

00310 5  
25



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

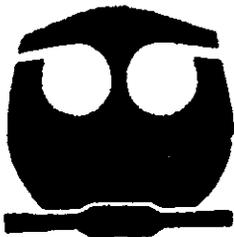
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MODIFICACIONES MOLECULARES DE LOS  
TRITERPENOS AISLADOS DEL *Partenium argentatum*  
Y SU EVALUACION COMO AGENTES  
ANTIINFLAMATORIOS.

**T E S I S**

PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS  
(QUIMICA FARMACEUTICA)

P R E S E N T A :  
Q.F.B. MARIBEL PINEDA HERRERA



MEXICO, D. F.

~~1999~~

1999

273022

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



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.

Esta tesis se desarrollo en el laboratorio 1-4 de Productos Naturales  
y en la Unidad de Pruebas de Actividad Biológica del Instituto de Química y con apoyo  
financiero del CONACYT (Proyecto: 25494N).

Director de Tesis

Dr. Mariano Martínez Vázquez.

Sustentante

Q.F.B. Maribel Pineda Herrera

Jurado asignado:

Presidente:	Dr Alfonso Romo de Vivar (IQ)
Primer Vocal:	Dr. José Calderón Pardo (IQ)
Secretario:	Dr. Andrés Navarrete Castro (FQ)
Primer suplente:	Dr. Rogelio Pereda Miranda (FQ)
Segundo suplente:	Dra. Isabel Aguilar Laurents (FQ)

# CONTENIDO

## ÍNDICE DE FIGURAS

## ÍNDICE DE TABLAS

## INTRODUCCIÓN

	pág.
<b>1. Antecedentes.</b>	<b>1</b>
1.1 Justificación y Objetivos.	5
<b>2. Parte Experimental.</b>	<b>7</b>
2.1 Materia Prima.	7
2.2 Aparatos y Material Utilizado.	7
2.3 Método de Extracción y Purificación de los Triterpenos.	8
2.3.1 Aislamiento de las argentatinas A, B y D.	8
2.3.2 Aislamiento de 16 $\beta$ -hidroxi-24-(R)-25-cetal-9 $\beta$ , 19-cicloartan-3-ona(7) y 16 $\beta$ -hidroxi-24-(1)-25-cetal-9 $\beta$ , 19 $\beta$ -cicloartan-3-ona(8)	9
2.4 Obtención de derivados de la Argentatina A y Argentatina B	
2.4.1 Obtención del 25-acetato de argentatina B (10) y 16, 25-diacetato de Argentatina A (11)	11
2.4.2 Obtención del 2( $\alpha$ )-Bromo-argentatina B (12)	12
2.4.3 Obtención de 2( $\alpha$ )-Bromo-argentatina A (13)	13
2.4.4 Obtención de la oxima de argentatina B (14) y oxima de argentatina A (15)	14
2.4.5 Obtención de la lactama de argentatina B (16)	16
2.4.6 Obtención de la lactama de argentatina A (17)	17
2.4.7 Obtención de la lactama de argentatina B (20) y 16-oxo-argentatina A (21)	17
2.4.8 Obtención del éster metílico del ácido-3,16-dioxo-25-nor-9 $\beta$ , 19-cicloartan-24-oico (22)	19
2.4.9 Obtención de la lactona 3,16-dioxo 9 $\beta$ ,19-cicloartan-20, 24-olida A (23)	20
2.4.10 Obtención del 3( $\beta$ )-hidroxi-argentatina A (24)	20
2.4.11 Obtención del ácido 3,16-dioxo-17, 20-en-9 $\beta$ , 19-cicloartan-24-oico (25)	21

# CONTENIDO

	pág.
<b>3. Discusión.</b>	<b>23</b>
3.1. Obtención de las argentatinas y los epímeros 16 $\beta$ -hidroxi-24(R), 25- cetal-9 $\beta$ , 19 -cicloartan-3-(7) y 16 $\beta$ -hidroxi-24(R), 25- cetal-9 $\beta$ , 19 -cicloartan-3-(8).	23 23
3.2 Obtención de derivados de la Argentatina A y Argetatina B.	32
3.2.1 Obtención del 25-Acetato de Argentatina B y 16, 25-diacetato de Argentatina A.	32
3.2.2 Obtención de 2( $\alpha$ )-Br-Argentatina B y 2- $\alpha$ -Br- Argentatina A.	35
3.2.3 Obtención de las Oximas de Argentatina B y de Argentatina A.	39
3.2.4 Obtención de la Lactama de Argentatina B y Lactama de Argentatina A.	42
3.2.5 Obtención de la Lactona de Argetatina B y de la 16-oxo-Argentatina A.	47
3.2.6 Obtención del éster metílico del ácido-3, 16-dioxo-25-nor-9 $\beta$ , 19-cicloartan-24-oico.	52
3.2.7 Obtención de la Lactona-3, 16-dioxo-9 $\beta$ , 19-cicloartan-20, 24-olida A.	54
3.2.8 Obtención de la 3 $\beta$ -hidroxi-Argentatina A.	56
3.2.9 Obtención del Ácido-3,16-dioxo-17, 20-en-9 $\beta$ , 19-cicloartan -24-oico.	58
<b>4. Evaluación de la Actividad Biológica.</b>	<b>60</b>
4.1 <b>Antecedentes.</b>	<b>60</b>
4.2 Método para evaluar la actividad antiedematosa en el edema inducido con TPA.	65
4.3 Resultados y Discusión.	67
<b>5. Conclusiones.</b>	<b>86</b>
<b>6. Bibliografía.</b>	<b>87</b>

## INDICE DE FIGURAS

	pág.
<b>Figura 1.</b> Distribución geográfica de <i>Partenium argentatum</i>	1
<b>Figura 2.</b> Espectro de masas de 16 $\beta$ -hidroxi-24(R), 25- cetal-9 $\beta$ , 19 -cicloartan-3-ona (7)	23
<b>Figura 3.</b> Espectro de infrarrojo del 16 $\beta$ -hidroxi-24(R), 25- cetal-9 $\beta$ , 19 -cicloartan-3-ona (7)	24
<b>Figura 4.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H del 16 $\beta$ -hidroxi-24(R), 25- cetal-9 $\beta$ , 19 -cicloartan-3-ona (7)	25
<b>Figura 5.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C del 16 $\beta$ -hidroxi-24(R), 25- cetal-9 $\beta$ , 19 -cicloartan-3-ona (7)	25
<b>Figura 6.</b> Estructura obtenida por difracción de Rayos X 16 $\beta$ -hidroxi-24(R), 25- cetal-9 $\beta$ , 19 - cicloartan-3-ona (7)	26
<b>Figura 7.</b> Espectro de masas del 16 $\beta$ -hidroxi-24(S), 25- cetal-9 $\beta$ , 19 -cicloartan-3-ona(8)	27
<b>Figura 8.</b> Espectro de infrarrojo del 16 $\beta$ -hidroxi-24(S), 25- cetal-9 $\beta$ , 19 -cicloartan-3-ona(8)	27
<b>Figura 9.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H del 16 $\beta$ -hidroxi-24(S), 25- cetal-9 $\beta$ , 19 -cicloartan-3-ona(8)	28
<b>Figura 10.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C del 16 $\beta$ -hidroxi-24(S), 25- cetal-9 $\beta$ , 19 -cicloartan-3-ona(8)	29
<b>Figura 11.</b> Estructura obtenida por difracción de Rayos X del 16 $\beta$ -hidroxi-24(R), 25- cetal-9 $\beta$ , 19 -cicloartan-3-ona(8)	29
<b>Figura 12.</b> Ruta biogénica para la argentatina C (5) y epiargentatina C (9)	31
<b>Figura 13.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H del 25-acetato de argentatina B (10)	33
<b>Figura 14.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C del 25-acetato de argentatina B (10)	33
<b>Figura 15.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H del 16, 25-diacetato de argentatina A (11)	35
<b>Figura 16.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H de 2( $\alpha$ )-bromo-argentatina B (12)	36
<b>Figura 17.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C del 2( $\alpha$ )-bromo-argentatina A (13)	38
<b>Figura 18.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la oxima de argentatina B (14)	39
<b>Figura 19.</b> Espectro de infrarrojo de la oxima de argentina B (14)	40
<b>Figura 20.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C de la oxima de argentatina B (14)	40
<b>Figura 21.</b> Estructura obtenida por difracción de Rayos X de la oxima de argentatina A (15)	41
<b>Figura 22.</b> Espectro de infrarrojo de la lactama de la argentina B (16)	42
<b>Figura 23.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la lactama de la argentina B (16)	43
<b>Figura 24.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C de la lactama de la argentina B (16)	44
<b>Figura 25.</b> Espectro de infrarrojo de la 16-fluoro-acetoxi-lactama de la argentatina A (18)	45
<b>Figura 26.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la lactama de la argentina A (17)	46
<b>Figura 27.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C de la lactama de la argentina A (17)	46

## INDICE DE FIGURAS (Continuación)

	pág.
<b>Figura 28.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ de la lactona de la argentatina B (20)	48
<b>Figura 29.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de la lactona de la argentatina B (20)	49
<b>Figura 30.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ de la 16-oxo-argentatina A (21)	50
<b>Figura 31.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de la 16-oxo-argentatina A (21)	51
<b>Figura 32.</b> Espectro de masas de la 16-oxo-argentatina A (21)	51
<b>Figura 33.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ del éster metílico del ácido-3,16-dioxo-25-nor-9 $\beta$ , 19-cicloartan-24-oico (22)	53
<b>Figura 34.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ del éster metílico del ácido-3,16-dioxo-25-nor-9 $\beta$ , 19-cicloartan-24-oico (22)	53
<b>Figura 35.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ de la lactona-3,16-dioxo-9 $\beta$ ,19-cicloartan-20, 24-olida A (23)	55
<b>Figura 36.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de la lactona-3, 16-dioxo-9 $\beta$ ,19-cicloartan-20, 24-olida A (23)	55
<b>Figura 37.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ de la 3 $\beta$ -hidroxi-argentatina A (24)	57
<b>Figura 38.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de la 3 $\beta$ -hidroxi-argentatina A (24)	57
<b>Figura 39.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ del ácido -3,16-dioxo-17, 20-en-9 $\beta$ , 19-cicloartan-24-oico (25)	59
<b>Figura 40.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ del ácido -3,16-dioxo-17, 20-en-9 $\beta$ , 19-cicloartan-24-oico (25)	59
<b>Figura 41.</b> Biosíntesis de los productos del ácido araquidónico.	62
<b>Figura 42.</b> Efecto inhibitorio (% de inhibición) de los derivados de las argentatinas A, B e Indometacina a una concentración de 1 mg/oreja.	

## INDICE DE TABLAS

	pág.
<b>Tabla 1.</b> Desplazamientos químicos de RMN $^{13}\text{C}$ en ppm (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de 10 y 11	34
<b>Tabla 2.</b> Abundancias relativas de los iones obtenidos como productos de fragmentación primaria de los triterpenos pentacíclicos (argentatinas tipo 1)	37
<b>Tabla 3.</b> Abundancias relativas de los iones obtenidos como productos de fragmentación primaria de los triterpenos pentacíclicos (argentatinas tipo 3)	37
<b>Tabla 4.</b> Desplazamientos químicos de RMN $^{13}\text{C}$ en ppm (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de 12 y 13	39
<b>Tabla 5.</b> Desplazamientos químicos de RMN $^{13}\text{C}$ en ppm (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de 16 y 17	47
<b>Tabla 6.</b> Desplazamientos químicos de RMN $^{13}\text{C}$ en ppm (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de 3 y 20	49
<b>Tabla 7.</b> Actividad antiinflamatoria de algunos triterpenos	63
<b>Tabla 8.</b> Efecto inhibitorio (%) de las argentatinas A(1), B (3), D (6) e Indometacina (IND) con una concentración de 0.05 mg/oreja en el edema inducido por TPA	66
<b>Tabla 9.</b> Efecto inhibitorio (%) de los derivados de las argentatinas A(1) y B (3) con una concentración de 0.05 mg/oreja en el edema inducido por TPA	68
<b>Tabla 10.</b> Efecto inhibitorio (%) de las argentatinas A(1), B (3), D (6) e Indometacina (IND) con una concentración de 0.1 mg/oreja en el edema inducido por TPA	70
<b>Tabla 11.</b> Efecto inhibitorio (%) de los derivados de las argentatinas A(1) y B (3) con una concentración de 0.1 mg/oreja en el edema inducido por TPA	70
<b>Tabla 12.</b> Efecto inhibitorio (%) de las argentatinas A(1), B (3),D (6) e Indometacina (IND) con una concentración de 0.5 mg/oreja en el edema inducido por TPA	73
<b>Tabla 13.</b> Efecto inhibitorio (%) de los derivados de las argentatinas A(1) y B (3) con una concentración de 0.5 mg/oreja en el edema inducido por TPA	74
<b>Tabla 14.</b> Efecto inhibitorio (%) de las argentatinas A(1), B (3), D (6) e Indometacina (IND) con una concentración de 1.0 mg/oreja en el edema inducido por TPA	76
<b>Tabla 15.</b> Efecto inhibitorio (%) de los derivados de las argentatinas A(1) y B (3) con una concentración de 1.0 mg/oreja en el edema inducido por TPA	77

## INDICE DE TABLAS ( Continuación)

	pág.
<b>Tabla 16.</b> Efecto inhibitorio (%) de las argentatinas A(1) y B (3) D (6) e Indometacina (IND) en el edema inducido por TPA	79
<b>Tabla 17.</b> Efecto inhibitorio (%) de los derivados de las argentatinas A(1) y B (3) en el edema inducido por TPA	80
<b>Tabla 18.</b> Efecto inhibitorio (%) de los epímeros 7 y 8 en el edema de oreja de ratón inducido por TPA.	83

## RESUMEN

De la resina obtenida en el proceso industrial en el aislamiento del hule natural del *Parthenium argentatum*, se aislaron los triterpenos argentatinas A, B y D. Así como dos nuevos triterpenos que resultaron ser el *16 $\beta$ -hidroxi-24 (R), 25-cetal-9 $\beta$ , 19-cicloartan-3-ona (7)* y su epimero *16 $\beta$ -hidroxi-24 (S), 25-cetal-9 $\beta$ , 19-cicloartan-3-ona (8)*.

Las estructuras de estos compuestos se elucidaron mediante análisis espectroscópicos, las cuales fueron confirmadas por estudios cristalográficos de rayos X.

La actividad antiinflamatoria de las argentatinas A, B y D evaluada en el modelo de la oreja de ratón a concentraciones 0.05, 0.1, 0.5 y 1.0 mg/oreja usando como agente inflamatorio el acetato de tetrahydroforbol (TPA), fue de 84.2%, 85.6% y 69.1% respectivamente. Presentando una relación lineal dosis efecto.

Tomando en cuenta estos resultados y para realizar un estudio de estructura actividad se prepararon 8 derivados de la argentatina A y 6 de la argentatina B. Los datos espectroscópicos de cada compuesto confirmaron las transformaciones en todos los casos.

La evaluación de la actividad antiinflamatoria de estos derivados, demostró tener una relación lineal dosis-efecto. En relación a la argentatina A ninguno de sus derivados resultó mas activo que la propia argentatina A. Por otro lado entre los derivados de la argentatina B, los más activos fueron el *éster metílico del ácido-3, 16-dioxo-25-nor-9 $\beta$ , 19-cicloartan-24-oico (22)* y la *lactama de la argentatina B (17)*.

Estos resultados demuestran que tanto la funcionalidad como el esqueleto hidrocarbonado son importantes para la actividad antiinflamatoria.

## INTRODUCCION

A pesar de que a lo largo de los quinientos años en que el mundo tiene noticias de la naturaleza maravillosa de América y de México en particular, quizá lo que más ha llamado la atención de propios y extraños han sido su flora y fauna.

Específicamente la flora mexicana destaca por su biodiversidad. En donde se encuentran especies útiles a la humanidad ya sea remedios medicinales o como alimento. También existen plantas de gran belleza o particularmente raras.

En cuanto a estudios sistemáticos tanto desde el punto de vista farmacológico como químico el porcentaje es relativamente bajo.

Por otro lado el interés científico por el estudio de las plantas como fuente de principios bioactivos se ha visto incrementando en los últimos años, razón por la cual es más frecuente la incorporación del esquema interdisciplinario en los programas de investigación sobre la flora, particularmente aquellas llamadas plantas medicinales.

Es en este contexto que nuestro grupo inicia un estudio sistemático de la resina del guayule con el objetivo de aislar, caracterizar y realizar evaluaciones biológicas de las diferentes sustancias provenientes de la resina. Así como el de efectuar algunas transformaciones de las sustancias biológicamente activas con el fin de realizar posteriores estudios de estructura-actividad.

## 1. ANTECEDENTES

El *Parthenium argentatum* (Asteraceae), es un arbusto nativo de la región semiárida del Norte del país y Sur de los Estados Unidos (figura 1), llamada comúnmente guayule.

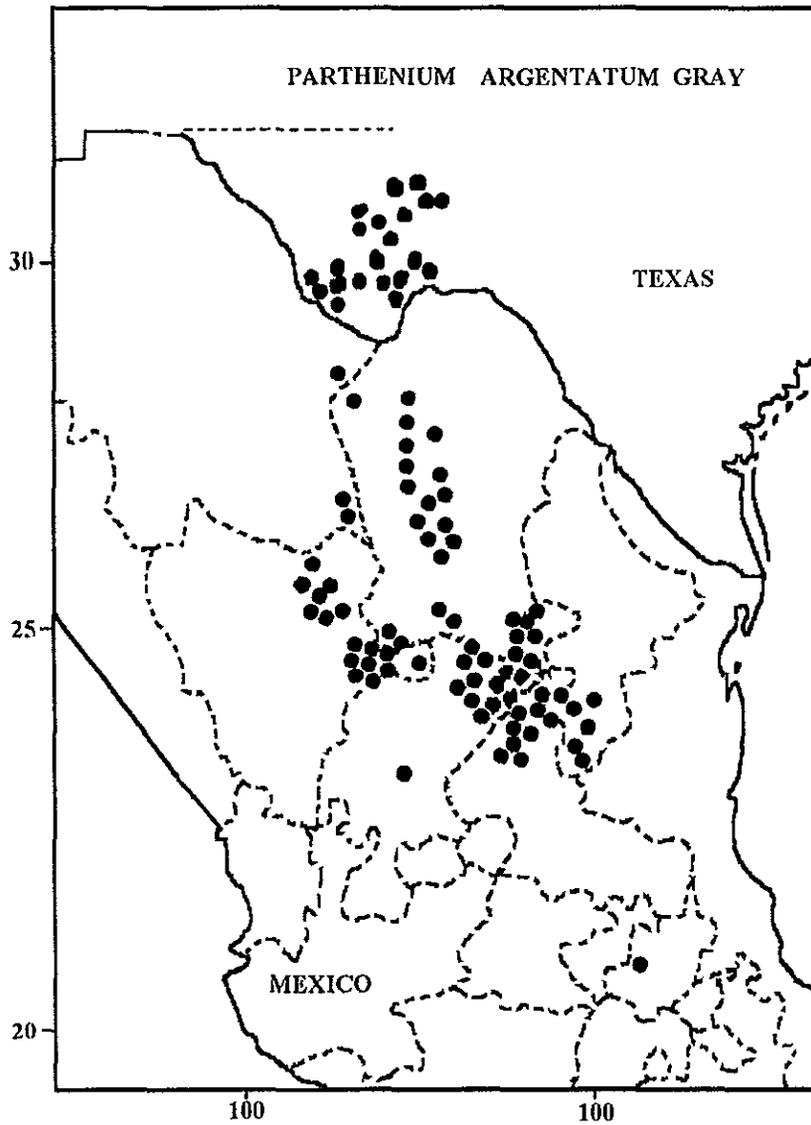


Figura 1. Distribución geográfica de *Parthenium argentatum*.<sup>1</sup>

Debido a su importancia económica, el guayule es una de las plantas productoras de látex más estudiadas, cuya explotación se inició desde principios de siglo. Sin embargo en los años 1910, 1929 y 1944 se observa un inusitado incremento en la explotación de este arbusto; comportamiento que se explica fácilmente al relacionar este fenómeno con las circunstancias históricas de estos años. Así en 1910, se impulsa en los Estados Unidos la producción masiva del automóvil y por consiguiente se requiere mayor cantidad de hule natural; por otro lado, en 1929 se presenta una fuerte recesión mundial, económicamente es más adecuado el pago de peones mexicanos que a sus similares en el vecino país, y por último, en 1944 los Estados Unidos están inmersos en una segunda guerra mundial, situación que los obliga a usar la mayor cantidad de recursos naturales como lo es el hule<sup>1</sup>, en este sentido debe indicarse que el árbol más importante como proveedor de este producto tanto en calidad como en cantidad es denominado como *Hevea brasilensis*, sin embargo, debido a las características de la planta, condiciones climatológicas para su reproducción y las dificultades para su explotación se abandonó su producción a partir de árboles silvestres y cultivados, recurriendo a la explotación de plantas de hule originarias de las zonas semiáridas del norte de México conocida como “guayule”.<sup>2</sup>

Por otra parte el advenimiento de los polímeros sintéticos, desplaza poco a poco el uso industrial del hule natural, de tal forma que la última planta tratadora de guayule en nuestro país cierra sus actividades en 1955. Y no es hasta 1977 que bajo el patrocinio de investigadores mexicanos y norteamericanos, se realiza en Saltillo Coahuila una conferencia mundial, con el fin de impulsar el uso del hule natural en áreas específicas como es la producción de algunos componentes automotrices y en la industria aeronáutica, ya que sus propiedades de tensión y durabilidad entre otras lo hacen una mejor opción que los polímeros sintéticos.<sup>3</sup>

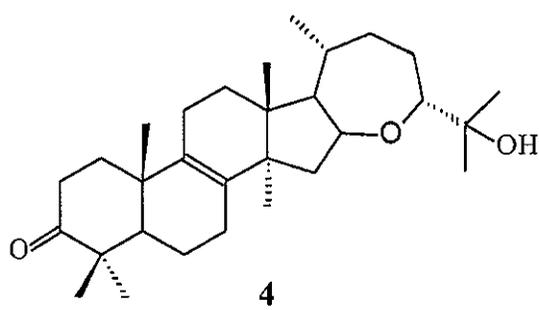
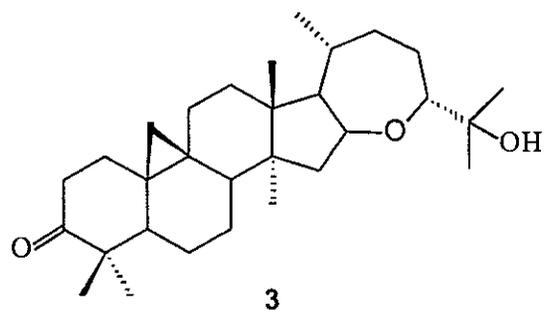
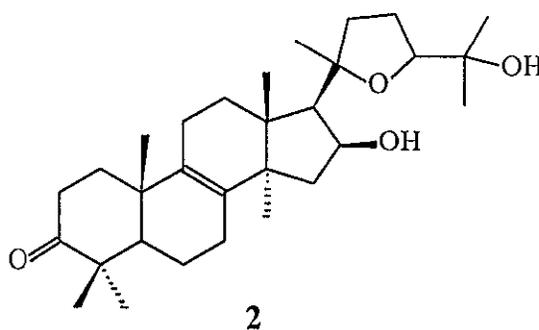
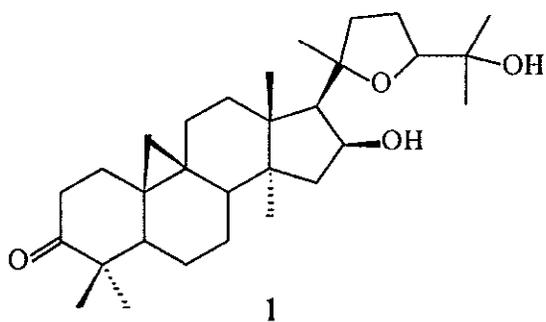
En esta reunión por primera vez se menciona la posibilidad de explotar el residuo que se produce al extraer el hule de la planta. Una de las razones que se expusieron para proponer este estudio, es la gran

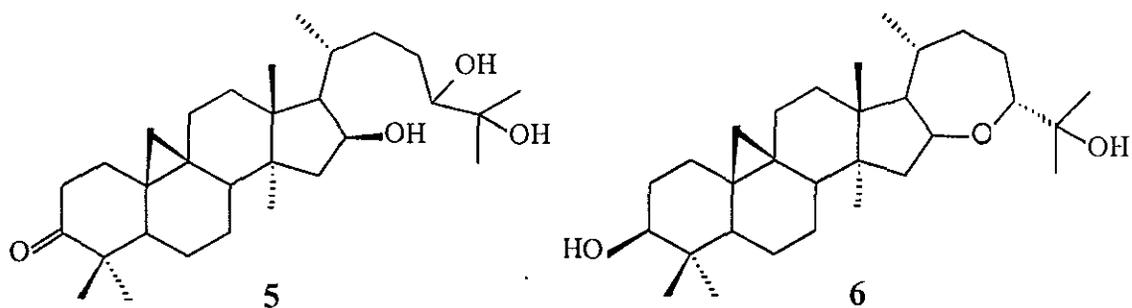
cantidad de residuo obtenido en el proceso, ya que por cada kilogramo de hule natural se obtiene la misma cantidad de residuo.

