez, M. (2004) Principles of the bark of *Amphipterygium adstringens* (Julianaceae) with anti-inflammatory activity. *Phytomedicine* **11**: 436–445
- Papageorgiou, V. P., Bakola-Christianopoulou, M. N., Apazidou, K. K., Psarros, E. E. (1997) Gas chromatographic-mass spectroscopic analysis of the acidic triterpenic fraction of mastic gum. *J. Chromatogr. A.* **769**: 263–273
- Soriano-García, M., Toscano, R. A., Ortiz, B., Navarrete, A., Sánchez-Obregón, R., Barrios, H., Yuste, F. (1987) Structure and stereochemistry of the methyl ester of (5α, 13α, 14β, 17α, 20S, 24Z)-3-oxolanosta-7,24-dien-26-oic acid (masticadienonic acid). *Acta Crystallogr. C.* **C43**: 990–992
- Suh, N., Honda, T., Finlay, H. J., Barchowsky, A., Williams, C., Benoit, N. E., Xie, Q. W., Nathan, C., Gribble, G. W., Sporn, M. B. (1998) Novel triterpenoids suppress inducible nitric oxide synthase (iNOS) and inducible cyclooxygenase (COX-2) in mouse macrophages. *Cancer Res.* **58**: 717–723
- Watson, W. H., Domínguez, X. A., Vázquez, G., García, S. (1987) Cuachalalic acid, a new triterpene from *Amphipterygium adstringens*. *Rev. Latinoam. Quím.* **18**: 89–90
- You, H. J., Choi, C. Y., Kim, J. Y., Park, S. J., Hahm, K. S., Jeong, H. G. (2001) Ursolic acid enhances nitric oxide and tumor necrosis factor-α production via nuclear factor-κB activation in the resting macrophages. *FEBS Lett.* **509**: 156–160