El primer paso para su eventual explotación, era conocer la constitución de este residuo, al cual generalmente se le llama resina.

Por aquellas fechas se conocía, gracias a investigaciones realizadas por científicos mexicanos, que el guayule contiene las llamadas guayulinas que son de naturaleza sesquiterpénica, así como las argentatinas A (1), B (3), C (5) y D (6) que son triterpenos con esqueleto de cicloartano, acompañadas con las isoargentatinas A (2) y B (4) las cuales poseen un esqueleto de lanostano.

Inicialmente se explicó la presencia de estos dos tipos de triterpenos como la isomerización de las argentatinas a isoargentatinas por procesos de aislamiento y aún más, se postulaba que mediante métodos químicos oxidativos se lograba tal isomerización. Sin embargo nuestros estudios revelan que no existen procesos de isomerización en las condiciones publicadas para tal cambio. <sup>2</sup>





Por otro lado, se conoce que la resina contiene 27%<sup>4,5</sup> de compuestos triterpénicos, porcentaje similar al encontrado en el extracto de guayule sin extraer el hule (*extracto natural*), comportamiento que es totalmente diferente al presentado por las sustancias sesquiterpénicas, ya que si es cierto que en el extracto natural su concentración es relativamente alta, por otro lado su presencia en la resina es nula. Hallazgo que claramente indica la mayor estabilidad de los triterpenos al proceso industrial al que se somete el guayule.

## 1.1. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

Los triterpenos son compuestos de amplia ocurrencia<sup>6</sup> y diversidad estructural cuya actividad farmacológica se ha evaluado en diferentes modelos experimentales tanto in vitro como in vivo<sup>7</sup>, con el fin de establecer su acción y promover la investigación de nuevos compuestos activos; existen varios estudios publicados que mencionan su actividad como inhibidores del crecimiento celular en tumores<sup>8</sup>, por la peroxidación de lípidos y como antiinflamatorios<sup>9</sup>; varios trabajos publicados hacen referencia a la actividad antiinflamatoria de varios compuestos triterpénicos o derivados de ellos, por ejemplo dentro del grupo del lupano (lupeol), oleanano ( $\beta$ -amirina, erithrodiol, hederangenina, ácido oleanolico, y ácido  $\alpha$  y  $\beta$ -glicirretinico) y ursano ( $\alpha$ -amirina, uvaol, y ácido tormentinico)<sup>10</sup>, entre otros como el faradiol y taraxasterol.<sup>11</sup>

Investigaciones realizadas anteriormente,<sup>4</sup> demuestran que los compuestos triterpénicos sintetizados por el *P. argentatum*, denominados argentatinas, son los compuestos más abundantes y estables encontrados en la resina; su posible utilidad farmacológica no ha sido muy explorada.

La mayoría de los trabajos publicados hasta la fecha describen el aislamiento y caracterización de compuestos de naturaleza terpenoide y desde el punto de vista biológico se han llevado a cabo investigaciones dermatológicas de la resina del guayule,<sup>12</sup> así como la evaluación sobre microorganismos como la *Candida albicans*, *Candida stillaitoidea*, *Torulopsis glabrata*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>13</sup> También se ha investigado el efecto de las argentatinas en los receptores hormonales en tumores de mama estrógeno dependientes.<sup>14</sup>

Así mismo, se conocen comercialmente un gran número de productos farmacéuticos cuyo principio activo es un derivado esteroide que presenta en su estructura un sistema heterocíclico.<sup>15</sup> Por otro lado, también se ha comercializado la carbenoxolona, un ácido triterpénico utilizado para el tratamiento de

úlceras gástricas.<sup>16</sup> Recientemente se publicó la síntesis de derivados de argentatina B que presentan similitudes estructurales con la carbenoxolona y otros compuestos extraídos de productos naturales.<sup>17</sup>

El objetivo primordial del presente trabajo es **efectuar la modificación estructural de las argentatinas A y B para la obtención de compuestos heterocíclicos, llevando a cabo la evaluación de su actividad biológica como agentes antiinflamatorios.** Para lo cual, fue necesario plantear los siguientes objetivos particulares:

- 1) Aislar los compuestos bioactivos presentes en la resina del Guayule.
- 2) Caracterizar mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos los compuestos aislados.
- 3) Realizar la transformación química de las Argentatinas con el objeto de obtener los derivados que se mencionan a continuación:

Derivados de la argentatina B: *25-Acetato de argentatina B, 2( $\alpha$ )-bromo-argentatina B, oxima de argetatina B, lactama de argetatina B, lactona de argetatina B, éster metílico del ácido-3,16-dioxo-25-nor-9 $\beta$ , 19-cicloartan-24-oico.*

Derivados de la argentatina A: *16, 25-diacetato de la argentatina A, 2( $\alpha$ )-bromo-argetntatina A, oxima de argetatina A, lactama de argetatina A, 16-dioxo argentatina A, lactona-3,16-dioxo-9 $\beta$ , 19-cicloartan-20, 24-olida A, 3 $\beta$ -hidroxi-argentatina A, ácido-3,16- dioxo-17, 20-en-9 $\beta$ , 19-cicloartan-24-oico.*

- 4) Evaluar la actividad antiinflamatoria de dichos derivados en el modelo del edema inducido por TPA.

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1. MATERIA PRIMA.

La resina es el producto de desecho obtenido durante la extracción a nivel industrial del hule contenido en el *Partenium argentatum* Gregg, este material fue donado por la empresa Complejo Agro-Industrial CONASA ubicada en Saltillo, Coahuila.

### 2.2. APARATOS Y MATERIAL UTILIZADO.

Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato Fisher-Jones y no están corregidos.

Los espectros de Infrarrojo fueron determinados en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 2838.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) y DEPT fueron obtenidos en un espectrofotómetro Varian Gemini VRX a 200MHz y 300MHz para  $\delta\text{H}$  y 75.5 MHz para  $\delta\text{C}$  en  $\text{CDCl}_3$ , DMSO a 25°C.

Los desplazamientos ( $\delta$ ) para  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  están expresados en ppm relativas al Tetrametilsilano TMS referencia interna ( $\delta=0.00$  ppm en ambos casos).

La multiplicidad de las señales se expresa: s (singulete), d (doblete), t (triplete), dd (doble de dobles), m (multiplete).

Los espectros de masas (EM) se determinaron en un espectrómetro Hewlett Packard 5985B GC/MS System y se utilizó la técnica de ionización por impacto electrónico a 70 eV.

Los experimentos de difracción de Rayos X (RX) fueron realizados en un Difractómetro Siemens R3m/v utilizando una radiación tipo  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda=1.54178 \text{ \AA}$ ) y monocromador de grafito.

En las cromatografías en columna se utilizó como fase estacionaria arcilla bentonítica y Silica gel 60 V lerk 60-CF254. Para cromatografía en capa fina se utilizaron cromatofolios Alugram Sil G/UV254, usando como revelador una solución de sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico [ $\text{H}_2\text{SO}_4$ ] 2N y luz UV.

## 2.3. MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS TRITERPENOS

### 2.3.1. Aislamiento de las argentatinas A, B Y D.

La resina [355.5 g] fue eluída a través de una columna con arcilla bentonítica con hexano (Hex), acetato de etilo (AcOEt) y metanol (MEOH) a temperatura ambiente y los extractos correspondientes fueron concentrados a presión reducida.

El extracto de AcOEt se eluyó a través de una columna abierta utilizando como fase estacionaria Gel de Sílice y como fase móvil una solución de Hex:AcOEt de polaridad creciente. De las fracciones eluídas con una mezcla 9:1 de Hex:AcOEt se obtuvieron 12.4427g de argentatina B (3), la cual fue identificada por sus datos espectroscópicos y físicos, así como por comparación con una muestra auténtica.<sup>4,18</sup>

De las fracciones eluídas con una mezcla 3:1 se obtuvieron 0.1387g de un producto cristalino identificado como argentatina D (6).<sup>19</sup>

Por otra parte, de las fracciones eluídas con una mezcla 2:1 Hex:AcOEt se obtuvieron 0.4853g de argentatina A (1), 4.1183g de una mezcla de argentatina A (1) e isoargentatina A (2), esta última aislada de *Partenium incanum* y descrita como incalina.<sup>20</sup>

### 2.3.2. Aislamiento de 16 $\beta$ -hidroxi-24-(R), 25-cetal-9 $\beta$ , 19-cicloartan-3-ona (7) y 16 $\beta$ -hidroxi-24-(S), 25-cetal-9 $\beta$ , 19-cicloartan-3-ona (8).

Al efectuar la purificación de argentatina B (3) se obtuvo un residuo de 926.8mg de una mezcla de productos con un rf 0.5, muy similar al de 3, que fueron separados por cromatografía en columna abierta y eluida con una fase móvil Hex:AcOEt (9:1), obteniéndose un 51.6% del compuesto identificado como 16 $\beta$ -hidroxi-24-(R), 25-cetal-9 $\beta$ , 19-cicloartan-3-ona (7) y 48.35% 16 $\beta$ -hidroxi-24-(S), 25-cetal-9 $\beta$ , 19-ciclolanostan-3-ona (8).

El compuesto 7, 16 $\beta$ -hidroxi-24-(R), 25-cetal-9 $\beta$ , 19-cicloartan-3-ona es un sólido cristalino con fórmula molecular C<sub>33</sub>H<sub>54</sub>O<sub>4</sub>, que presenta un punto de fusión de 176°C y rf de 0.5 en Hex:AcOEt (3:1).

$[\alpha]_D^{25} = 30$  (C.1, CHCl<sub>3</sub>).

IR (CHCl<sub>3</sub>)  $\nu$  máx: 3500.6 cm<sup>-1</sup> (-OH); 1701.1 cm<sup>-1</sup> (C=O de cetona); 1118.9 cm<sup>-1</sup> (C-O).

E.M. m/z (%): 514 (M<sup>+</sup>, 23.07); 499 (M-15, 84.6); 456 (M-58, 28.2); 438 (M-76, 100).

RMN <sup>1</sup>H (200 MHz) ppm: 0.58 (d, J=4.25 Hz, H-19), 0.81 (d, J=4.18 Hz, H-19'), 0.90 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.96 (d, 3H, J=6.4 Hz, H-21), 1.05 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.12 (s, 3H, H CH<sub>3</sub>), 1.20 (s, 3H, H CH<sub>3</sub>), 1.27 (s, 3H, H CH<sub>3</sub>), 1.34 (s, 3H, H CH<sub>3</sub>), 1.41 (s, 3H, H CH<sub>3</sub>), 2.54 (OH-16, 1H), 2.71 (ddd, 1H, J=6.5, 14, 13 Hz, H-2 $\beta$ ), 3.86 (dd, 1H, J=6, 15.5 Hz, H-24), 4.46 (ddd, 1H, J=7.5, 11, Hz, H-16).

RMN <sup>13</sup>C (75.5 MHz) ppm: 32.3 (C-1), 37.4 (C-2), 216.5 (C-3), 50.2 (C-4), 48.4 (C-5), 21.4 (C-6), 25.9 (C-7), 47.9 (C-8), 20.9 (C-9), 26.4 (C-10), 26.4 (C-11), 32.6 (C-12), 46.5 (C-13), 47.0 (C-14), 45.3 (C-15), 72.4 (C-16), 56.8 (C-17), 17.2 (C-18), 29.8 (C-19), 28.6 (C-20), 26.1 (C-21), 33.3 (C-22), 21.4 (C-23), 81.3 (C-24), 80.2 (C-25), 26.1 (C-26), 23.2 (C-27), 18.9 (C-28), 22.1 (C-29), 20.8 (C-30), 106.7 (31), 27.2 (32), 26.8 (33).

Difracción de rayos X: Tamaño 0.32 x 0.20 x 0.06 (mm), ortorrombico con dimensiones de celda unitaria de:  $a=7.580(2)\text{\AA}$ ;  $b=11.550(2)\text{\AA}$ ;  $c=34.570(7)\text{\AA}$ ; Volumen  $3026.6(15)\text{\AA}^3$ , densidad calculada  $1.130\text{Mg/m}^3$ , coeficiente de absorción  $0.557\text{ mm}^{-1}$ .

Así mismo el compuesto *16β-hidroxi-24-(S),25-cetal-9β,19-cicloartan-3-ona* (8) es un sólido cristalino con formula molecular  $\text{C}_{33}\text{H}_{54}\text{O}_4$ , con punto de fusión de  $168\text{-}170^\circ\text{C}$  y  $r_f$  de 0.46 en Hex:AcOEt (3:1).

$[\alpha]^{25}_{\text{D}}=28$  (C.1,  $\text{CHCl}_3$ ).

IR( $\text{CHCl}_3$ )  $\nu$  máx:  $3492.9\text{ cm}^{-1}$  (-OH);  $1699.2\text{ cm}^{-1}$  (C=O de cetona);  $1114.8\text{ cm}^{-1}$  (C-O).

E.M.  $m/z$  (%): 514 ( $\text{M}^+$ , 2.5); 499 (M-15, 85.7); 456 (M-58, 29.4); 438 (M-76, 100).

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) ppm: 0.58 (d,  $J=4.25\text{ Hz}$ , H-19), 0.88 (d,  $J=4.18\text{ Hz}$ , H-19'), 0.92 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 0.96 (d, 3H,  $J=6.43\text{ Hz}$ , H-21), 1.03 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.09 (s, 6H,  $2\text{CH}_3$ ), 1.18 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.24 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.32 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.4 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.54 (OH-16, 1H), 2.705 (ddd, 1H,  $J=6.52, 14, 13\text{ Hz}$ , H-2β), 3.69 (dd, 1H,  $J=3.83, 9.3\text{ Hz}$ , H-24), 4.43 (ddd, 1H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , H-16).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75.5 MHz) ppm: 33.3 (C-1), 37.4 (C-2), 216.5 (C-3), 50.2 (C-4), 47.9 (C-5), 21.4 (C-6), 25.9 (C-7), 48.4 (C-8), 20.9 (C-9), 26.4 (C-10), 26.4 (C-11), 32.5 (C-12), 45.3 (C-13), 45.3 (C-14), 47.5 (C-15), 72.5 (C-16), 56.7 (C-17), 18.2 (C-18), 29.8 (C-19), 28.5 (C-20), 26.1 (C-21), 33.6 (C-22), 47.7 (C-23), 84.6 (C-24), 80.2 (C-25), 22.1 (C-26), 23.04 (C-27), 19.0 (C-28), 20.1 (C-29), 20.8 (C-30), 106.6 (C-31), 26.8 (C-32), 31.05 (C-33).

Difracción de rayos X: Tamaño 0.5 x 0.24 x 0.06 (mm), moclinico con dimensiones de celda unitaria de:  $a=8.710(2)\text{\AA}$ ;  $b=11.482(2)\text{\AA}$ ;  $c=15.366(7)\text{\AA}$ ;  $\beta=104.83(3)^\circ$ , Volumen  $1519.7(8)\text{\AA}^3$ , densidad calculada  $1.125\text{Mg/m}^3$ , coeficiente de absorción  $0.555\text{ mm}^{-1}$ .

## 2.4. OBTENCIÓN DE DERIVADOS DE LA ARGENTATINA A Y ARGENTATINA B.

### 2.4.1. Obtención del 25-Acetato de Argentatina B (10) y 16, 25-diacetato de argentatina A (11).

A una mezcla de argentatina B (3) [500 mg] y acetato de sodio anhidro [139.23 mg] se adicionaron 5 ml de anhídrido acético, mezcla que fue colocada a reflujo durante 36 hr, posteriormente la mezcla de reacción se vertió sobre 50g de hielo y se agitó durante 1 hr. A continuación se extrajo con acetato de etilo (3 X 10 ml). La fase orgánica fue secada con sulfato de sodio anhidro y concentrada a presión reducida obteniéndose una mezcla de dos productos, los cuales fueron separados por cromatografía en columna con una mezcla de Hex:AcOEt de polaridad creciente.

El producto de mayor polaridad fue identificado como argentatina B (3) y el de menor polaridad como 25-acetato de argentatina B (10), con punto de fusión de 163-164°C, cuya espectroscopía se detalla a continuación.

IR (CHCl<sub>3</sub>) v máx. (cm<sup>-1</sup>): 1726 (RCOOR), 1700 (RCOR).

E.M. m/z(%): 498M<sup>+</sup> (1.5); M-58 (440; 5.76), M-59 (439; 28.8), M-60 (438; 83.46); 397 (100); 143 (3.0); 85 (32.30).

RMN <sup>1</sup>H (200 MHz) δ ppm: 0.792 (d, J=4.2 Hz, 1H, H-19), 0.93 (d, J=4.2 Hz, 1H, H-19'), 0.863 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.915 (d, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.024 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.075 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.14 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.36 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.41 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.93 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-COOR-), 2.68 (td, J=7.2 Hz, 2H, H-2), 3.80 (dd, J=12.3, 1.8 Hz, 1H, H-24), 4.59 (c, J=7.8 Hz, 1H, H-16).

RMN <sup>13</sup>C (75.5 MHz) ppm: 33.37 (C-1), 37.43 (C-2), 216.46 (C-3), 50.19 (C-4), 47.31 (C-5), 21.33 (C-6), 25.95 (C-7), 48.40 (C-8), 21.3 (C-9), 26.19 (C-10), 26.24 (C-11), 32.68 (C-12), 45.3 (C-13) 47.8 (C-

14), 44.82 (C-15), 74.42 (C-16), 57.21 (C-17), 18.78 (C-18), 29.65 (C-19), 28.98 (C-20), 25.27 (C-21), 35.27 (C-22), 22.34 (C-23), 80.17 (C-24), 76.57 (C-25), 22.50 (C-26), 22.15 (C-27), 19.51 (C-28), 20.75 (C-29), 21.06 (C-30), 170.23 ( $\underline{\text{C}}\text{OO}-\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ), 21.38 ( $\text{COO}-\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ).

La argentatina A (1) fue tratada de la misma manera para obtener un compuesto cristalino con punto de fusión de 200-204°C identificada como 16,25-diacetato de argentatina A (11)<sup>13</sup>, y que presentó los siguientes datos espectroscópicos:

IR ( $\text{CHCl}_3$ )  $\nu$  máx. ( $\text{cm}^{-1}$ ): 1727.1(RCOOR), 1700.1(RCOR).

E.M. m/z (%): 556 ( $\text{M}^+$ , ); M-60 (496;37.0); M-59 (3.08); M-58 (498;1.5); 185 (58.68); 143 (33.97); 125 (100); 85 (10.03); 59 (3.08); 58 (0.77); 43 (44.01).

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz)  $\delta$  ppm: 0.58 (d, J=5.6 Hz, 1H, H-19), 0.84 (d, J=5.6 Hz, 1H), 0.95 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.04 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.09 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.22 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.39 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.46 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.54 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.0 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.02 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.75 (t, J=7.76 Hz, 1H, H-24), 5.41 (m, 1H, H-16).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75.5 MHz) ppm: 33.22 (C-1), 37.37 (C-2), 216.2 (C-3), 50.13 (C-4), 47.7 (C-5), 21.2 (C-6), 26.2 (C-7), 48.35 (C-8), 22.13 (C-9), 26.43 (C-10), 26.72 (C-11), 32.04 (C-12), 46.5 (C-13) 46.99 (C-14), 45.45 (C-15), 75.04 (C-16), 57.0 (C-17), 20.75 (C-18), 30.39 (C-19), 85.05 (C-20), 22.91 (C-21), 34.93 (C-22), 25.63 (C-23), 81.68 (C-24), 82.28 (C-25), 28.68 (C-26), 22.68 (C-27), 19.90 (C-28), 21.57 (C-29), 20.08 (C-30), 22.13 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_3-\text{CO}-$ ), 22.68 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_3-\text{COO}-$ ), 170.44 ( $\text{CH}_3-\underline{\text{C}}\text{OO}-$ ), 170.30( $\text{CH}_3-\underline{\text{C}}\text{O}-$ ).

#### 2.4.2. Obtención del 2( $\alpha$ )-Bromo-Argentatina B (12).

Se disolvieron 314 g de argentatina B (3) en 9 ml de  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , posteriormente se adicionó gota a gota a temperatura ambiente y agitación continua, 0.9 ml de una solución 1.0 M de  $\text{Br}_2$  en ácido acético. Después de 3/4 de hr de haber sido adicionada la solución de  $\text{Br}_2$ <sup>21,22,23</sup> se evapora el ácido a presión

reducida, el sólido se lavó con agua y se purificó por cromatografía en columna. Recristalizado con una mezcla de AcOEt: Hex., se obtuvo así una sustancia cristalina blanca con punto de fusión de 212-214°C. IR (CHCl<sub>3</sub>)  $\nu$  máx: 3546.8 cm<sup>-1</sup>(-OH); 1721 cm<sup>-1</sup> (C=O ).

E.M. m/z (%): 534 (M<sup>+</sup>, 4.08); 519 (M<sup>+</sup>-15, 2.7); 476 (M<sup>+</sup>-58, 26.02); 475 (M<sup>+</sup>-59, 47.9); 175 (100); 143 (15.6); 85 (95.2); 59 (76.02).

RMN <sup>1</sup>H (200 MHz) ppm: 0.6807 (d, J=4.4 Hz, 1H, H-19), 0.855 (s, 3H,CH<sub>3</sub>), 0.91 (d,3H,J=6.26 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.06 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub>), 1.127 (s, 9H, 3CH<sub>3</sub>), 2.75 (s, 1H, OH), 3.5923 (dd, 1H, J=12.21 Hz, H-24), 4.57 (c,1H, J=7.7 Hz, H-16), 5.1 (dd, 1H $\beta$ , J=6.5 Hz, H-2).

RMN <sup>13</sup>C (75.5 MHz) ppm: 33.3 (C-1), 46.0 (C-2), 205.6 (C-3), 55.0 (C-4), 48.4 (C-5), 21.2 (C-6), 20.9 (C-7), 47.4 (C-8), 21.3 (C-9), 26.19 (C-10), 26.4 (C-11), 32.4 (C-12), 45.9 (C-13) 47.5 (C-14), 44.9 (C-15), 74.9 (C-16), 57.3 (C-17), 18.7 (C-18), 29.2 (C-19), 29.2 (C-20), 20.9 (C-21), 35.4 (C-22), 23.4 (C-23), 82.5 (C-24), 73.2 (C-25), 23.9 (C-26), 25.6 (C-27), 19.5 (C-28), 20.8 (C-29), 23.0 (C-30).

### 2.4.3 Obtención de 2( $\alpha$ )-Bromo-argentatina A (13)<sup>13</sup>.

Se disolvieron 200 mg de argentatina A (1) en 5 ml de CH<sub>3</sub>COOH, posteriormente se adicionó gota a gota y a temperatura ambiente y con agitación continua 0.5 ml de una solución 1.0 M de Br<sub>2</sub> en ácido acético. Después de 45 min. de haber sido adicionada la solución de Br<sub>2</sub><sup>21,22,24</sup>, se agregó hielo precipitando un polvo amarillo el cual fue filtrado y lavado con una solución de NaHCO<sub>3</sub> (10%) y posteriormente con agua. Dicho sólido fue purificado por cromatografía en columna y recristalizando con una mezcla de AcOEt/Hex, obteniendo un producto cristalino blanco con punto de fusión de 116-118°C y la siguiente espectroscopía.

IR (KBr)  $\nu$  máx: 3418.5 cm<sup>-1</sup>(-OH); 1717.9 cm<sup>-1</sup> (C=O de cetona); .

E.M. m/z (%): 550 (M<sup>+</sup>, 0.77); 492 (M<sup>+</sup>-58, 3.8); 491 (M<sup>+</sup>-59, 3.1); 143 (100); 125 (17.8); 85 (12.4); 59 (7.7); 58 (0.7).

RMN <sup>1</sup>H (200 MHz) ppm: 0.76 (d, 1H, H-19), 0.899 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.14 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.23 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.2610 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.29 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.44 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.47 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.12 (s, 1H, -OH), 3.84 (m, H, H-24), 4.62 (m, H, H-16), 5.12 (m, 1H $\beta$ , H-2).

RMN <sup>13</sup>C (75.5 MHz) ppm: 32.9 (C-1), 37.58 (C-2), 201.4 (C-3), 50.9 (C-4), 47.7 (C-5), 21.01 (C-6), 25.6 (C-7), 43.5 (C-8), 20.8 (C-9), 25.9 (C-10), 26.6 (C-11), 31.8 (C-12), 46.2 (C-13) 46.5 (C-14), 48.3 (C-15), 73.2 (C-16), 55.44 (C-17), 21.6 (C-18), 30.2 (C-19), 87.0 (C-20), 21.1 (C-21), 37.32 (C-22), 27.30 (C-23), 84.46 (C-24), 70.89 (C-25), 27.3 (C-26), 26.1 (C-27), 20.38 (C-28), 20.67 (C-29), 21.0 (C-30).

#### 2.4.4. Obtención de la oxima de argentatina B (14) y oxima de argentatina A (15).

La argentatina B (3) [516.9 mg] se disolvió en 1.6 ml de piridina y se adicionó clorhidrato de hidroxilamina, [115.27 mg] manteniendo la reacción con agitación constante y reflujo durante 1 hr. Posteriormente se adicionó tolueno y se evaporó a presión reducida el azeótropo tolueno-piridina. El producto obtenido se disolvió en ACOEt y se lavó con una solución de NaHCO<sub>3</sub> al 10% hasta neutralidad. La fase orgánica, se secó con NaSO<sub>4</sub> anhidro y se evaporó el disolvente a presión reducida. De esta reacción se obtuvo un producto cristalino con punto de fusión de 224-226°C identificado como *oxima de argentatina B* (14) de acuerdo con la siguiente espectroscopía:

IR(CHCl<sub>3</sub>)  $\nu$  máx: 3588 cm<sup>-1</sup>(-OH); 3265.7 cm<sup>-1</sup> (-OH); 1699 cm<sup>-1</sup> (C=N); 962 cm<sup>-1</sup>; 926.4 cm<sup>-1</sup> (N-O).

E.M. m/z (%): 471 (M<sup>+</sup>, 25.6); 413 (M<sup>+</sup>-58, 47.8); 412 (M<sup>+</sup>-59, 99.1); 143 (16.6); 85 (49.57); 59 (100).

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) ppm: 0.42 (d, 1H, J=4.4 Hz, H-19), 0.64 (d, 1H, J=3.8 Hz, H-19'), 0.87 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.868 (d, 3H, J=6.3 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.20 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 1.062 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.09 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.75 (s, 1H, OH), 3.4 (dd, 1H, J=12.75 Hz, H-24), 4.52 (c, 1H, J=7.6 Hz, H-16).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75.5 MHz) ppm: 32.7 (C-1), 19.9 (C-2), 167.01 (C-3), 42.67 (C-4), 47.16 (C-5), 21.2 (C-6), 26.02 (C-7), 48.65 (C-8), 21.1 (C-9), 26.4 (C-10), 25.7 (C-11), 32.7 (C-12), 45.72 (C-13) 45.8 (C-14), 44.7 (C-15), 74.88 (C-16), 57.37 (C-17), 18.64 (C-18), 29.4 (C-19), 28.97 (C-20), 20.9 (C-21), 35.4 (C-22), 23.46 (C-23), 82.5 (C-24), 73.25 (C-25), 23.8 (C-26), 225.6 (C-27), 19.4 (C-28), 23.6 (C-29), 21.7 (C-30).

La *oxima de la argentatina A* (15)<sup>13</sup> se obtuvo al hacer reaccionar una mezcla de argentatina A e isoargentatina A disueltas en piridina, con clorhidrato de hidroxilamina, de la misma forma que para la *oxima de argentatina B*. El producto de reacción fue purificado por cromatografía en columna con una mezcla de Hex:ACOEt (1:1), separando únicamente 15 mg de un producto cristalino identificado como *oxima de argentatina A* de acuerdo con el análisis espectroscópico realizado.

IR (cm<sup>-1</sup>)  $\nu$  máx: 3368 cm<sup>-1</sup> (-OH); 1644 cm<sup>-1</sup> (C=N); 940 (N-O).

E.M. m/z (%): 487.7 (M<sup>+</sup>, 17.5); 429 (M<sup>+</sup>-58, 3.0); 428 (M<sup>+</sup>-59, 4.0); 143 (100); 125 (22.3); 85 (12.8); 59 (7.1); 58 (2.7).

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) ppm: 0.51 (d, 1H, J=4.2 Hz, H-19), 0.68 (d, 1H, J=3.6 Hz, H-19'), 0.87 (s, 3H CH<sub>3</sub>), 1.02 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub>), 1.06 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.16 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.24 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.4 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.4 (dd, 1H, J=12.75 Hz, H-24), 3.76 (c, 1H, J=7.5 Hz, 1H, H-16), 5.7 (s, 1H, N-H).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75.5 MHz) ppm: 32.7 (C-1), 42.6 (C-2), 167.1 (C-3), 51.4 (C-4), 48.8 (C-5), 21.7 (C-6), 26.1 (C-7), 47.6 (C-8), 20.9 (C-9), 27.3 (C-10), 26.1 (C-11), 23.1 (C-12), 46.6 (C-13) 46.3 (C-14), 48.7 (C-15), 73.4 (C-16), 55.6 (C-17), 21.2 (C-18), 30.0 (C-19), 87.2 (C-20), 25.7 (C-21), 37.3 (C-22), 23.7 (C-23), 84.5 (C-24), 70.8 (C-25), 26.3 (C-26), 27.3 (C-27), 20.3 (C-28), 20.9 (C-29), 20.9 (C-30).

Difracción de rayos X: Tamaño 0.4 x 0.32 x 0.26 (mm), ortorombico con dimensiones de celda unitaria de:  $a=27.458(2)\text{\AA}$ ;  $b=7.9900(10)\text{\AA}$ ;  $c=13.0030(2)\text{\AA}$ ;  $\beta=104.83(3)^\circ$ , Volumen  $2852.9(2)\text{\AA}^3$ ,  $z=4$ , densidad calculada  $1.135\text{ Mg/m}^3$ , coeficiente de absorción  $0.557\text{ mm}^{-1}$ .

#### 2.4.5. Obtención de la lactama de argentatina B (16).

Una solución de **3** [100mg] en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  se le adicionaron 0.5 ml de anhídrido trifluoroacético lentamente a  $0^\circ\text{C}$ . Concluida la adición se mantuvo la mezcla de reacción a t.a. por 18 min. Posteriormente se adicionaron 5 ml de agua y se extrajo el producto de reacción con AcOEt [3 x 5ml], lavando la fase orgánica con  $\text{NaHCO}_3$  [10%], secando con  $\text{NaSO}_4$  anhidro, filtrada y concentrada a presión reducida obteniendo por recristalización en Hex/ $\text{CHCl}_3$  un producto cristalino con p.f.  $245\text{-}247^\circ\text{C}$  y la siguiente espectroscopía.

IR( $\text{CHCl}_3$ )  $\nu$  máx:  $3542\text{ cm}^{-1}$  (-NH-);  $3397.5\text{ cm}^{-1}$  (-OH),  $1638.7\text{ cm}^{-1}$  (R-CONH-R).

E.M. m/z (%): 471 ( $\text{M}^+$ , 25.8); 413 ( $\text{M}^+-58$ , 7.4); 412 ( $\text{M}^+-59$ , 18.3); 143 (3.4); 85 (9.5); 58 (100).

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) ppm: 0.54 (d,  $J=4.8\text{ Hz}$ , 1H, H-19), 0.66 (d,  $J=4.8\text{ Hz}$ , 1H, H-19'), 0.902 (s, 3H, H-28), 0.93 (d, 3H,  $J=6.5\text{ Hz}$ , H-21), 1.09 (s, 6H, H-26, H-27), 1.2 (s, 3H, H-18), 1.51 (s, 3H, H-29), 1.29 (s, 3H, H-30), 3.59 (dd, 1H,  $J=2.3, 12.4\text{ Hz}$ , H-24), 4.6 (dd, 1H,  $J=7.7, 15\text{ Hz}$ , H-16).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75.5 MHz) ppm: 32.2 (C-1), 30.2 (C-2), 177.1 (C-3), 42.2 (C-4), 56.0 (C-5), 19.3 (C-6), 25.4 (C-7), 48.4 (C-8), 29.4 (C-9), 20.7 (C-10), 26.8 (C-11), 32.8 (C-12), 34.8 (C-13) 37.6 (C-14), 44.8 (C-15), 74.9 (C-16), 57.4 (C-17), 19.0 (C-18), 29.9 (C-19), 28.9 (C-20), 25.59 (C-21), 35.3 (C-22), 22.2 (C-23), 82.5 (C-24), 73.2 (C-25), 23.8 (C-26), 22.6 (C-27), 19.5 (C-28), 20.8 (C-29), 20.9 (C-30).

#### 2.4.6. Obtención de la lactama de argentatina A (17)<sup>13</sup>.

A 100 mg de *oxima de argentatina A* disueltos en  $\text{CHCl}_3$  se le adicionaron 0.5 ml de anhídrido trifluoroacético lentamente a 0°C. Concluida la adición se mantuvo la mezcla de reacción con agitación constante a 25°C durante 18 min. Posteriormente se evaporó el anhídrido trifluoroacético, el ácido trifluoroacético obtenido y el  $\text{CHCl}_3$  a presión reducida. De esta reacción se obtuvo un producto identificado como *16-trifluoroacetoxi-lactama de argentatina A* (18).

A dicho producto se le adicionó una solución de carbonato de potasio en metanol y se mantuvo con agitación durante 15 min. a t.a., posteriormente la solución se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida.

El producto de reacción se purificó por cromatografía en columna con polaridad de 2:1 Hex:ACOEt, obteniendo una mezcla de productos identificados como *lactama de argentatina A* (17)<sup>13</sup>.

IR ( $\text{cm}^{-1}$ )  $\nu$  máx: 3612  $\text{cm}^{-1}$ (NH); 3395.2  $\text{cm}^{-1}$  (-OH), 1644.4 (R-CONH-R).

E.M. m/z (%): 487 ( $\text{M}^+$ , 29.27); 429 ( $\text{M}^+$ -58, 5.4); 428 ( $\text{M}^+$ -59, 11.5); 143 (64.86); 125 (17.56); 59 (16.2); 58 (100).

RMN <sup>13</sup>C (75.5 MHz) ppm: 29.5 (C-1), 29.9 (C-2), 175.6 (C-3), 55.5 (C-4), 48.2 (C-5), 21.0 (C-6), 26.5 (C-7), 48.5 (C-8), 21.0 (C-9), 26.5 (C-10), 26.7 (C-11), 33.0 (C-12), 45.9 (C-13) 45.5 (C-14), 50.08 (C-15), 71.5 (C-16), 56.3 (C-17), 20.26 (C-18), 30.1 (C-19), 85.6 (C-20), 25.2 (C-21), 36.2 (C-22), 23.3 (C-23), 83.4 (C-24), 69.4 (C-25), 27.0 (C-26), 27.6 (C-27), 20.3 (C-28), 22.1 (C-29), 24.4 (C-30).

#### 2.4.7. Obtención de lactona de argentatina B (20) y 16-oxo-argentatina A (21).

A una solución de 3 [300mg] en 5.6 ml de  $\text{CHCl}_3$  se adicionó MCIPBA [174.6 mg] y una solución acuosa al 10%  $\text{NaHCO}_3$  [50ml] con agitación a t.a. por 1 hr. Posteriormente la fase orgánica fue separada y lavada con una solución 10%  $\text{NaHCO}_3$ , secada con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrada y evaporada hasta

obtener un aceite amarillo que se purificó por cromatografía en columna con polaridad 9:1 Hex:AcOEt, obteniendo un producto cristalino con p.f.132-138°C, el cual fue identificado como *lactona de argentina B (20)* de acuerdo con los siguientes datos espectroscópicos.

IR (CHCl<sub>3</sub>)  $\nu$  máx: 3500 cm<sup>-1</sup>(-OH); 1702.03 cm<sup>-1</sup> (COOR).

E.M. m/z (%):472 (M<sup>+</sup>, 9.8); 414 (M<sup>+</sup>-58, 71.12); 413 (M<sup>+</sup>-59, 100); 143 (16.19); 85 (52.81); 59 (32.39).

RMN <sup>1</sup>H (200 MHz) ppm: 0.585 (d, 1H, J=4.4 Hz, H-19), 0.658 (d, 1H, H-19'), 3.55 (d, 1H, J=11.4 Hz, H-24), 2.67 (s,OH), 0.869 (s, 3H, H-28), 0.9285 (d, 3H, H-21), 1.053 (s, 6H, H-26), 1.053 (s, 6H, H-27), 1.117 (s, 3H, H-30), 1.370 (s, 3H, H-29), 1.4429 (s, 3H, H-18), 4.57 (c, 1H, J=8.4 Hz, H-16).

RMN <sup>13</sup>C (75.5 MHz) ppm: 24.9 (C-1), 25.7 (C-2), 175.4 (C-3), 87.1 (C-4), 49.7 (C-5), 25.3 (C-6), 26.7 (C-7), 48.2 (C-8), 22.7 (C-9), 27.3 (C-10), 26.7 (C-11), 32.6 (C-12), 45.2 (C-13) 45.0 (C-14), 44.9 (C-15), 74.9 (C-16), 57.0 (C-17), 18.9 (C-18), 29.6 (C-19), 28.8 (C-20), 20.8 (C-21), 35.3 (C-22), 23.3 (C-23), 82.4 (C-24), 73.1 (C-25), 23.8 (C-26), 25.8 (C-27), 19.6 (C-28), 22.9 (C-29), 30.9 (C-30).

Difracción de rayos X: Tamaño 0.6 x 0.5 x 0.06 (mm), ortorrómbica con dimensiones de celda unitaria de:  $a=8.201(2)\text{Å}$ ;  $b=12.827(2)\text{Å}$ ;  $c=25.567(7)\text{Å}$ ; Volumen 2689.6(3)Å<sup>3</sup>, densidad calculada 1.167Mg/m<sup>3</sup>, coeficiente de absorción 0.587 mm<sup>-1</sup>.

Por otra parte el sólido cristalino con punto de fusión de 124°C fue identificado como *16-oxo-argentina A (21)*<sup>13</sup> de acuerdo con los siguientes datos espectroscopicos:

IR (KBr)  $\nu$  máx: 3444.9 cm<sup>-1</sup>(-OH); 1732 cm<sup>-1</sup> (C=O anillo de 5); 1705 cm<sup>-1</sup> (C=O anillo de 6).

E.M. m/z (%): 470 (M<sup>+</sup>, 1.1); 412 (M<sup>+</sup>-58, 100); 411 (M<sup>+</sup>-59, 90.0); 143 (59.2); 125 (93.0); 85 (76.1); 59 (25.4);58 (1.5).

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz) ppm: 0.66 (d, J=4.2 Hz, 1H, H-19), 0.85 (d, J=4.2 Hz, 1H, H-19'), 1.06 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.1 (s, 9H, 3CH<sub>3</sub>), 1.16 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.24 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.35 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.08 (s,1H, OH), 3.81 (dd, J=6.3 Hz, 1H, H-24).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75.5 MHz) ppm: 33.15 (C-1), 37.32 (C-2), 215.9 (C-3), 51.20 (C-4), 47.06 (C-5), 21.3 (C-6), 25.4 (C-7), 48.3 (C-8), 22.17 (C-9), 26.19 (C-10), 26.1 (C-11), 33.15 (C-12), 45.9 (C-13) 47.06 (C-14), 50.1 (C-15), 215.9 (C-16), 63.7 (C-17), 26.36 (C-18), 30.02 (C-19), 84.9 (C-20), 25.1 (C-21), 37.8 (C-22), 24.1 (C-23), 83.47 (C-24), 71.3 (C-25), 27.5 (C-26), 26.35 (C-27), 19.8 (C-28), 20.29 (C-29), 20.75 (C-30).

#### 2.4.8 Obtención del éster metílico del ácido-3, 16-dioxo-25-nor-9 $\beta$ , 19-cicloartan-24-oico (22).

A una solución de 3 [508 mg] en ácido acético glacial [15 ml], se le agregó una solución acuosa de trióxido de cromo [1g en 5 ml], la adición se realizó gota a gota durante los primeros 15 min. Permitiendo que la reacción continuara una hora, después de este tiempo la solución se diluyó con agua y se extrajo con  $\text{CHCl}_3$ . La fase orgánica resultante se lavó con una solución de  $\text{NaHCO}_3$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , se seco con  $\text{NaSO}_4$  anhidro y se evaporó el disolvente a presión reducida. El producto obtenido se purificó por cromatografía en columna, obteniendo un sólido cristalino con punto de fusión de 104-110°C identificado como el éster metílico del ácido-3, 16-dioxo-25-nor-9 $\beta$ , 19-cicloartan-24-oico (22), cuyos datos espectroscópicos son los siguientes:

IR (KBr)  $\nu$  máx: 3380  $\text{cm}^{-1}$  (-OH); 1730  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1703.7 (-COOH).

E.M. m/z (%): 442 ( $\text{M}^+$ , 1.92); 384 ( $\text{M}^+$ -58, 3.1); 383 ( $\text{M}^+$ -59, 2.3); 143 (9.3); 85 (7.7); 59 (4.6).

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) ppm: 0.8575 (d, 1H, J=3.9 Hz, H-19), 0.6485 (d, 1H, J=4.5 Hz, H-19'), 1.9855 (d, 3H, J=9.3 Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1.064 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.11 (d, 6H, J=2.4,  $\text{CH}_3$ ), 1.184 (s, 3H, H-18), 2.04 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -COO-).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75.5 MHz) ppm: 33.3 (C-1), 37.1 (C-2), 216.2 (C-3), 50.2(C-4), 48.2 (C-5), 21.4 (C-6), 26.2 (C-7), 47.2 (C-8), 20.3 (C-9), 26.2 (C-10), 26.4 (C-11), 32.0 (C-12), 45.3 (C-13) 42.4 (C-14), 50.3 (C-

15), 216.9 (C-16), 61.5 (C-17), 18.5 (C-18), 30 (C-19), 19.8 (C-20), 30.9 (C-21), 31.2 (C-22), 30.0 (C-23), 179.7 (C-24), 19.2 (C-28), 22.1 (C-29), 20.8 (C-30).

#### 2.4.9. Obtención de lactona-3,16-dioxo-9 $\beta$ , 19-cicloartan-20, 24-olida A (23).

A una solución de la argentatina A [400 mg] en ácido acético glacial [15 ml] se adicionó una solución acuosa de trióxido de cromo [1g en 5 ml], la adición se realizó gota a gota durante los primeros 15 min. Después de 1 hr, la solución se diluyó con agua y se extrajo con CHCl<sub>3</sub> la fase orgánica se lavó con una solución de NaHSO<sub>4</sub> anhidro y se evaporó el disolvente a presión reducida.

IR (KBr)  $\nu$  máx: 1766.6 cm<sup>-1</sup> (RCOOR); 1736 cm<sup>-1</sup> (C=O anillo de 5); 1700 (C=O anillo de 6).

E.M. m/z (%): 426 ( M<sup>+</sup>, 100); 368 (M<sup>+</sup>-58,0.7); 367 (M<sup>+</sup>-59, 0.7); 143 (2.3); 125 (5.7); 85 (3.0); 59 (0.7); 58 (0.38).

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz) ppm: 0.67 (d, J=4.8 Hz, 1H, H-19), 0.88 (d, J=4.5 Hz, 1H, H-19'), 1.06 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.19 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub>), 1.34 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.48 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (75.5 MHz) ppm: 33.12 (C-1), 37.27 (C-2), 215.14 (C-3), 50.14 (C-4), 48.5 (C-5), 21.21 (C-6), 26.20 (C-7), 47.0 (C-8), 20.18 (C-9), 26.49 (C-10), 26.14 (C-11), 33.38 (C-12), 45.74 (C-13), 46.21 (C-14), 50.55 (C-15), 215.83 (C-16), 65.08 (C-17), 28.30 (C-18), 30.07 (C-19), 85.48 (C-20), 22.14 (C-21), 42.36 (C-22), 27.78 (C-23), 177.24 (C-24), 19.72 (C-28), 20.71 (C-29), 19.89 (C-30).

#### 2.4.10. Obtención de 3( $\beta$ )-hidroxi-argentatina A (24).

A una solución de 2 g de argentatina A (1) en CHCl<sub>3</sub> se adicionó NaBH<sub>4</sub> a una temperatura de 0-5°C con agitación durante 30 min. Posteriormente se diluyó con agua y se aciduló con ácido acético, obteniendo un producto sólido que se filtro y lavó con agua, para posteriormente ser recristalizado en una solución de CHCl<sub>3</sub>-Hex., obteniendo un sólido blanco con punto de fusión de 125-128°C con la siguiente espectroscopía:

IR (KBr)  $\nu$  máx: 3616  $\text{cm}^{-1}$ (-OH); 3424  $\text{cm}^{-1}$  (-OH).

E.M. m/z (%): 474(  $\text{M}^+$ ,9.3); 416 (  $\text{M}^+$ -58, 6.2); 415 (  $\text{M}^+$ -59, 6.9); 143 (100); 125 (26.3); 85 (17.0); 59 (8.5); 58 (12.4).

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) ppm: 0.35 (d,  $J=4.2$  Hz, 1H, H-19), 0.60 (d,  $J=4.2$  Hz, 1H, H-19'), 0.813 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 0.88 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 0.97 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.13 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.24 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.27 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.42 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.46 (s, 1H, OH), 3.83 (c, $J=7.5$ , 1H, H-24), 4.59 (m,  $J=2.4,5.1$  Hz,1H, H-16).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75.5 MHz) ppm: 30.4 (C-1), 31.9 (C-2), 78.8 (C-3), 40.6 (C-4), 47.8 (C-5), 20.9 (C-6), 26.3 (C-7), 47.2 (C-8), 19.5 (C-9), 26.0 (C-10), 26.3 (C-11), 33.2 (C-12), 46.6 (C-13) 46.3 (C-14), 48.5 (C-15), 73.3 (C-16), 55.6 (C-17), 20.9 (C-18), 30.3 (C-19), 87.1 (C-20), 25.3 (C-21), 37.3 (C-22), 23.7 (C-23), 84.9 (C-24), 70.80 (C-25), 27.2 (C-26), 26.0 (C-27), 20.3 (C-28), 25.4 (C-29), 26.0 (C-30).

#### 2.4.11. Obtención del ácido-3, 16-dioxo-17, 20-en-9 $\beta$ , 19-cicloartan-24-oico (25).

Una solución de la lactona-3,16-dioxo-9 $\beta$ ,19-cicloartan-20,24-olida A (23) [109 mg] en 2.23 ml de etanol, se adicionaron [288.7 mg] de hidróxido de potasio. La solución se agitó y calentó a reflujo por 40 min. Posteriormente la reacción fue acidificada con una solución al 10% de ácido clorhídrico hasta neutralidad y se extrajo con acetato de etilo [3 x 50 ml].

La fase orgánica fue lavada con bicarbonato de sodio al 10% y secada con sulfato de sodio anhidro. El producto de reacción fue cromatografiado en una columna de sílica gel y eluída con una solución de polaridad ascendente de Hex:ACOEt, para obtener un producto cristalino con punto de fusión de 182°C.

IR (KBr)  $\nu$  máx: 3327  $\text{cm}^{-1}$ (-OH); 1741  $\text{cm}^{-1}$  (C=O, anillo de 5), 1703  $\text{cm}^{-1}$  (C=O, anillo de 6), 1615  $\text{cm}^{-1}$  (COOH).

E.M. m/z (%): 426 (  $\text{M}^+$ ,39.69); 411 (  $\text{M}^+$ -15, 100); 368 (  $\text{M}^+$ -58, 2.2); 367 (  $\text{M}^+$ -59, 3.0); 143 (4.5); 125 (3.0); 85 (4.1); 59 (1.1); 58 (0.7).

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) ppm: 0.64 (d,  $J=4.2$  Hz, 1H, H-19), 0.86 (d,  $J=4.8$  Hz, 1H, H-19'), 0.98 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.064 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.11 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.35 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.92 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75.5 MHz) ppm: 33.1 (C-1), 37.2 (C-2), 216.0 (C-3), 50.20 (C-4), 48.2 (C-5), 22.6 (C-6), 26.0 (C-7), 47.9 (C-8), 20.9 (C-9), 26.3 (C-10), 26.3 (C-11), 32.6 (C-12), 42.3 (C-13) 45.7 (C-14), 51.0 (C-15), 207.3 (C-16), 141.7 (C-17), 20.2 (C-18), 30.6 (C-19), 149.5 (C-20), 22.1 (C-21), 30.8 (C-22), 29.2 (C-23), 178.6 (C-24).

### 3. DISCUSIÓN

#### 3.1. OBTENCIÓN DE LOS EPÍMEROS 16 $\beta$ -HIDROXI-24 ( R), 25-CETAL-9 $\beta$ , 19-CICLOARTAN-3-ONA (7) Y 16 $\beta$ -HIDROXI-24 ( S), 25-CETAL-9 $\beta$ , 19-CICLOARTAN-3-ONA (8).

Durante el proceso de purificación de la argentatina B se obtuvo un residuo formado por una mezcla de dos productos identificados como producto A y producto B, los cuales fueron separados por cromatografía en columna abierta y eluida con fase móvil Hex:AcOEt (9:1).

El producto A presentó en el espectro de masas un ion molecular de 514 m/z para una fórmula mínima de C<sub>33</sub>H<sub>54</sub>O<sub>4</sub> (figura 2). En el espectro de infrarrojo (figura 3) se observan bandas asignadas para grupos oxhidrilo y carbonilo. Por el número de señales que mostró el espectro de RMN <sup>13</sup>C, así como su fórmula mínima sugieren que el producto A es de naturaleza triterpenica y posiblemente estructuralmente relacionado a las argentatinas.

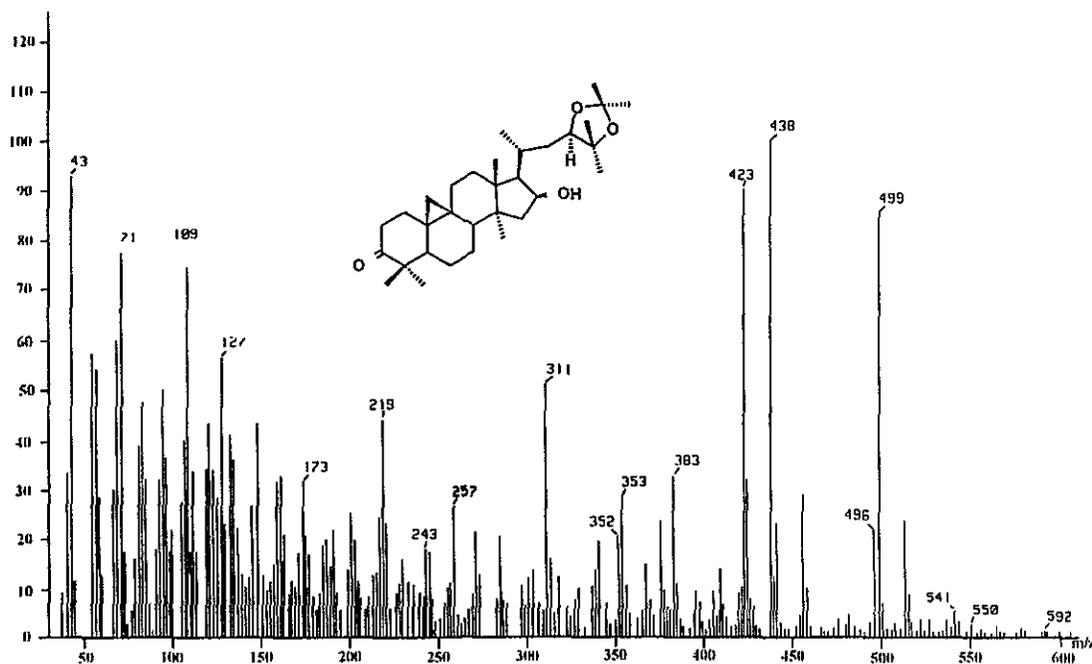


FIGURA 2. Espectro de masas de (7).

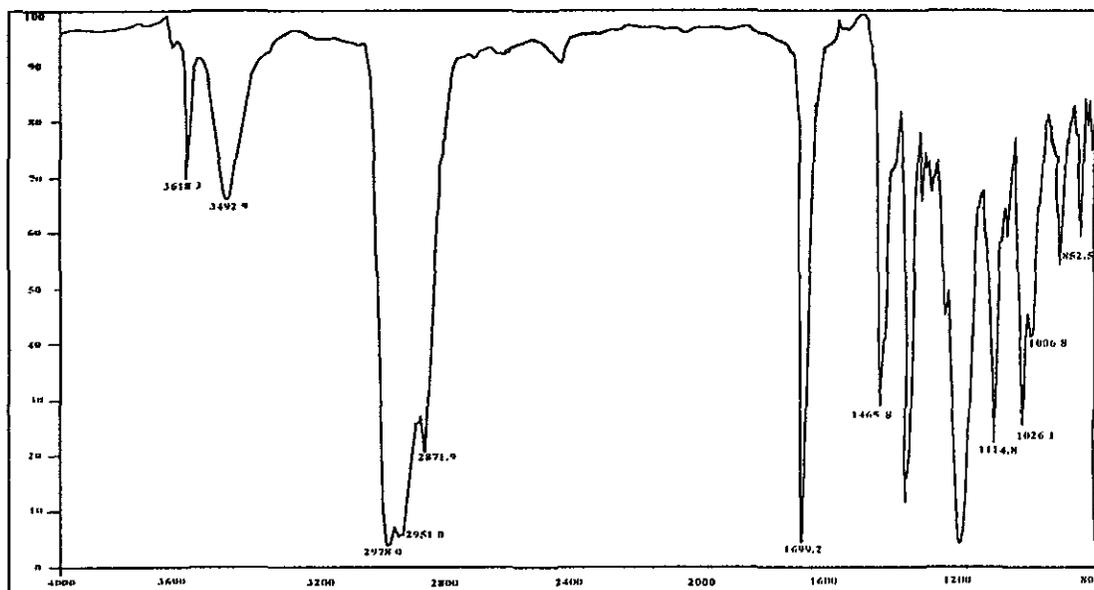


FIGURA 3. Espectro de Infrarrojo de (7).

El análisis del espectro de RMN  $^1\text{H}$  (figura 4) confirma esta proposición ya que se observan dos dobletes a 0.58 y 0.81 ppm característicos para un grupo ciclopropilo, así como un dd a 3.86 y un ddd a 4.46 ppm asignadas para un hidrógeno unido a átomos de carbono y enlazados a átomos de oxígeno. Todas estas señales son características de un triterpeno del tipo cicloartano, como las llamadas argentatinas. Sin embargo el producto A presenta 3 átomos de C y 4 de hidrógeno adicionales a las estructuras de las argentatinas.

Este problema estructural se resolvió al analizar la RMN  $^{13}\text{C}$ , ya que se observan señales para nueve metilos, lo cual sugiere la formación de un cetal ya que es bien conocido que durante el proceso industrial, la resina se trata con acetona para obtener mayores cantidades de poliisopreno.

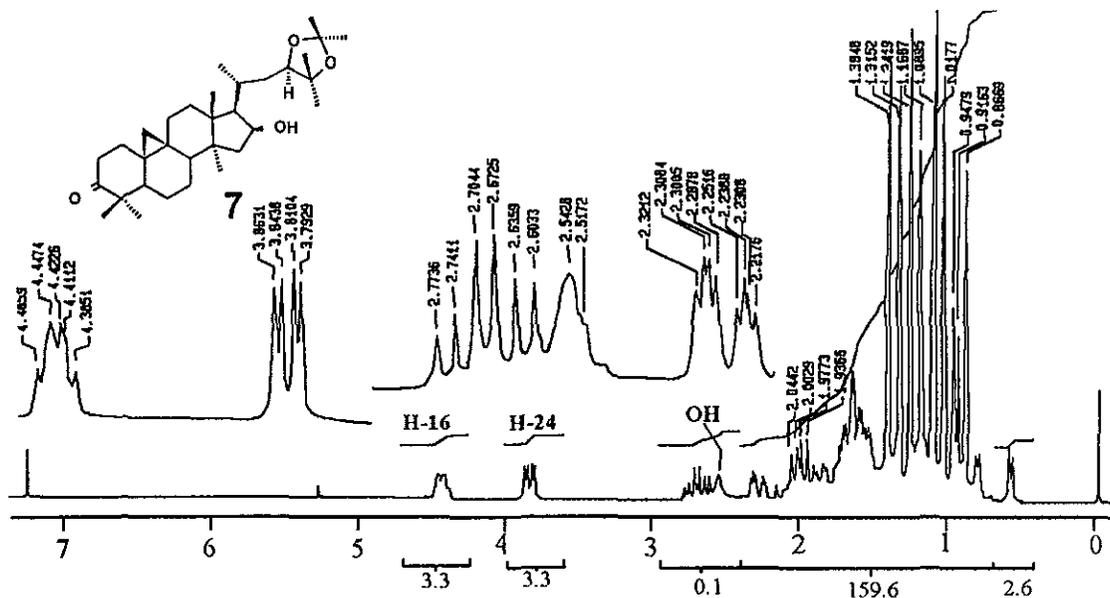


FIGURA 4. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de (7).

Esta proposición fue confirmada mediante el análisis del espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (figura 5), ya que se observan las señales a campo bajo para el carbonilo en C-3 a 216 ppm, así como señales a 81, 80 y 72 ppm asignadas a átomos de carbono unidos a oxígeno, que forman el anillo cetalico. Así se propone la estructura 7 para el producto A.

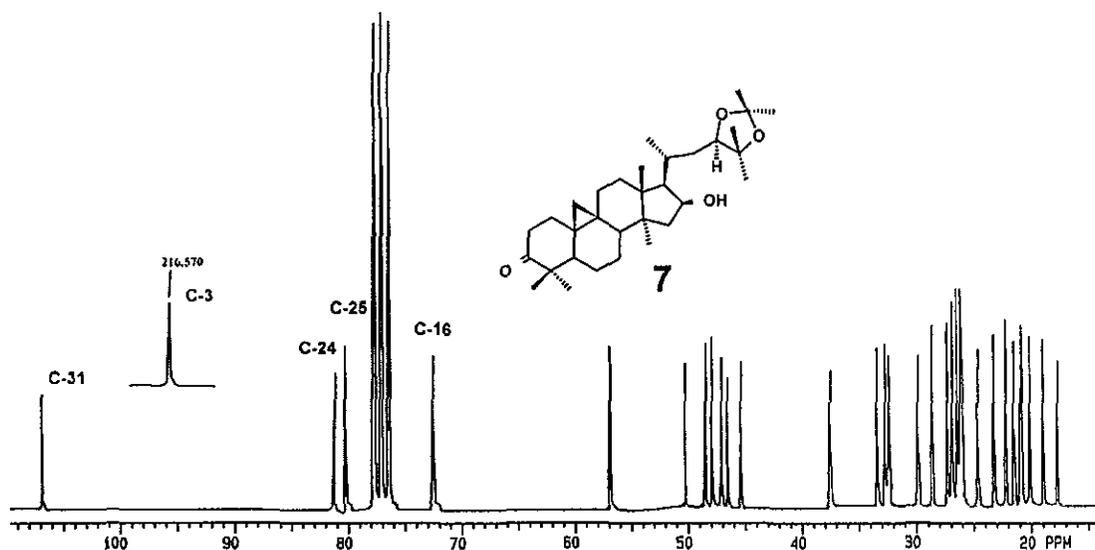
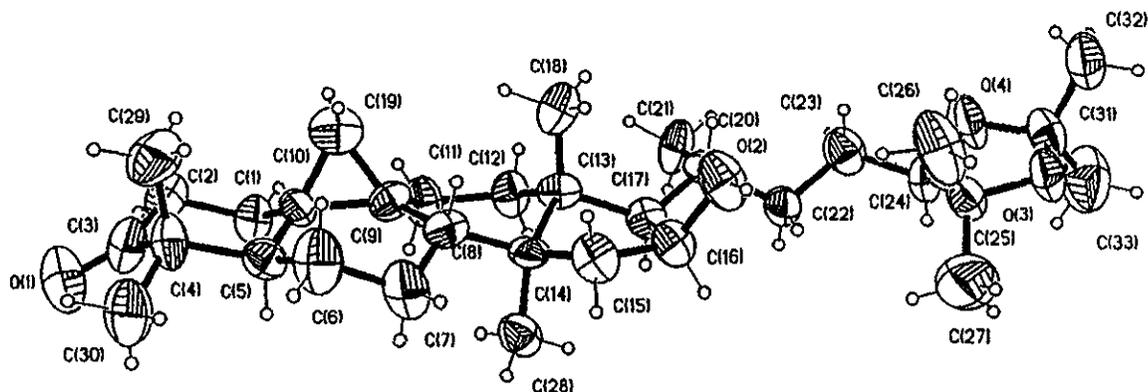


Figura 5. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de 7.

Proposición que fue corroborada por análisis de difracción de rayos X del compuesto A.

La estereo estructura obtenida por este método claramente muestra la existencia de un anillo cetalico en las posiciones C-24 y C-25.

Así mismo se determina como R el centro quiral en C-24.



**Figura 6.** Estructura obtenida por difracción de rayos X del *16β-hidroxi-24(R),25-cetal-9β, 19-cicloartan-3-ona (7)*.

Por otro lado el producto B es un isómero del producto A, ya que presentó en el espectro de masas un ion molecular de 514 m/z para una fórmula mínima de  $C_{33}H_{54}O_4$  (figura 7).

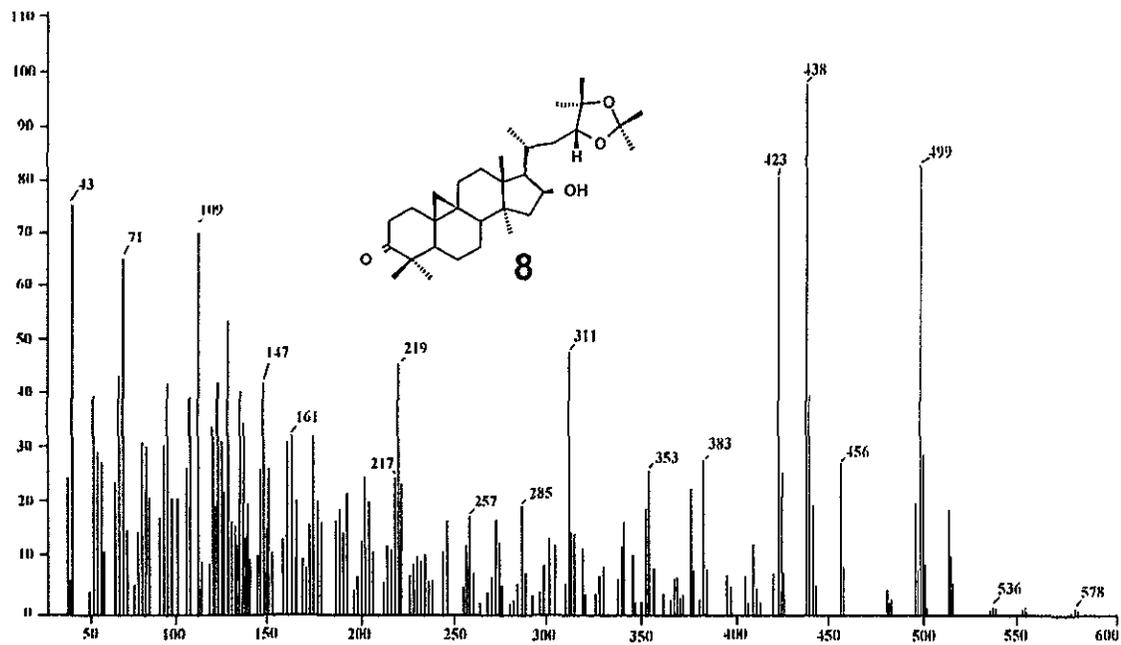


FIGURA 7. Espectro de Masas de (8).

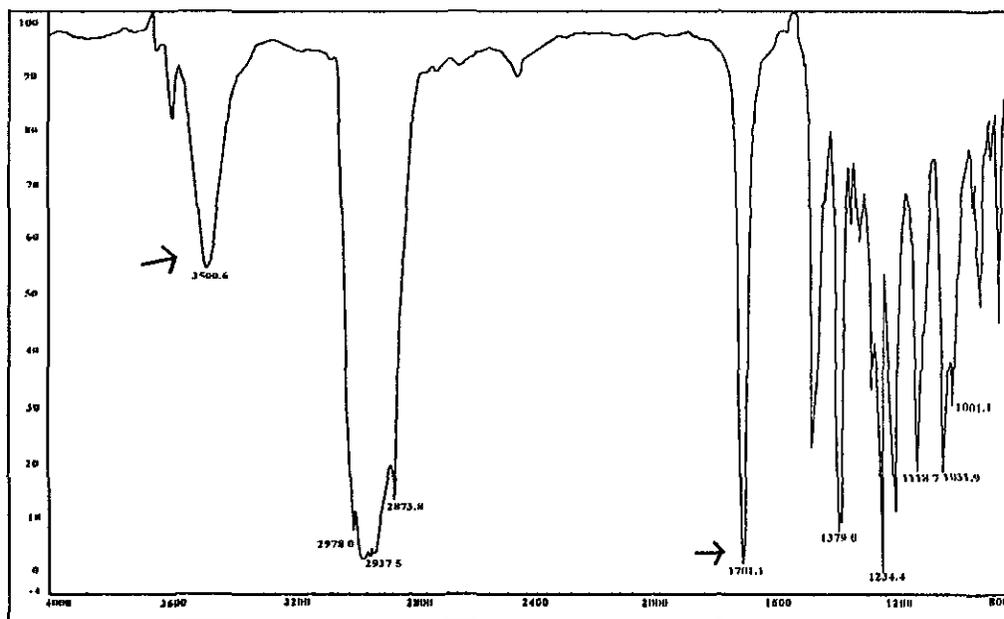


FIGURA 8. Espectro de Infrarrojo de (8).

Esta proposición fue confirmada por el análisis del espectro de RMN <sup>1</sup>H (figura 9) donde también se observan los dos dobletes a 0.58 y 0.92 ppm característicos para un grupo ciclopropilo, así como un dd a 3.69 y un ddd a 4.43 ppm asignadas para un hidrógeno unido a un átomo de carbono enlazados a átomos

de oxígeno. Todas estas señales, características de un triterpeno del tipo cicloartano como se mencionó anteriormente.

El producto 8 también presenta 3 átomos de C y 4 de hidrógeno adicionales a las estructuras de las argentatinas, y como en el caso del producto (7), este problema estructural se resolvió al analizar la RMN  $^1\text{H}$  ya que se observan señales para nueve metilos, siendo uno de ellos un metilo secundario, lo cual sugiere la formación de un cetal.

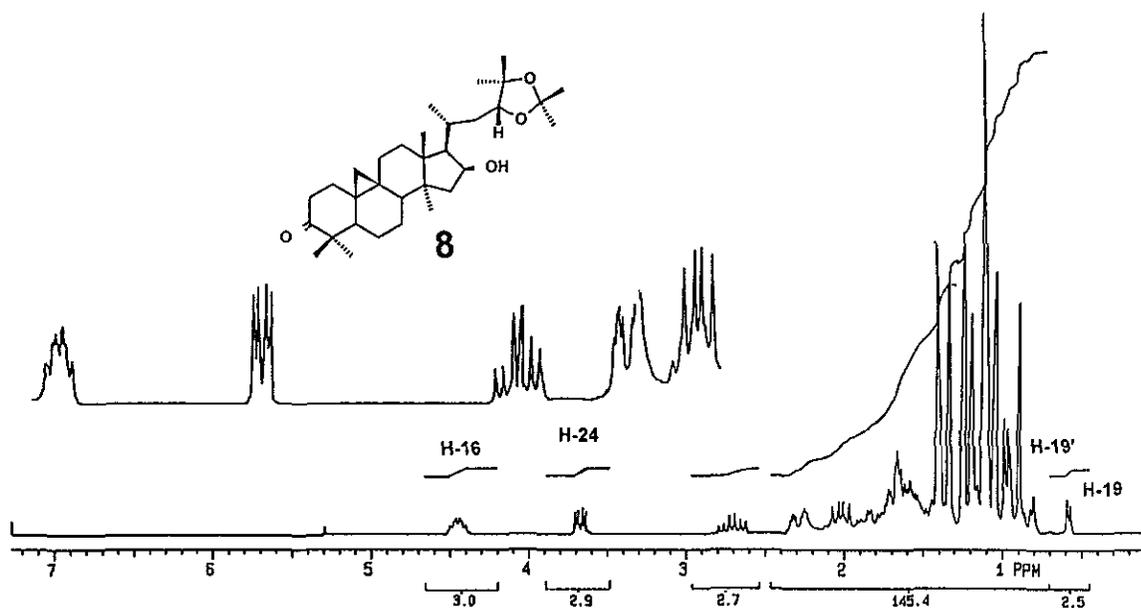


FIGURA 9. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de (8).

Esta proposición fue confirmada mediante el análisis del espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (figura 10), ya que se observan las señales a campo bajo para el carbonilo en C-3 a 216 ppm, así como señales a 84, 80 y 72 ppm asignadas a átomos de carbono unidos a oxígeno.

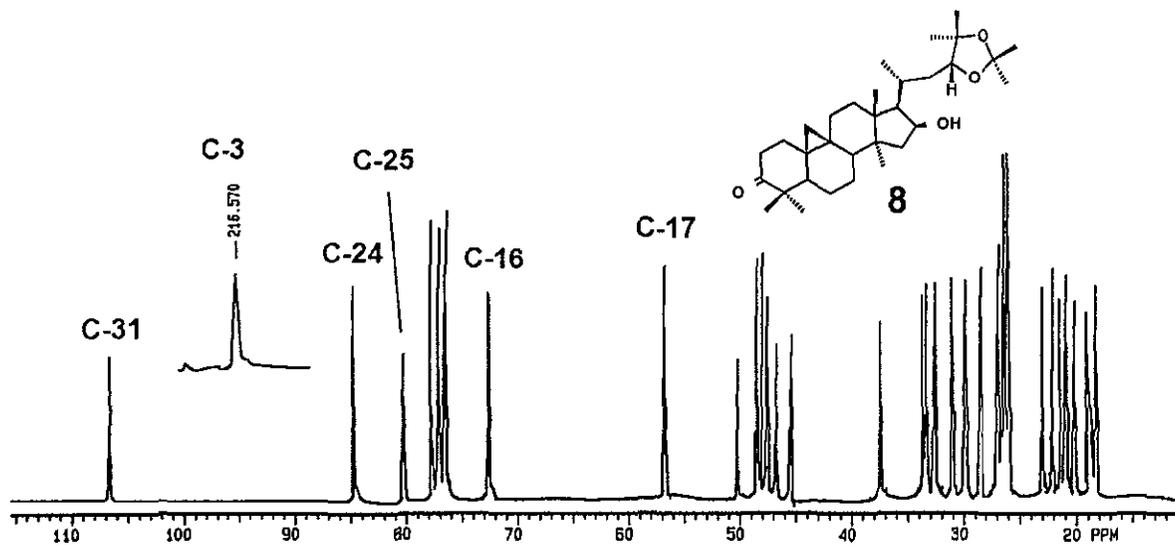


FIGURA 10. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de (8).

Resultados que junto con el análisis de RX (figura 11) demuestran que la estructura propuesta para 8 es la correcta.

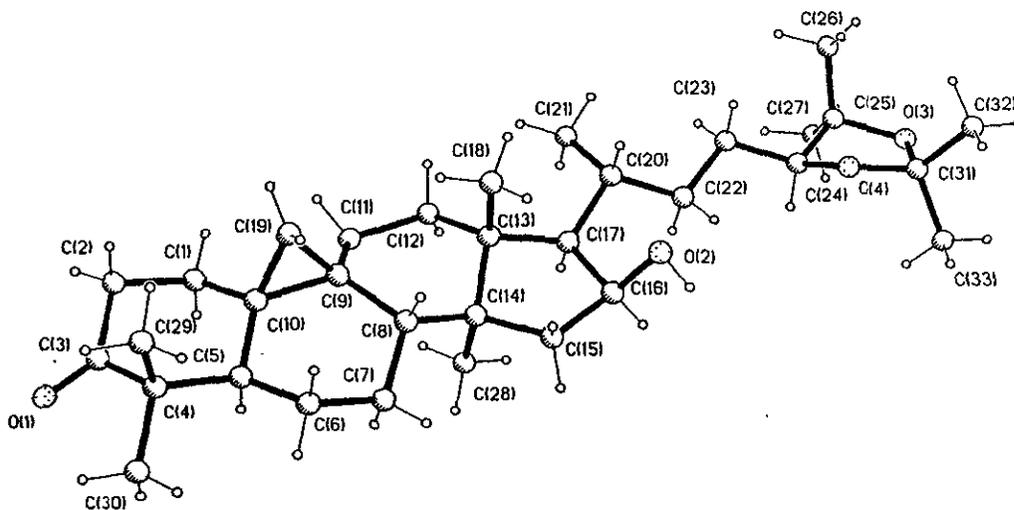
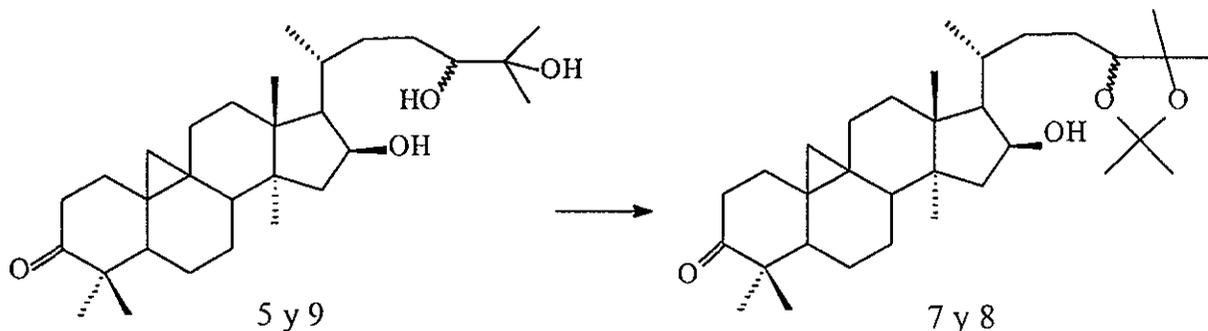
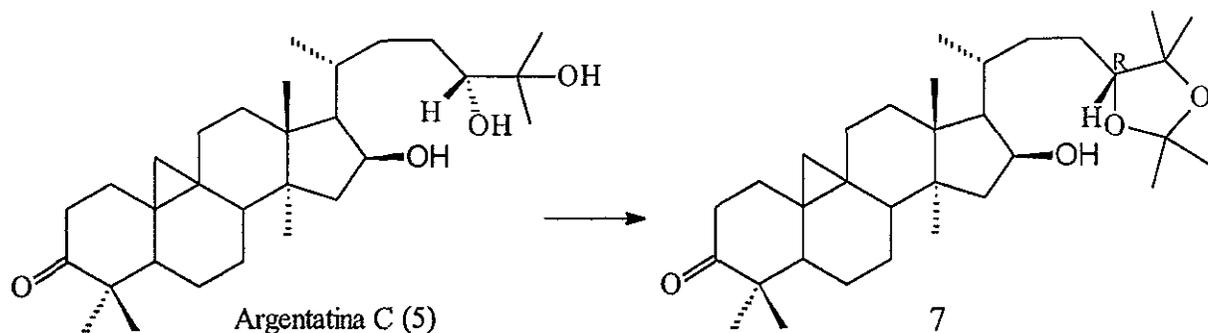


Figura 11. Estructura obtenida por análisis de difracción de rayos X del 16 $\beta$ -hidroxi-24(S), 25-cetal-9 $\beta$ , 19-cicloatann-3-ona (8).

Es claro que la formación del anillo cetalico en los compuestos 7 y 8 provienen de la condensación de la acetona, utilizada en el proceso industrial para la obtención de hule, con los grupos hidroxilo en C-24 y C-25 de los precursores 5 y 9.



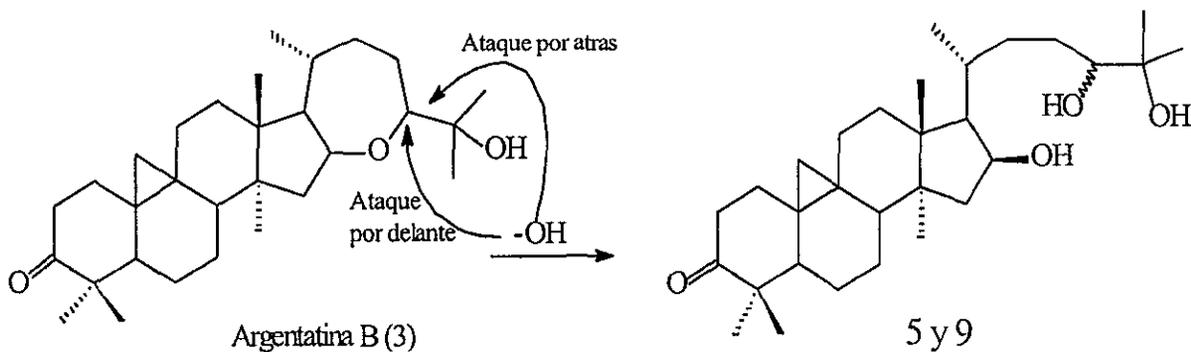
Uno de estos precursores es la  $16\beta$ -hidroxi-24-(R), 25-cetal-9 $\beta$ , 19-cicloartan-3-ona (argentatina C) (5), la cual presenta una configuración (R) en el átomo C-24.<sup>4,19</sup>



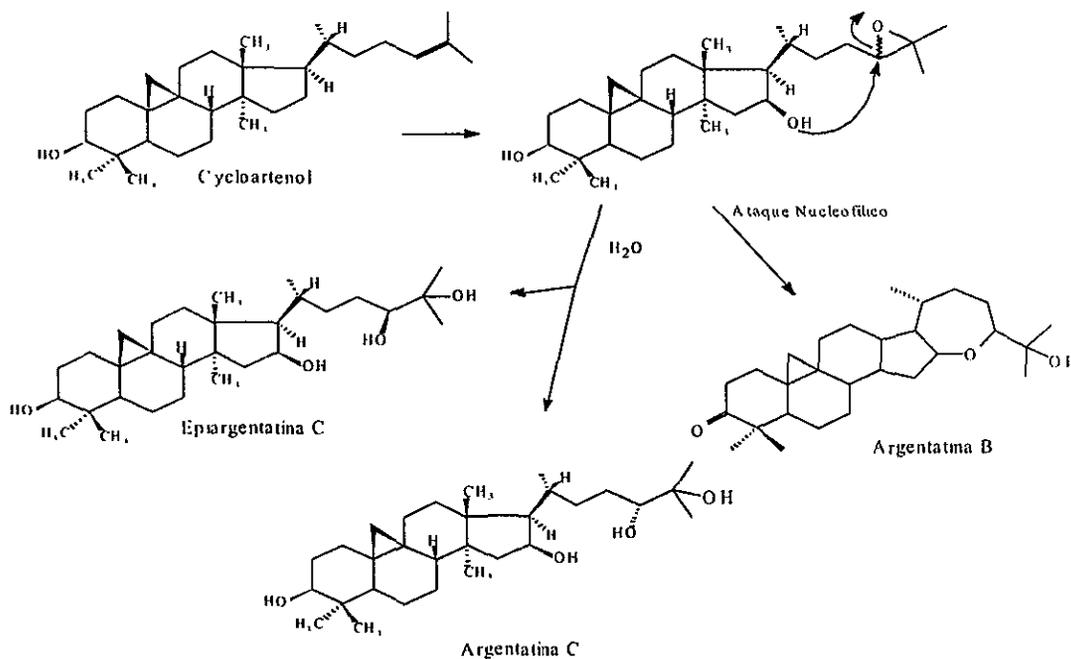
Por lo tanto la condensación de la argentatina C con una molécula de acetona produce el compuesto 7.

De manera análoga el compuesto 8 se forma al condensarse una molécula de acetona con  $16\beta$ -hidroxi-24-(S), 25-cetal-9 $\beta$ , 19-cicloartan-3-ona (epiargentatina C) (9). Siendo esta una estructura novedosa.

La formación de la argentatina C (5) y de la epiargentatina C (9) podría suponerse mediante la apertura de la argentatina B en medio básico, condiciones similares a las usadas en el proceso industrial.



Sin embargo esta posibilidad fue descartada, ya que la argentatina B no sufrió ninguna alteración cuando se sometió a reflujo durante 15 días en presencia de hidróxido de sodio disuelto en una mezcla etanol-agua. Por otro lado se puede plantear una ruta biogénica para explicar la formación de 5 y 9. Esta proposición biosintética supone la formación de un epóxido de cicloartenol<sup>24</sup>, el cual ha sido aislado *del Parthenium argentatum lozaniaum*,<sup>25</sup> que mediante un proceso de hidrólisis daría origen a la *argentatina C* así como a la *epiargentatina C*. Aun más, un ataque nucleofílico del grupo alcohol sobre este epóxido daría lugar a la *argentatina B*, que es el triterpeno más abundante en el *P. argentatum* (figura 12).



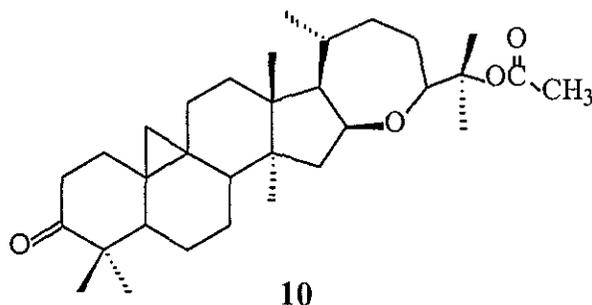
**Figura 12.** Ruta biogénica propuesta para la argentatina C (5) y epiargentatina C (9).

Tomando en consideración estos datos, se propone que el *16β*-hidroxi-24 (*R*), 25-cetal-9β, 19-cicloartan-3-ona (7) y su epímero (8) son artefactos formados durante la extracción industrial del hule. Sin embargo el precursor de (8), la *16β*, 24 (*S*), 25-trihidroxi-9β, 19-cicloartan-3-ona resulto ser una estructura novedosa.

## 3.2.OBTENCIÓN DE DERIVADOS DE LA ARGENTATINA A (1) Y ARGENTATINA B (3).

### 3.2.1.Obtención del 25-Acetato de Argentatina B (10) y 16,25-diacetato de argentatina A (11).

#### *Acetilación de la argentatina B.*



La reacción de acetilación de la argentatina B (3) produjo el esperado derivado acetilado en C-25 de la argentatina B (10) como un producto sólido blanco. Los datos espectroscópicos más relevantes que ponen en evidencia la formación de 10 son:

El fragmento a  $m/z$  438 que corresponde a la pérdida de una molécula de ácido acético a partir del ion molecular y la presencia en el espectro de infrarrojo de una banda a  $1726\text{ cm}^{-1}$  asignada al grupo carbonilo del acetato formado.

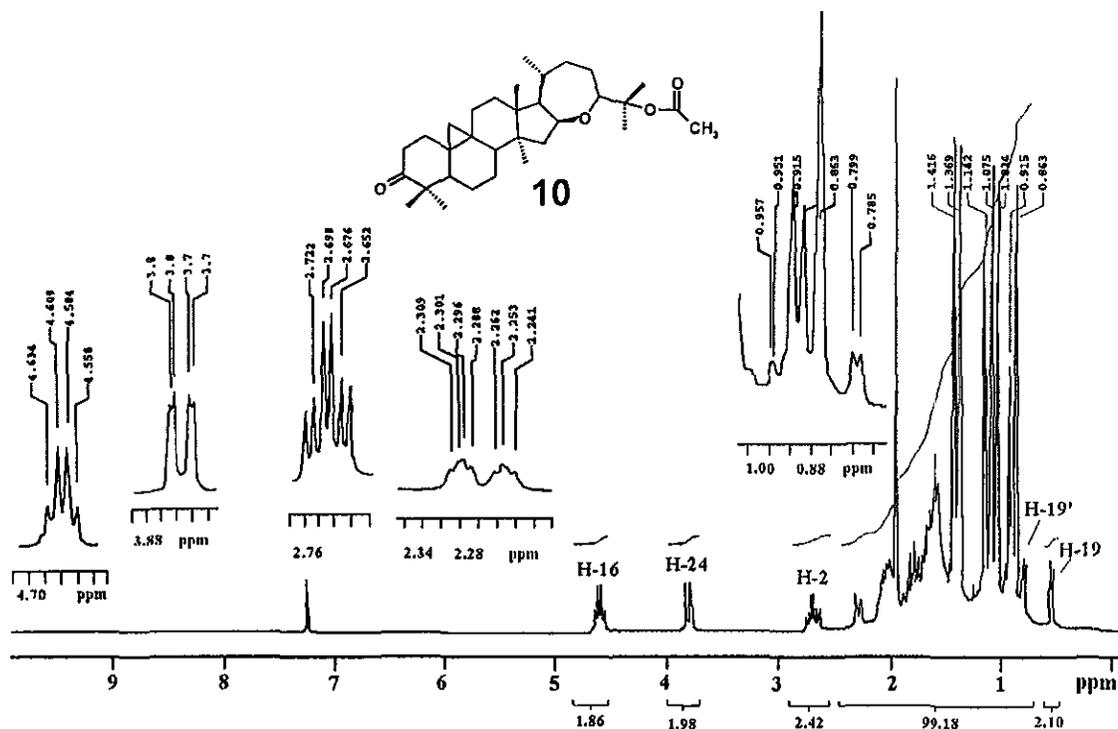


FIGURA 13. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del 25-acetato de argentinina B (10).

Así, en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 9 (figura 13) se observa una señal simple adicional en la región de 1.93 ppm asignada al metilo de acetato, mientras que en RMN  $^{13}\text{C}$  (figura 14) se observa claramente en 170.23 ppm la señal asignada al carbono de carbonilo de acetato, así como la correspondiente al grupo metilo en 21.38 ppm.

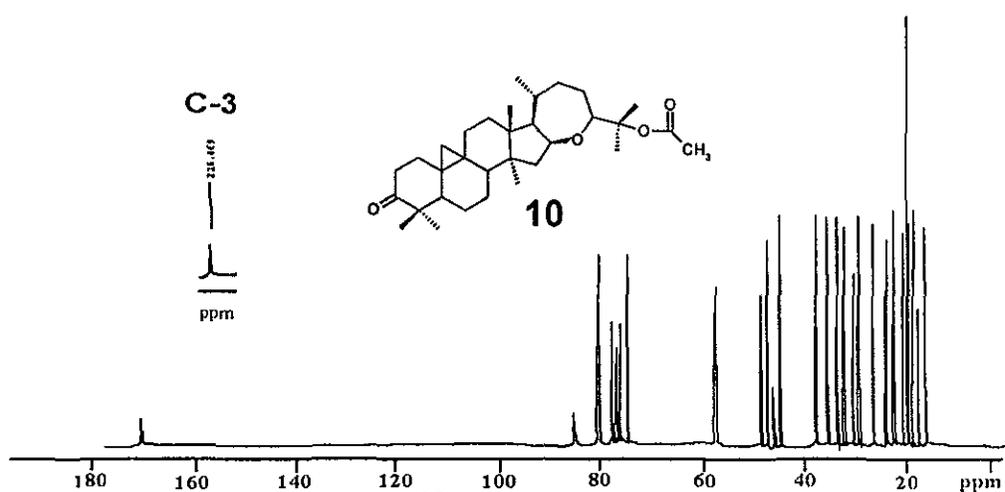
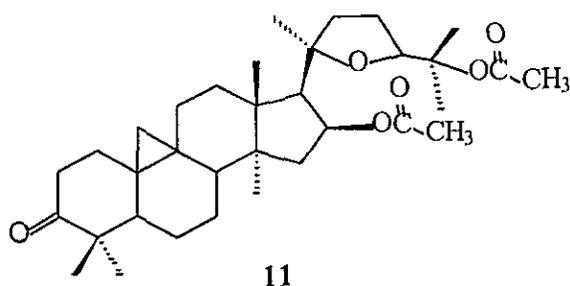


FIGURA 14. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del 25-acetato de argentinina B (10).

### Acetilación de argentatina A.



La reacción de acetilación de la argentatina A se llevó a cabo en las mismas condiciones que la argentatina B, obteniéndose un producto cristalino con punto de fusión de 200-204°C identificado como *16,25-diacetato de argentatina A* (11), de acuerdo datos espectroscópicos mencionados anteriormente.<sup>13</sup> El espectro de RMN <sup>1</sup>H de 11 se muestra en la figura 15 y en la tabla 1 se indican los desplazamientos químicos de los átomos de carbono más interesantes de los productos 10 y 11.

**TABLA 1.** Desplazamientos químicos de RMN <sup>13</sup>C en ppm (75 MHz, CDCL<sub>3</sub>) de 10 y 11.

ATOMO	10	11
C-3	216.46	216.1
C-16	74.42	75.04
C-24	80.17	81.63
C-25	76.57	82.28
-C=OCH <sub>3</sub>	170.23	170.44
-C=OCH <sub>3</sub>	-	170.30

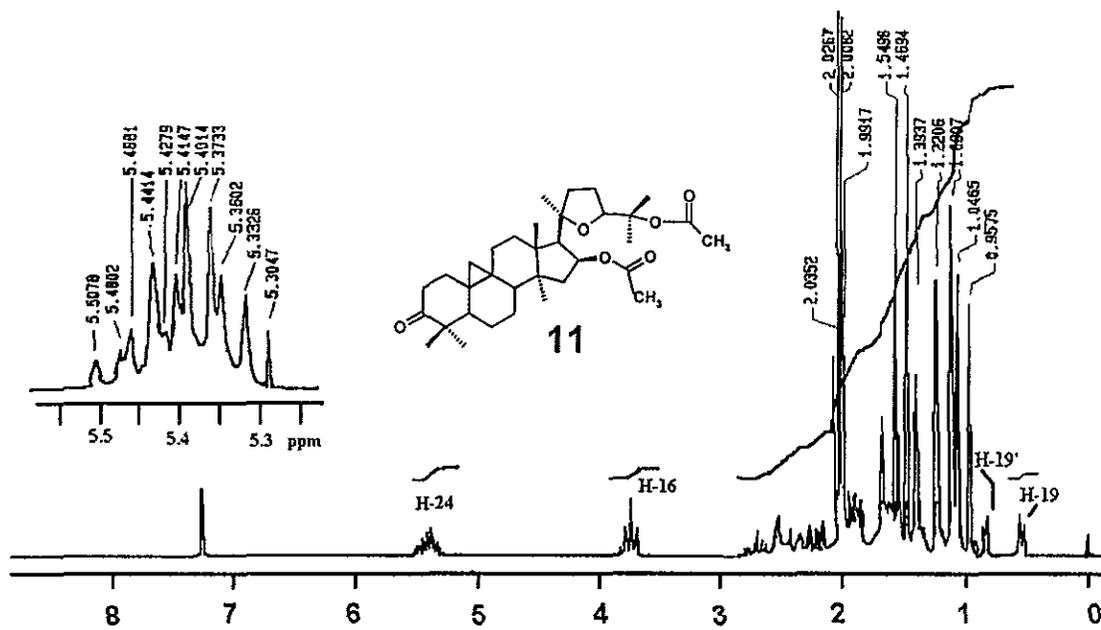
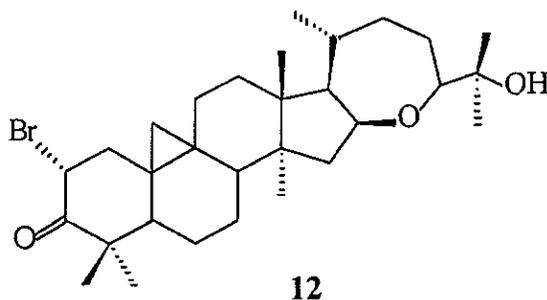


FIGURA 15. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del 16, 25-diacetato de argentatina A (11).

### 3.2.2. Obtención de 2( $\alpha$ )-bromo-argentatina B (12) y 2( $\alpha$ )-bromo-argentatina A (13).



La 2( $\alpha$ )-Br-argentatina B (12) fue obtenida cuando se adicionó lentamente una solución de  $\text{Br}_2$  en ácido acético a una solución de argentatina B (3), también disuelta en ácido acético. El producto obtenido es un sólido blanco cristalino con p.f. de 212-214°C.

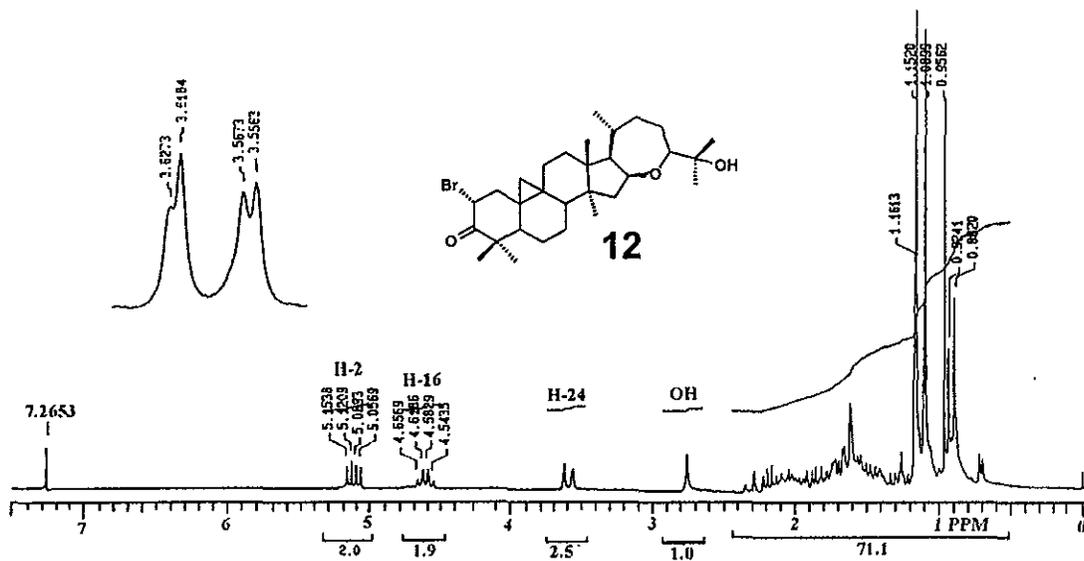
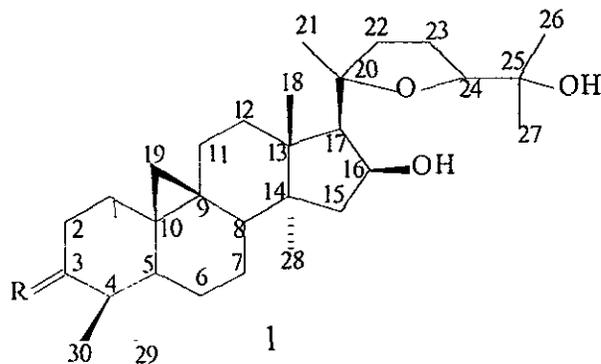


Figura 16. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de 2(α)-Br-argentatina B (12)

En el espectro de masas se observa un ión molecular ( $M^+$ ) de 534, así como el patrón de fragmentación característico para los triterpenos tetraciclicos (tabla 2)<sup>26</sup>. Los cambios más significativos en los datos experimentales debido a la presencia del Br en C-2 son los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) asignados a H-2 y C-2 en los espectros de RMN <sup>1</sup>H (figura 16) y RMN <sup>13</sup>C respectivamente (tabla 4). La constante de acoplamiento ( $J$ ) para el H-2 sugiere una orientación  $\alpha$  para el átomo de bromo.

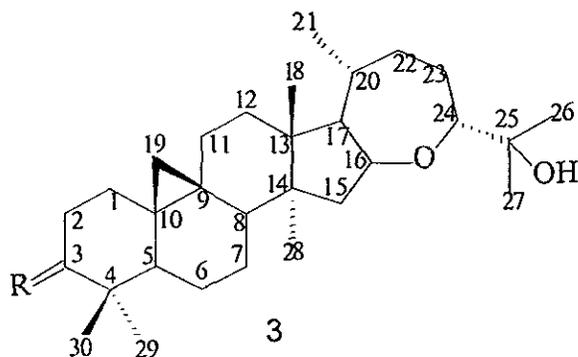
**Tabla 2.** Abundancias relativas de los iones obtenidos como producto de fragmentación primaria de los triterpenos pentacíclicos (Tipo 1).



	R
A	0
Aa	$\beta$ -OAc
Ab	$\alpha$ -OAc
B	=O, $\triangle^{8,9}$ C(10)-Me
C	=O, 2( $\alpha$ )Br

COMPUESTO	[M] <sup>+</sup>	[M-59] <sup>+</sup>	[M-58] <sup>-</sup>	143	125	85	58	59
A	0.5	7.5	5.0	100	27.8	37.2	2.0	37.3
Aa	2.8	7.5	12.0	100	23.2	15.0	2.0	63.4
Ab	-	7.0	22.5	100	24.4	13.7	1.0	52.8
B	0.5	60.5	7.5	100	34.6	25.0	1.0	58.8
C	0.77	3.1	3.8	100	17.8	12.4	0.7	7.7

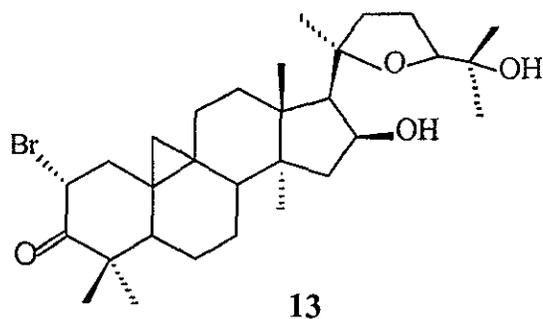
**Tabla 3.** Abundancias relativas de los iones obtenidos como producto de fragmentación primaria de los triterpenos pentacíclicos (Tipo 3).



	R
D	0
E	=O, $\triangle^{8,9}$
F	$\beta$ -OH
Fa	$\beta$ -OAc
G	=O, 2( $\alpha$ )Br

COMPUESTO	[M] <sup>+</sup>	[M-59] <sup>+</sup>	[M-58] <sup>-</sup>	143	175	125	85	59
D	3.9	25.0	7.5	7.5	-	30.0	30.0	100
E	8.7	42.5	12.5	12.5	-	64.2	64.2	100
F	-	17.5	32.5	6.25	-	36.9	36.9	100
Fa	1.8	18.75	18.75	5.0	-	25.0	25.0	100
G	4.08	47.9	26.02	15.6	100	-	95.2	76.0

Obtención de la 2( $\alpha$ )-Bromo-argentatina A.



Los datos espectroscópicos de 12 se discuten en la referencia 13. El espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 13 se muestra en la figura 17. En la tabla 4 se comparan los desplazamientos en RMN  $^{13}\text{C}$  para 12 y 13.

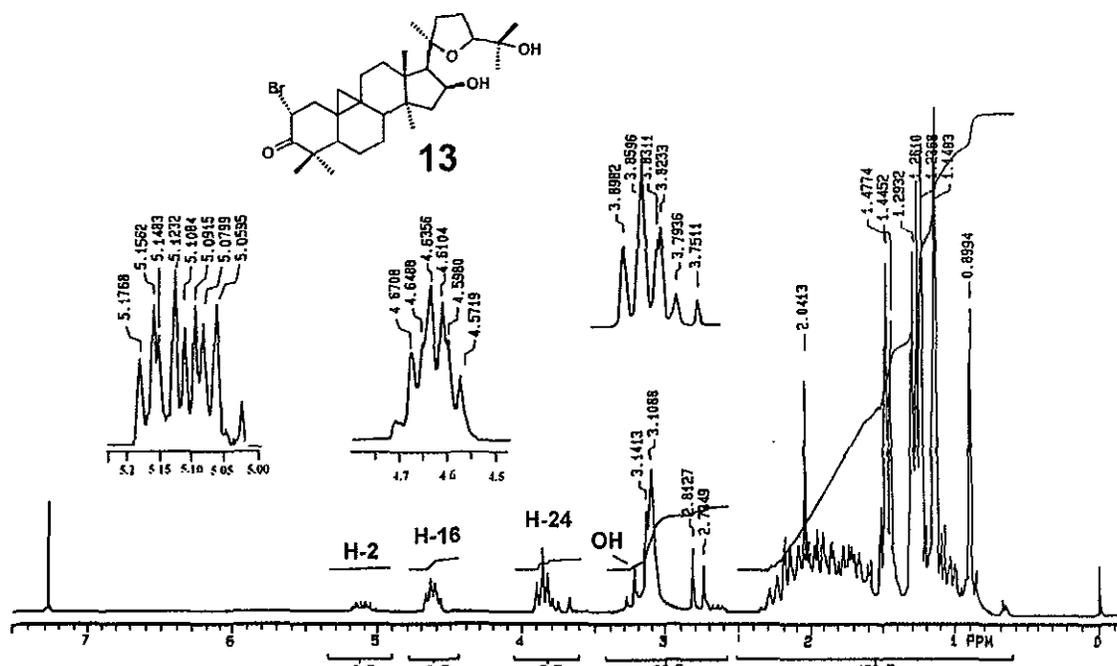
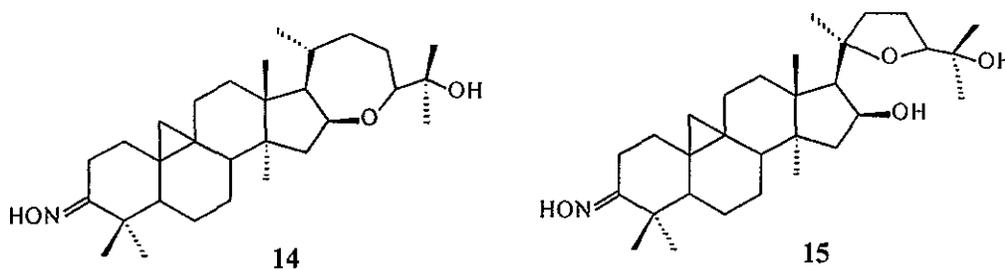


Figura 17. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 2( $\alpha$ )-Bromo-argentatina A (13).

TABLA 4. Desplazamientos químicos de RMN  $^{13}\text{C}$  en ppm (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 12 y 13.

ATOMO	12	13
C-2	46.0	37.58
C-3	205.6	201.4
C-16	74.9	73.2
C-24	82.5	84.4
C-25	73.2	70.8

### 3.2.3. Obtención de las Oximas de Argentatina B (14) y Argentatina A (15).



La oxima de *argentatina B*<sup>6</sup> (14) se obtuvo al hacer reaccionar la *argentatina B* (3) con clorhidrato de hidroxilamina en presencia de piridina, obteniéndose un sólido blanco cristalino con p.f. 224-226°C.

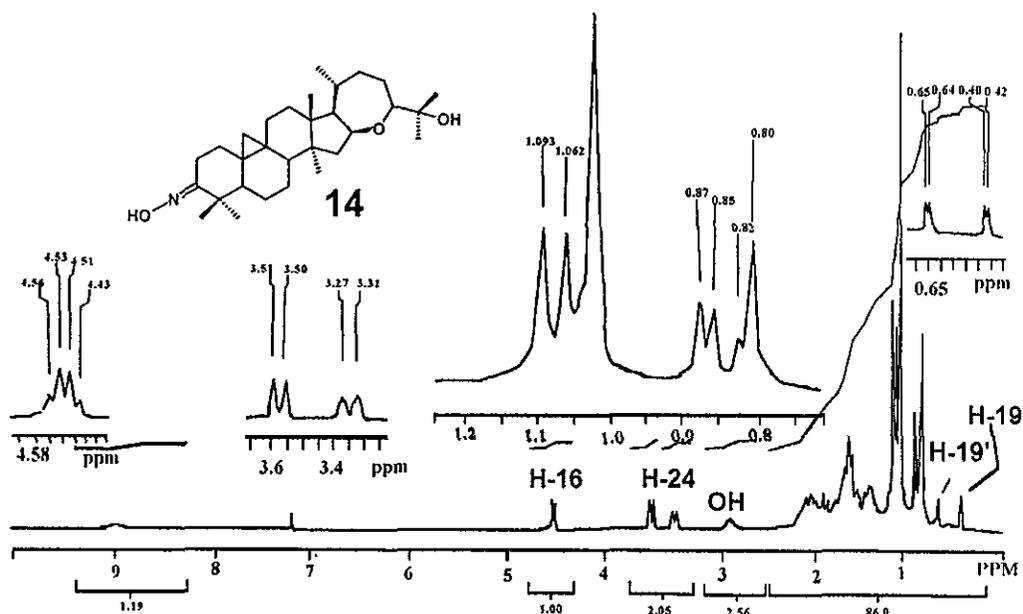


Figura 18. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la oxima de *argentatina B* (14).

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (figura 18) no se observa alguna diferencia significativa en las señales asignadas para H-16 y H-24, sin embargo en infrarrojo es clara la banda de absorción para C=N en 1699  $\text{cm}^{-1}$  así como a 962  $\text{cm}^{-1}$  para el enlace N-O y las bandas características para el hidroxilo (-OH) en 3588 y 3265  $\text{cm}^{-1}$ .(figura 19)

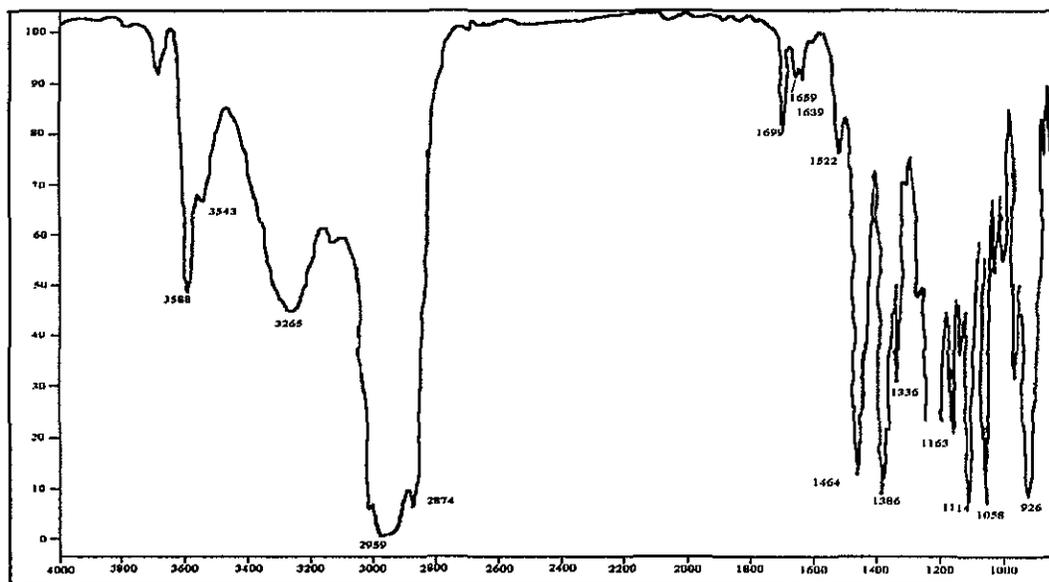


Figura 19. Espectro de IR de oxima de argentatina B (14).

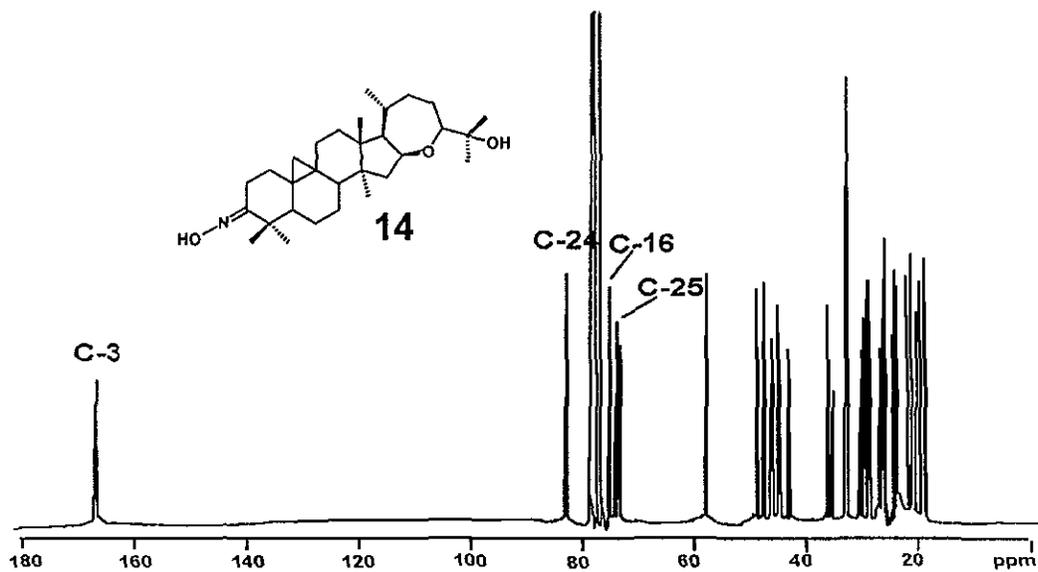
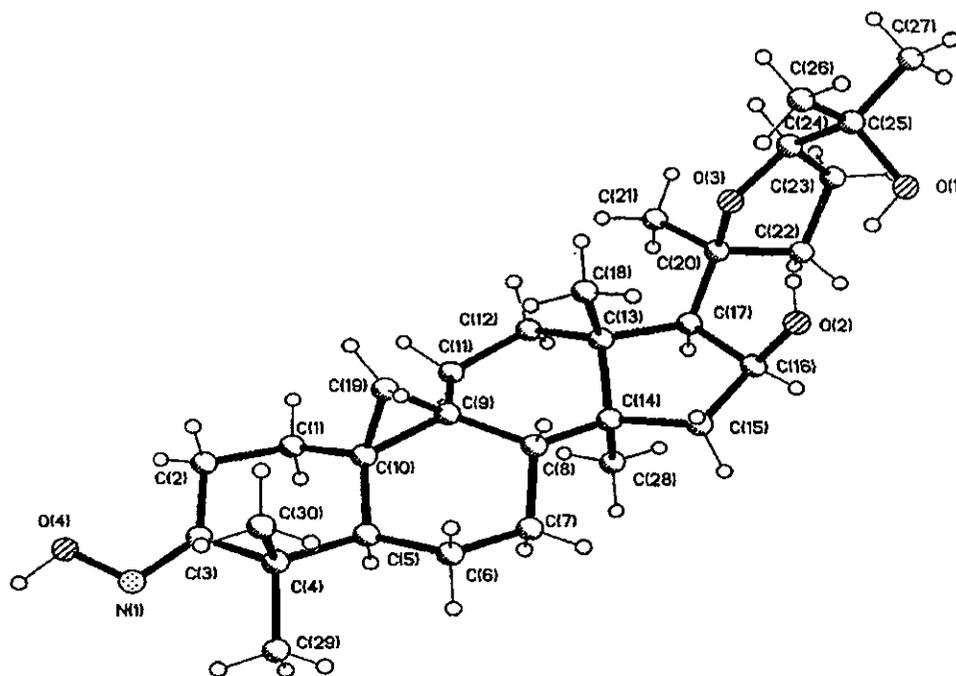


Figura 20. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de oxima de argentatina B (14).

Por otra parte, en RMN  $^{13}\text{C}$  de 13 se observa un cambio en el desplazamiento del carbono C-3, el cual, se encuentra a campos más altos por la presencia de la cetoxima. (figura 20)

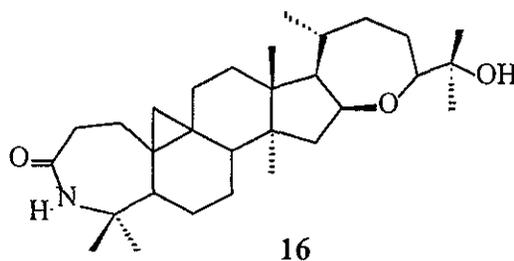
### **Obtención de la oxima de argentatina A.<sup>13</sup>**

La separación de la argentatina A e isoargentatina A es muy laboriosa, lenta y generalmente con resultados no muy satisfactorios. Por lo tanto se decidió hacer reaccionar la mezcla de argentatina A e isoargentatina A con el clorhidrato de hidroxilamina en presencia de piridina se obtuvo una mezcla de productos, de la cual se separó la oxima de argentatina A mediante cromatografía en columna y al igual que la oxima de la argentatina B no se observa diferencia significativa en los desplazamientos de H-16 y H-24 sin embargo para el carbono C-3 si se observa un ligero  $\delta$  a campos más altos cabe mencionar que su estructura fue corroborada por mediante el análisis cristalográfico de difracción de rayos X. (figura 21).



**Figura 21.** Estructura obtenida mediante difracción de rayos X de la oxima de argentatina A (15).

### 3.2.4. Obtención de la Lactama de Argentatina B (16) y Lactama de Argentatina A (17).



Las *lactamas de argentatina B* y *A* se obtuvieron mediante la transposición de Beckman. Esta transformación se logró a partir de la oxima respectiva, en presencia de anhídrido trifluoroacético a temperatura ambiente. De esta reacción se obtuvo para la argentatina B (3) un producto cristalino con p.f. 245-247°C identificado por sus datos espectroscópicos como *lactama de argentatina B* (17). Así el espectro de infrarrojo mostró bandas características para vibraciones N-H en  $3542\text{ cm}^{-1}$ , así mismo para el carbonilo correspondiente a la amida (R-CONH-R) en  $1638.7\text{ cm}^{-1}$ .(figura 22)

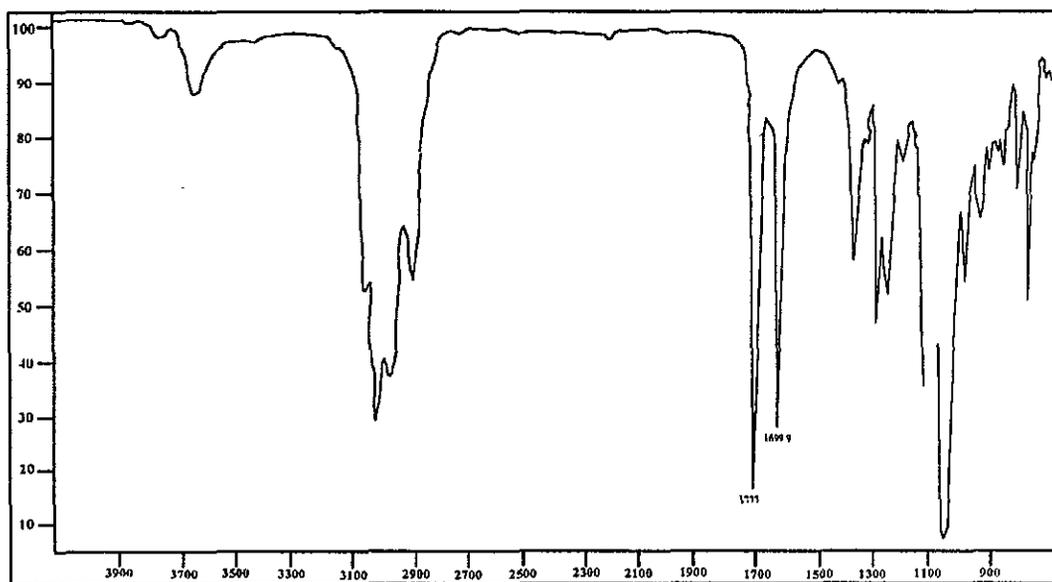


Figura 22. Espectro de infrarrojo de la *lactama de la argentatina B* (16).

Por otro lado en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (figura 23) se observa una señal simple a 5.2 ppm asignada al hidrógeno unido al nitrógeno de la lactama, así como las señales correspondientes a H-16 y H-24 a 4.6 y 3.59 ppm respectivamente, así mismo las señales características de los hidrógenos H-19 y H-19' del ciclopropano a 0.54 y 0.6 ppm.

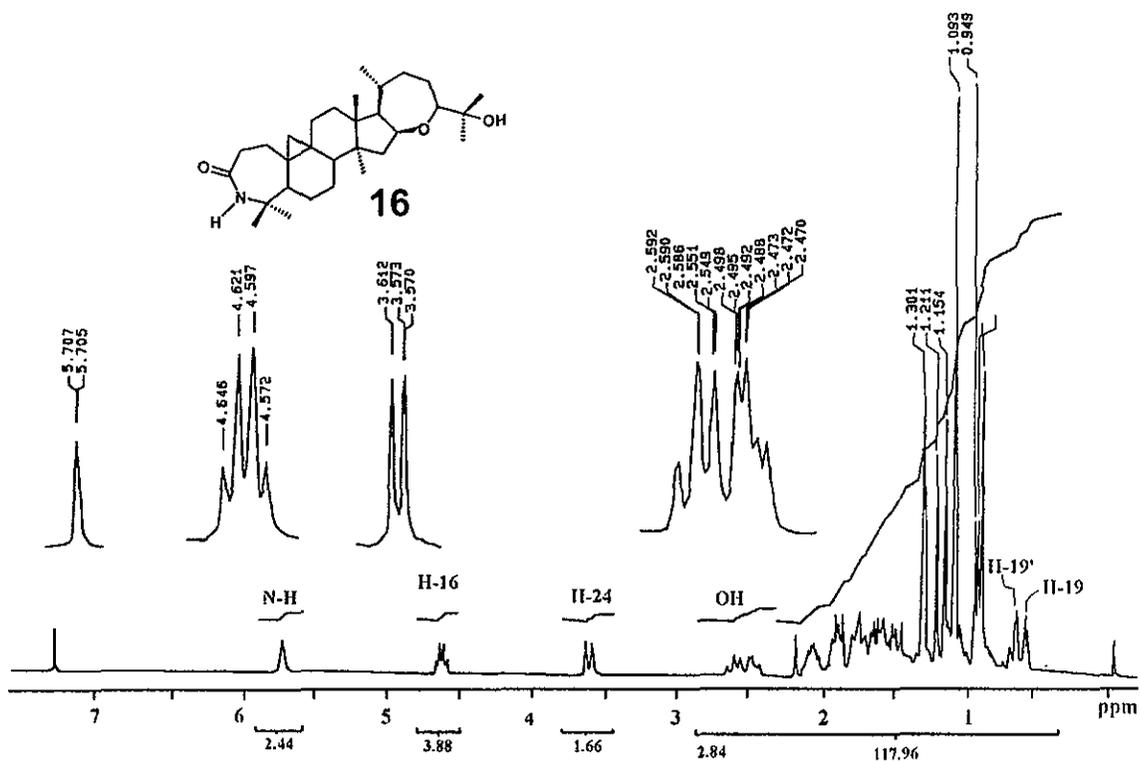


Figura 23. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la lactama de *argentatina B* (16).

En RMN  $^{13}\text{C}$  (figura 24) se observa el desplazamiento a campos más altos del carbono C-3 a 177.1 ppm asignado al carbonilo de la lactama.

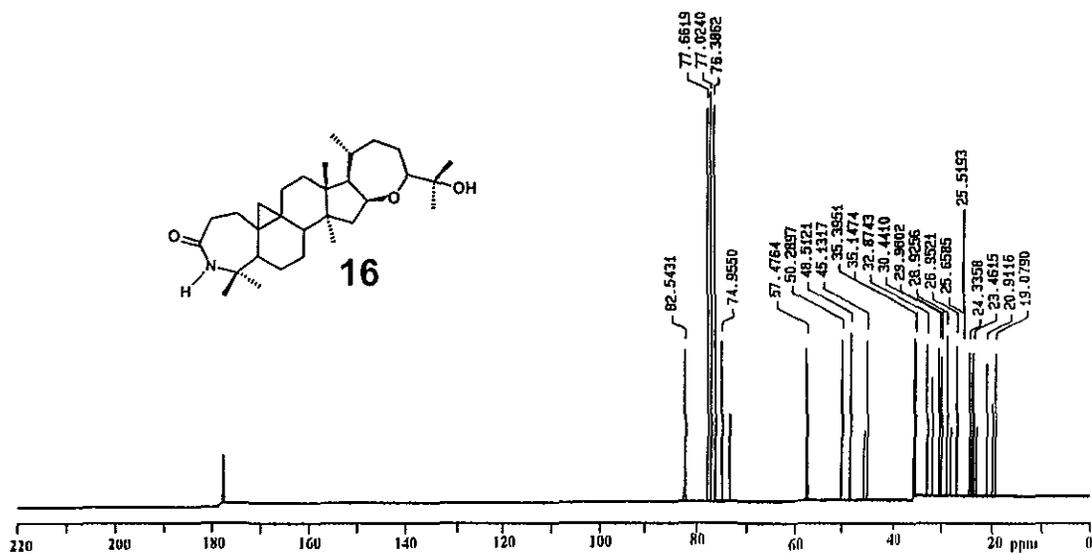
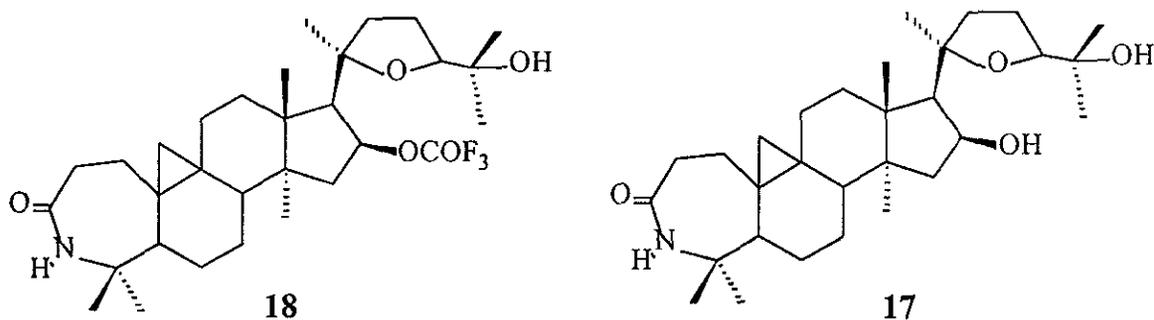


Figura 24. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de la lactama de argentatina B (16).

*Obtención de la lactama de argentatina A.*



Al tratar la oxima de la argentatina A con anhídrido trifluoro acético se obtuvo un compuesto identificado como 16-fluoro-acetoxi-lactama de argentatina A (**18**). Compuesto que mostró en el espectro de infrarrojo (figura 25) el carbonilo de la lactama en  $1699.9\text{ cm}^{-1}$  y el carbonilo correspondiente al acetato en posición 16 a  $1777\text{ cm}^{-1}$ , lo cual corroboró la formación de dicho intermediario aislado en trabajos anteriores.<sup>13</sup>

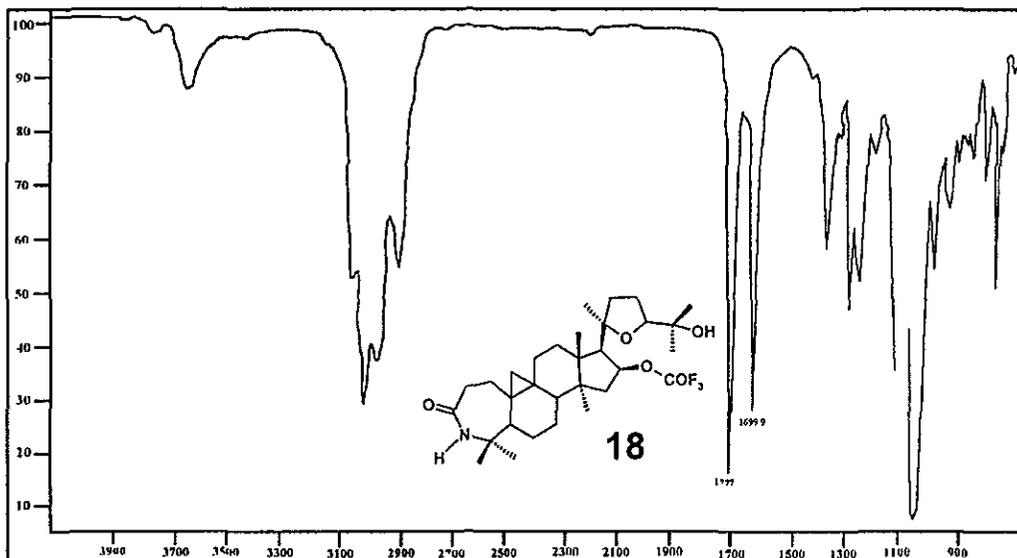
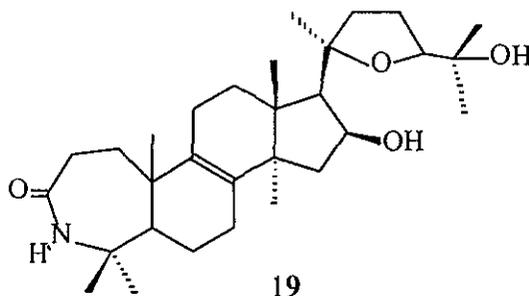


Figura 25. Espectro de infrarrojo de la 16-fluoro-acetoxi-lactama de argentatina A (18).

Este producto fue tratado con carbonato de potasio en metanol, el cual se hidrolizó para dar lugar a la lactama de argentatina A (17), producto que se purificó por cromatografía en placa fina de una mezcla de dos productos identificados como lactama de argentatina A (17) y lactama de isoargentatina A (19), este último como producto minoritario.



La lactama 17 fue aislada como un sólido blanco, poco soluble en  $\text{CHCl}_3$ , por lo cual los espectros de RMN  $^1\text{H}$  (figura 26) y RMN  $^{13}\text{C}$  (figura 27) fueron determinados en una mezcla de disolventes ( $\text{CHCl}_3/\text{DMSO}$ ).

En la tabla 5 se presentan los desplazamientos de RMN  $^{13}\text{C}$  en ppm de los compuestos 16 y 17.

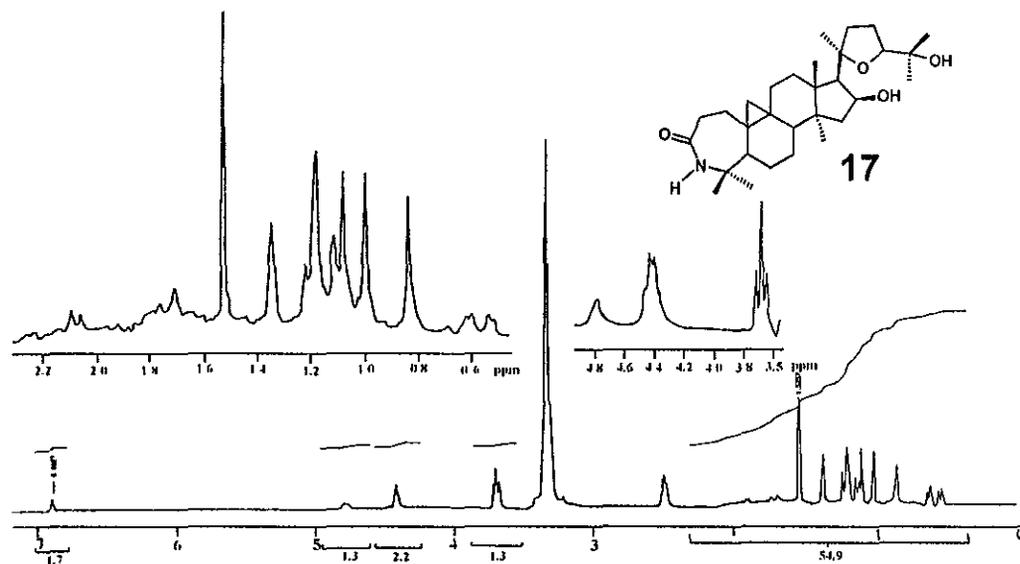


Figura 26. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la lactama de argentatina A (17).

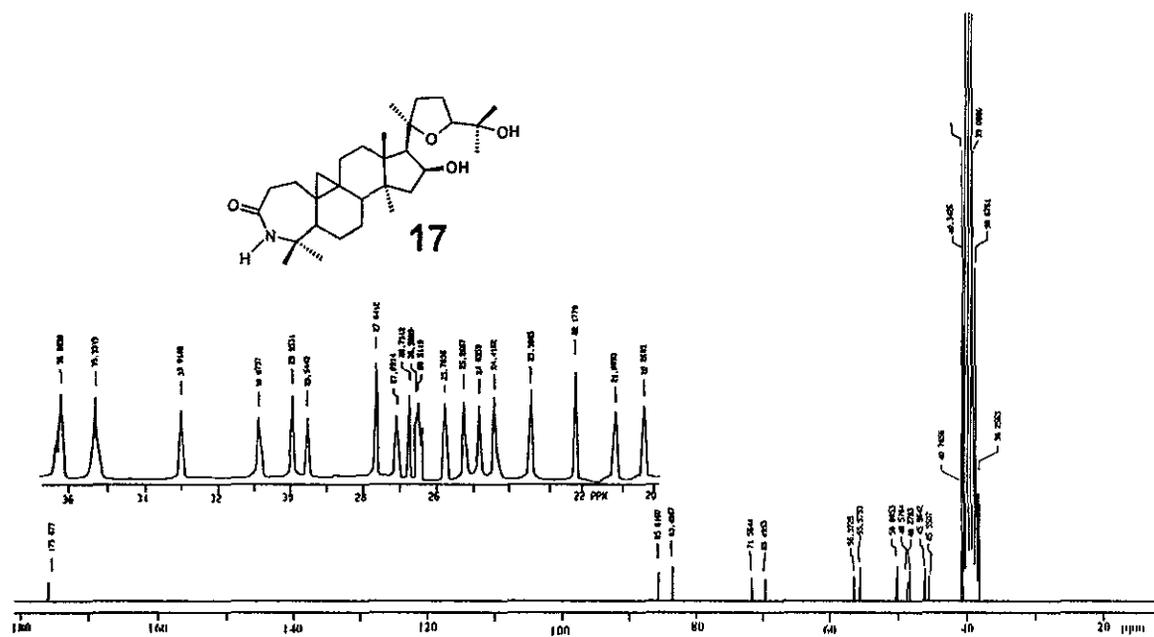


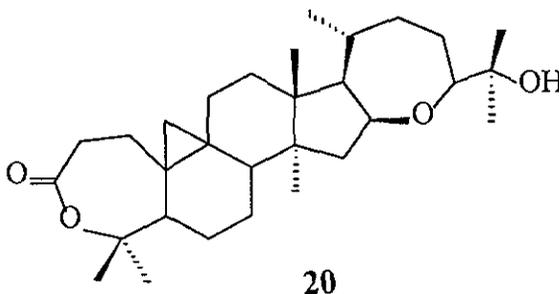
Figura 27. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de la lactama de argentatina A (17).

**Tabla 5.** Desplazamientos químicos de RMN  $^{13}\text{C}$  en ppm (75 MHz  $\text{CDCl}_3$ ) de 16 y 17.

ATOMO	16	17
C-3	177.1	175.6
C-16	71.5	74.9
C-24	83.4	82.4
C-25	69.4	73.1

### 3.2.5. Obtención de la Lactona de Argentatina B (20) y la 16-oxo-Argentatina A (21)

#### *Lactona de argentatina B.*



La *lactona de argentatina B* se obtuvo mediante la reacción de Baeyer-Villiger partir de la reacción de argentatina B (3) y ácido meta cloroperbenzoico (MCIPBA). De esta reacción se obtuvo un aceite amarillo que fue purificado por cromatografía en columna con una mezcla de 9:1 Hex:AcOEt, obteniendo un producto cristalino con p.f. 132-138°C.

Este producto presenta dos dobletes a 0.58 ppm y 0.65 ppm asignados a los hidrógenos H-19 y H-19' del ciclo propano, seis señales simples y una señal doble que integra para un metilos, teniendo un total de siete metilos correspondientes a los metilos presentes en la argentatina B (3) (figura 28). Así mismo se observa una señal doble en 3.55 ppm con  $J=11.4$  Hz asignada a H-24 y en 4.57 ppm una señal cuádruple correspondiente a H-16.

Mientras que el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (figura 29) se observan desplazamientos a 175.4 ppm en lugar de 216.3 ppm asignado a C-3 base de carbonilo de éster y un desplazamiento de C-4 a campo más bajo (87.1 ppm) por la presencia de oxígeno al que se encuentra unido con respecto a la argentatina B (3).

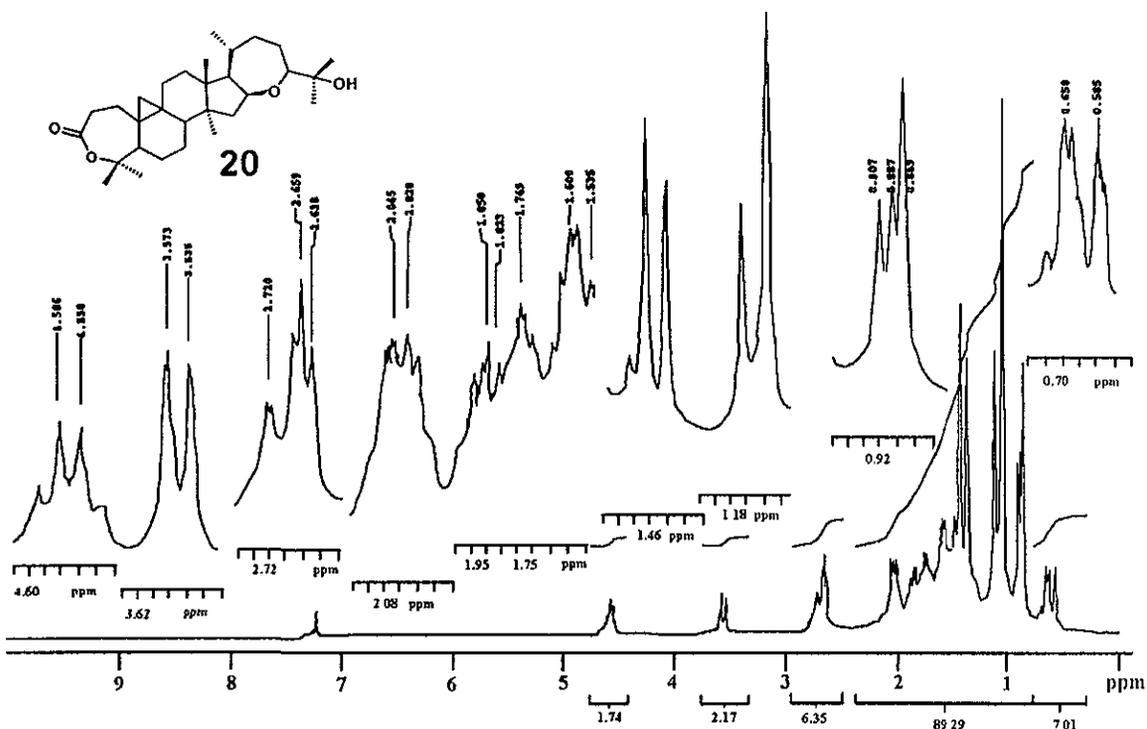


Figura 28. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la lactona de argentatina B (20).

La diferencia en desplazamiento se puede observar en la tabla 6, resultados que demuestran el cambio del donde se presenta un anillo de seis miembros existentes en la argentatina B por el de la lactona correspondiente, anillo de siete miembros.

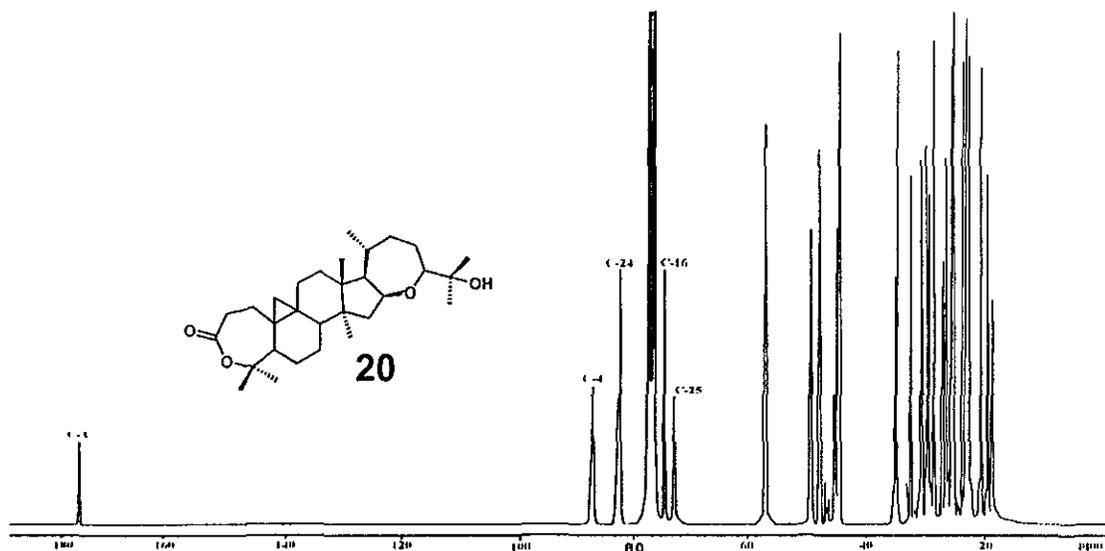
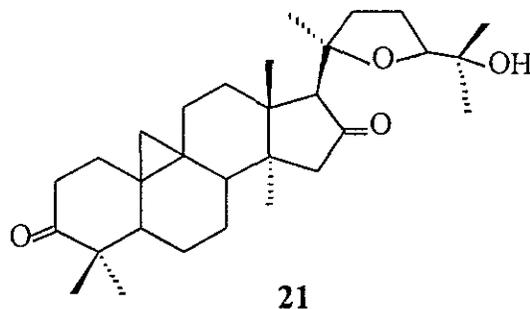


Figura 29. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de la lactona de argentina B (20).

Tabla 6. Desplazamientos químicos de RMN  $^{13}\text{C}$  en ppm (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 3 y 20.

ATOMO	3	20
C-3	216.53	175.4
C-4	50.17	87.1
C-16	74.82	74.9
C-24	82.5	82.4
C-25	73.5	73.1

Obtención de 16-oxo-argentatina A.



La argentatina A fue tratada bajo las mismas condiciones que la argentatina B con el fin de obtener la lactona correspondiente, sin embargo se obtuvo un sólido blanco identificado por comparación de sus datos espectroscópicos como 16-oxo-argentatina A (21).<sup>13</sup> (figuras 30,31 y 32).

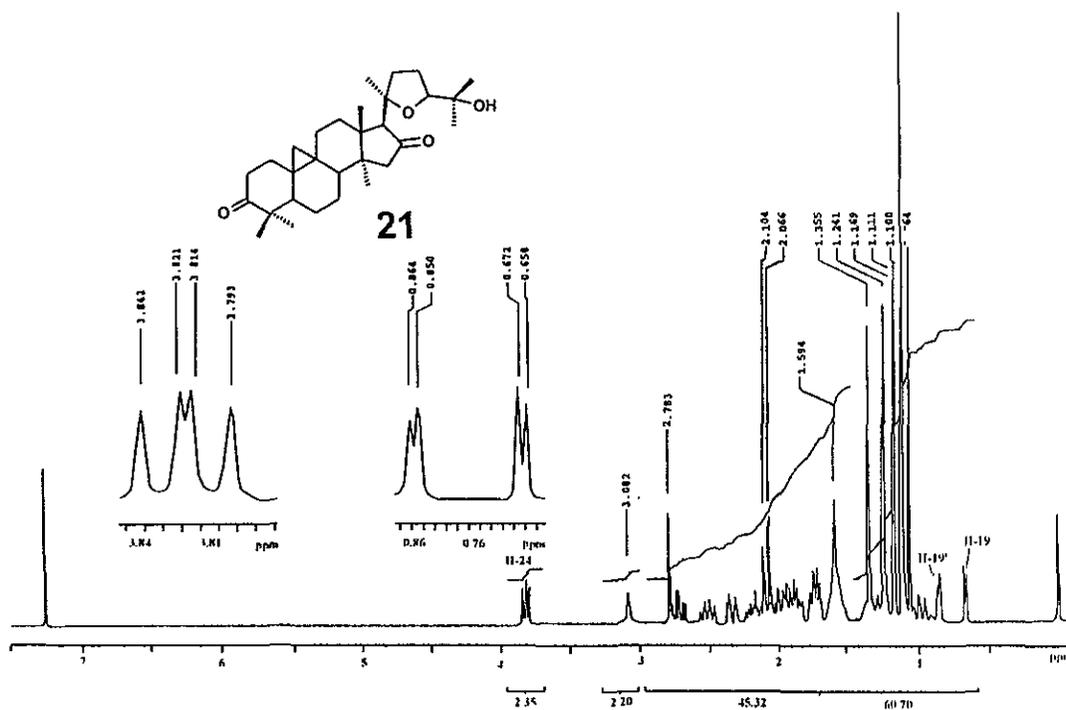


Figura 30. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de la 16-oxo-argentatina A (21).

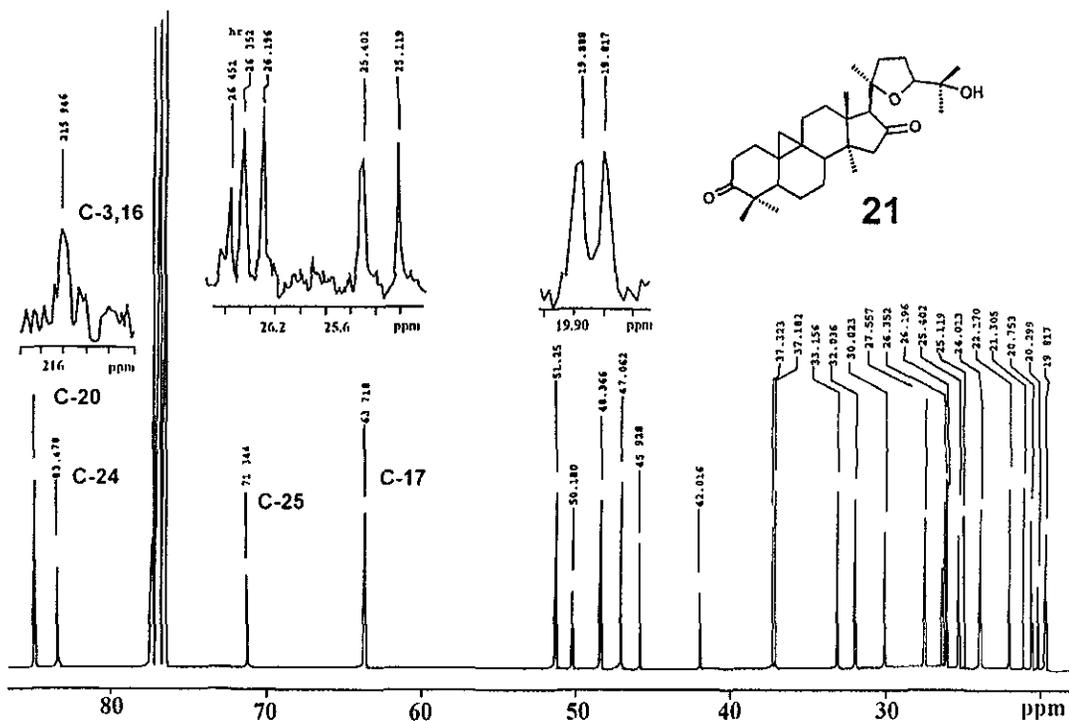


Figura 31. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de la 16-oxo-argentatina A (21).

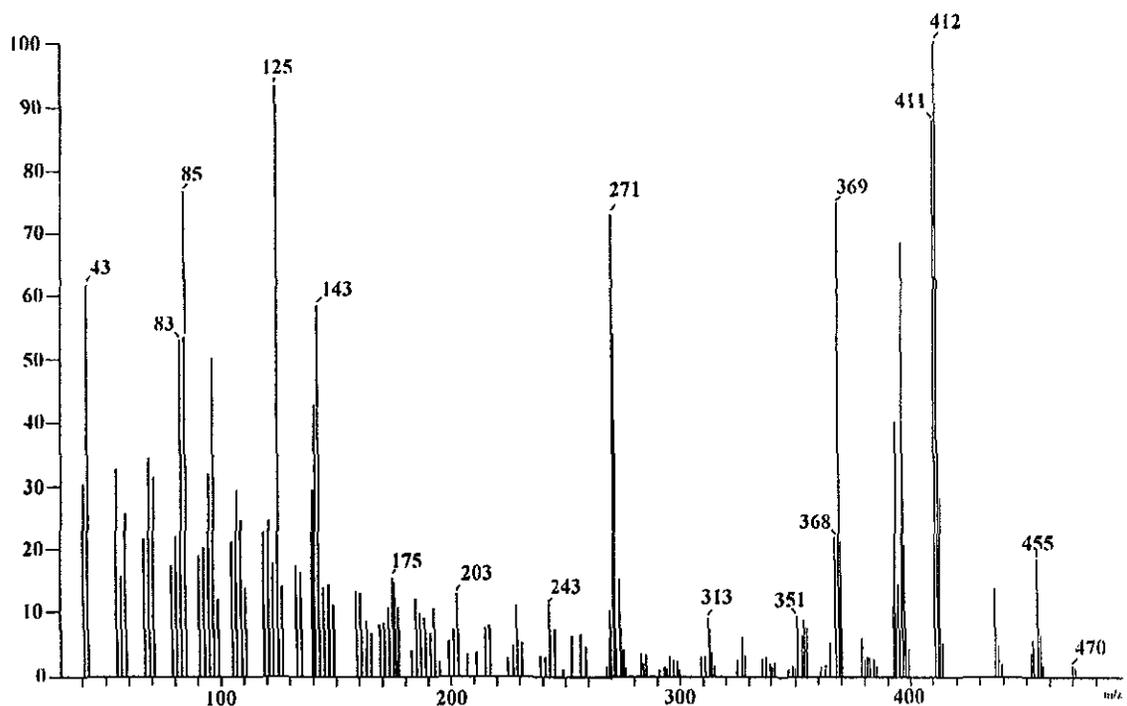
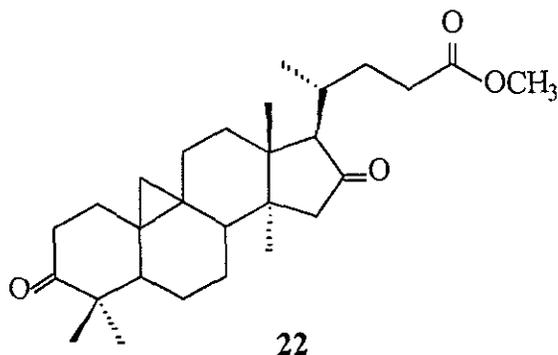


Figura 32. Espectro de masas de la 16-oxo-argentatina A (21).

### 3.2.6. Obtención del éster metílico del ácido 3,16-dioxo-25-nor-9 $\beta$ , 19-cicloartan-24-oico (22).



El tratamiento de la argentinina B (3) con CrO<sub>3</sub> produjo **22**, sólido cristalino blanco con p.f. 104-110°C con peso molecular de 442, en cuyo espectro de RMN <sup>1</sup>H se observan señales dobles a 0.85 y 0.64 ppm correspondientes a los hidrógenos H-19 y H-19' del ciclopropano y cuatro señales a 1.98, 1.06, 1.11 y 1.18 ppm asignadas a los metilos presentes, así como la ausencia de las señales para los hidrógenos H-16 y H-24 encontradas en la argentinina B. Por otro lado, se observa una señal simple adicional a 2.04 ppm asignada a un metilo base de acetato (figura 33). Así mismo en el espectro de RMN <sup>13</sup>C (figura 34) se observan señales a 216.2, 216.9 y 179.7 ppm correspondientes a los carbonilos de cetona en C-3 y C-16 así como del carbonilo de éster en C-24.

Se observa un desplazamiento a campo más bajo de los carbonos C-15, C-17 y C-23 a 30 ppm, 50.3 ppm y 61.5 ppm respectivamente, al compararlos con los de la argentinina B.

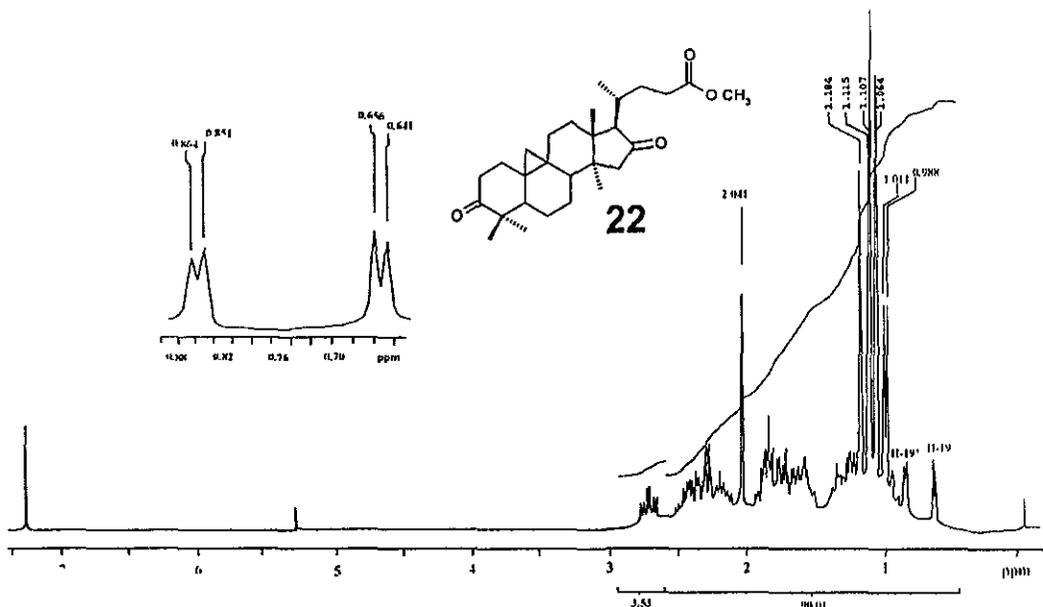


Figura 33. Espectro de RMN <sup>1</sup>H del éster metílico del ácido-3,6-dioxo-25-nor-9 $\beta$ , 19-cicloartan-24-oico (22).

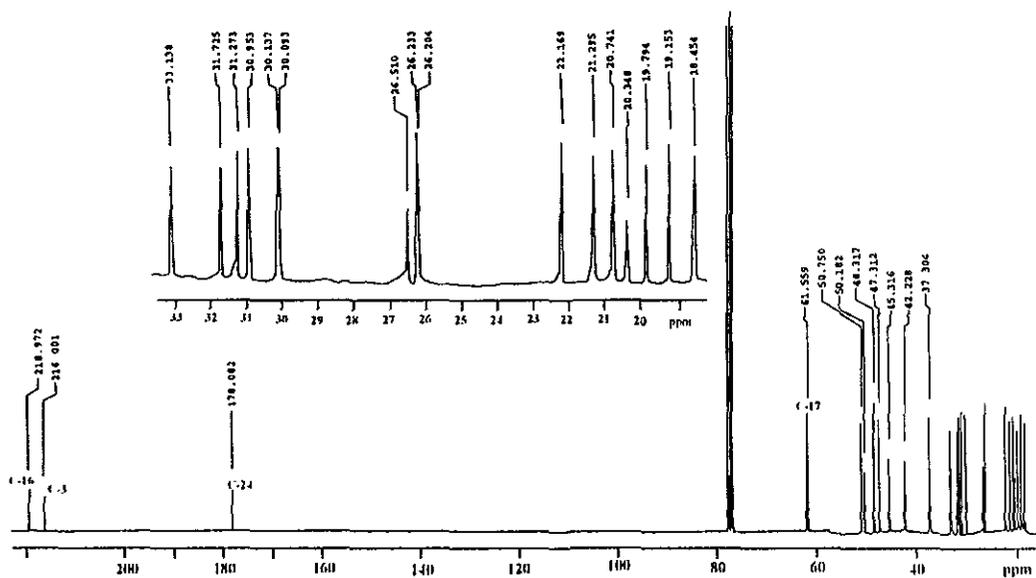
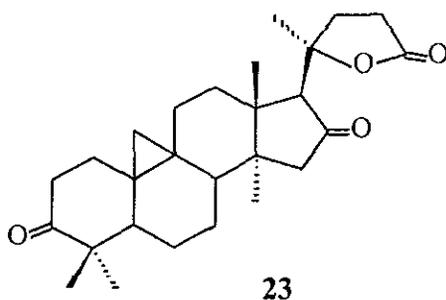


Figura 34. Espectro de RMN <sup>13</sup>C del éster metílico del ácido-3,6-dioxo-25-nor-9 $\beta$ , 19-cicloartan-24-oico (22).

### 3.2.7. Obtención de la lactona 3,16-dioxo-9 $\beta$ , 19-cicloartan-20, 24-olida (23).



La argentinina A fue tratada con  $\text{CrO}_3$ , a temperatura ambiente obteniendo un producto cristalino, identificado como *lactona-3, 16-dioxo-9 $\beta$ ,19-cicloartan-20,24-olida A (23)*.

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (figura 35) se observa claramente dos señales dobles a 0.67 y 0.88 ppm correspondientes a los hidrógenos H-19 y H-19', mientras que en el rango de 1.06-1.48 ppm se observan las señales simples correspondientes a los grupos metilo presentes en la molécula.

Así mismo no se observan las señales correspondientes a los hidrógenos H-16 y H-24, lo que corrobora la oxidación de los hidroxilos en C-16 y C-25.

Por otra parte en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (figura 36) se observan desplazamientos a 215.4, 215.88 y 177.24 ppm correspondientes a los carbonilos presentes en los carbonos C-3, C-16 y C-24 respectivamente, así mismo se observa un desplazamiento a campos más bajos para C-23 a 27.78 ppm comparando con 23.74 ppm de la argentinina A.

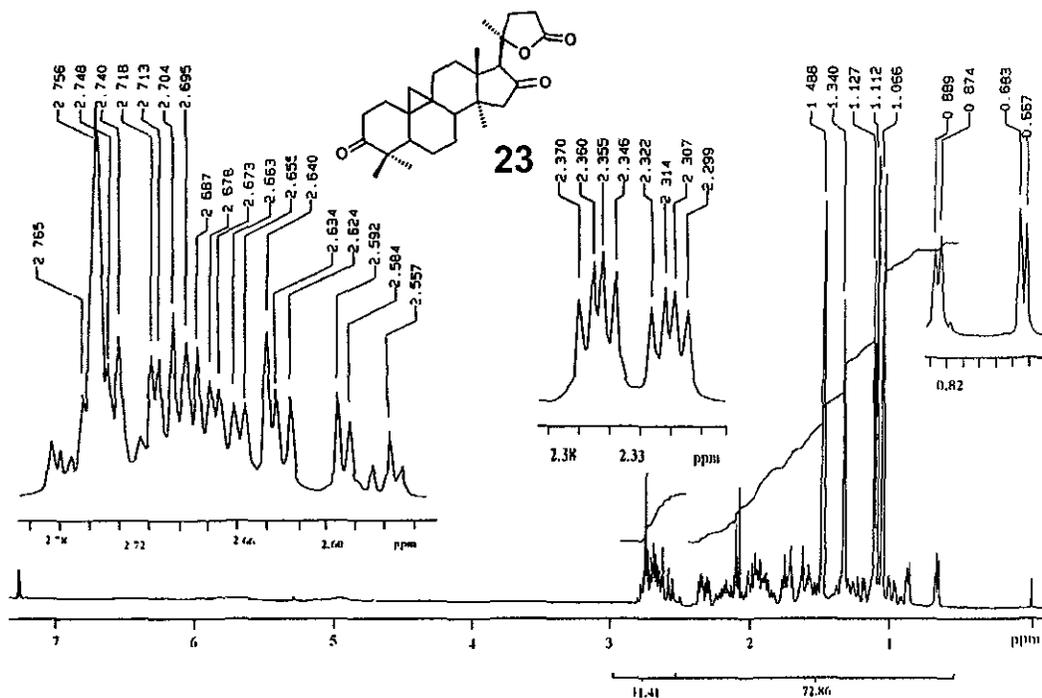


Figura 35. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la lactona-3,16-dioxo-9 $\beta$ , 19-cicloartan-20,24olida (23).

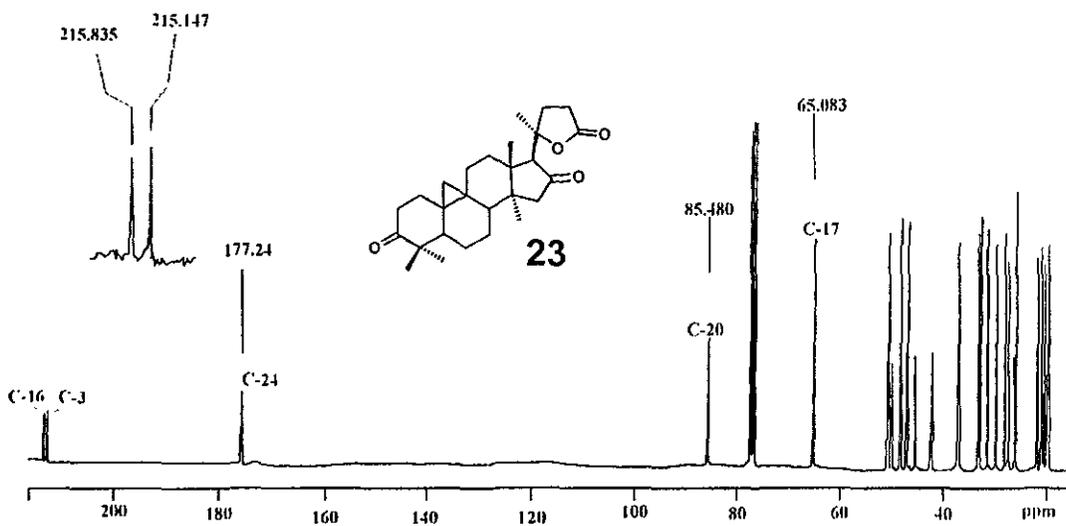
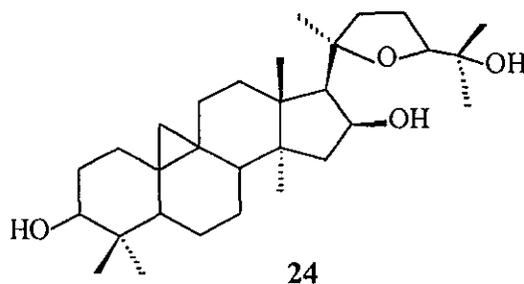


Figura 36. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de la lactona-3,16-dioxo-9 $\beta$ , 19-cicloartan-20,24olida (23).

### 3.2.8. Obtención de la 3 $\beta$ -hidroxi-argentatina A (24).



La reducción de argentatina A (1) se efectuó mediante la utilización de borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ) obteniéndose un sólido blanco con punto de fusión de 125-128°C con peso molecular de 474.

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (figura 37) se pueden observar dos señales a 2.83 y 4.59 ppm corresponden a los hidrógenos H-24 y H-16 respectivamente y el alcohol en C-3, así como las señales dobles a 0.85 ppm y 0.64 ppm correspondientes a los hidrógenos H-19, H-19' del ciclopropano y las señales simples asignadas a los metilos presentes en (24).

Por otro lado en RMN  $^{13}\text{C}$  se observa un desplazamiento químico de 78.8 ppm para el carbono C-3 base del hidroxilo y un desplazamiento de 40.6 ppm para el carbono C-4  $\alpha$  al carbono base de hidroxilo a diferencia del desplazamiento de 50.2 ppm observado en la argentatina A (figura 38). Estos resultados confirma la ausencia del carbonilo de cetona en C-3.

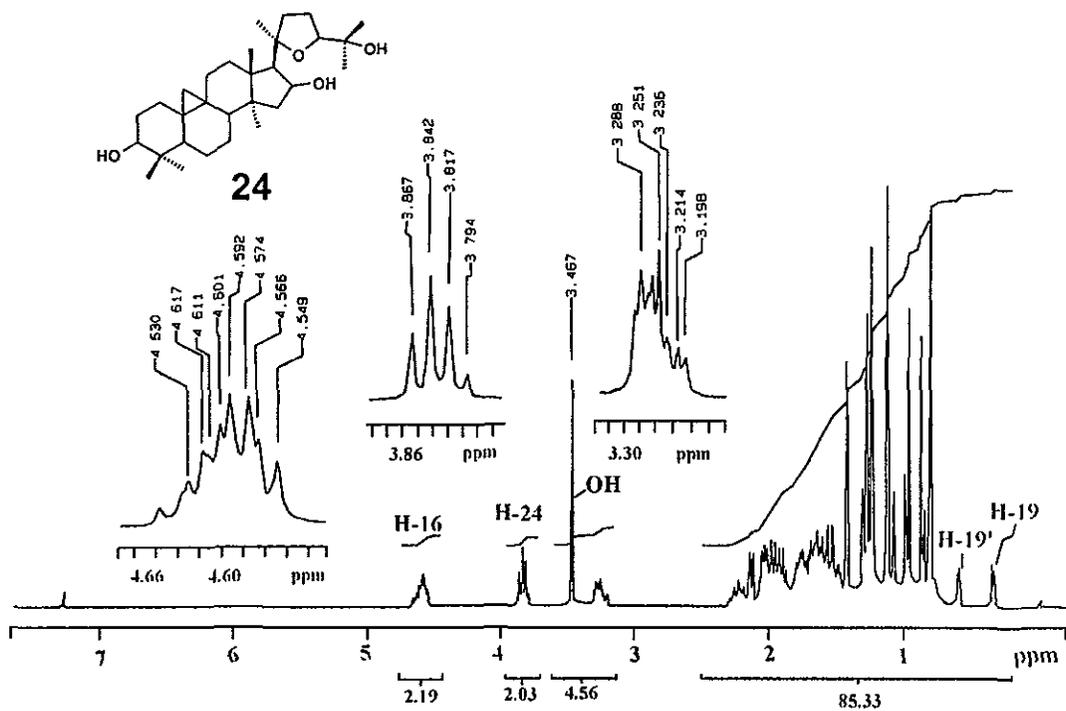


Figura 37. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la 3hidroxiargentatina A (24).

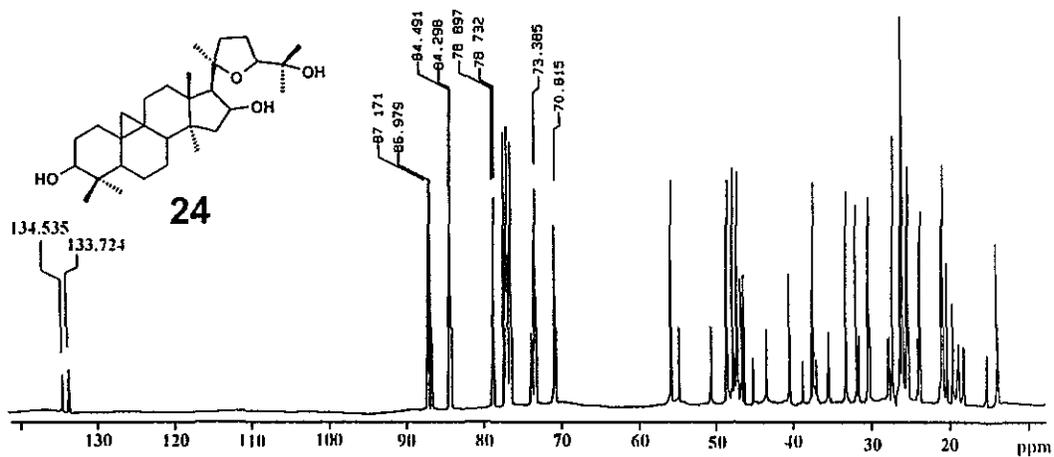
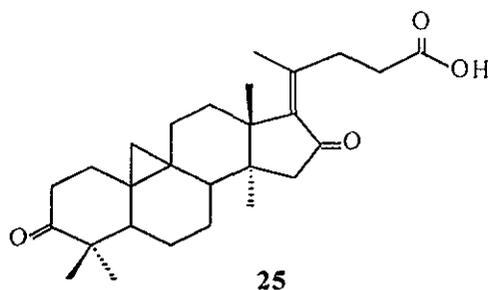


Figura 38. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de la 3-hidroxi-argentatina A (24).

### 3.2.9. Obtención del ácido-3, 16-dioxo-17, 20-en-9 $\beta$ , 19- cicloartan-24-oico (25).



La hidrólisis de la lactona-3, 16-dioxo-9 $\beta$ ,19-cicloartan-20, 24-olida A (23) condujo a la obtención de un producto cristalino con p.f. de 182°C y peso molecular de 426. En resonancia magnética nuclear de hidrógeno se observan señales típicas para el ciclopropano a 0.64 y 0.86 ppm, así como las señales simples asignadas a los grupos metilo presentes en el rango de 0.98 a 1.82 ppm. No se observan las señales para los hidrógenos en C-16 y C-24 (figura 39); por otro lado en RMN  $^{13}\text{C}$  se observan señales a 216.0 ppm y 207.3 ppm asignados a los cetónidos en C-3 y C-16, así como las señales a 141.7 y 149.5 ppm correspondientes a los carbonos  $\text{sp}^2$  C-17 y C-20 de la doble ligadura formada durante la apertura de la lactona. (figura 40). Por otro lado se observa la señal a 178.6 ppm correspondiente al carbonilo en C-24 del ácido formado.

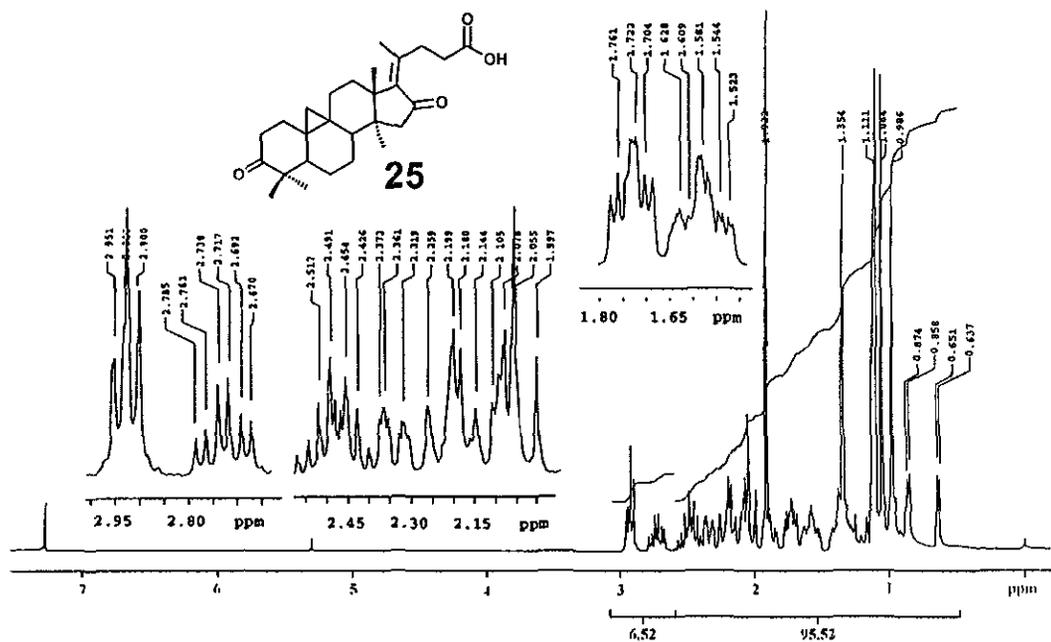


Figura 39. Espectro del ácido-3,16-dioso-17, 20-en-9 $\beta$ , 19-cicloartan-24-oico (25).

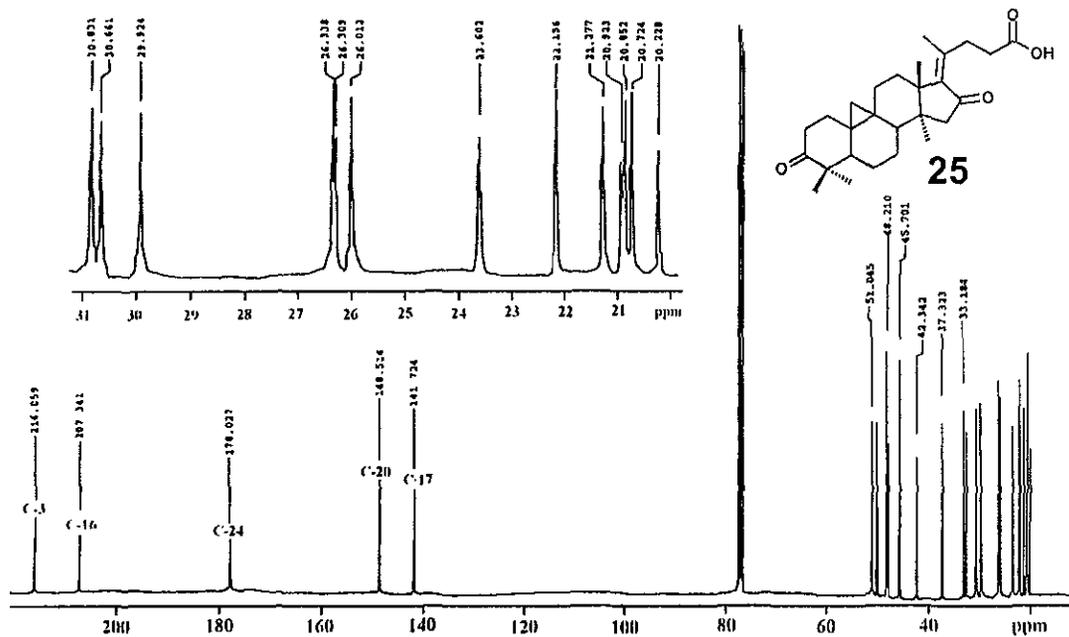


Figura 40. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del ácido-3, 16-dioxo-17, 20-en-9 $\beta$ , 19-cicloartan-24-oico (25).

## 4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

### 4.1. ANTECEDENTES.

La inflamación es una reacción local de organismo en respuesta a una agresión, cuya función puede ser defensiva, protectora o localizadora de los factores patógenos.

El proceso inflamatorio involucra una serie de eventos que pueden ser producidos por numerosos estímulos como agentes inflamatorios, isquemia, interacciones antígeno-anticuerpo y daños físicos, etc. La respuesta inflamatoria es acompañada por signos clínicos como rubor, calor, tumor, dolor y pérdida de la función; además de ocurrir en tres fases diferentes cada una mediada por diferentes mecanismos: 1) Fase aguda caracterizada por un incremento de la permeabilidad capilar; 2) fase tardía subaguda, caracterizada por filtración de leucocitos y fagocitos y 3) una fase proliferativa crónica en la cual hay degeneración y fibrosis.<sup>27</sup>

Si bien la inflamación es un proceso defensivo protector es necesario llevar un control del mismo debido a que puede transformarse en un proceso perjudicial, por lo cual existen mediadores químicos como las aminas vasoactivas (histamina y serotonina), polipeptidos del plasma (cininas sistema de coagulación y complemento), prostaglandinas y compuestos afines (prostaglandinas, leucotrienos, troboxanos), productos de los neutrófilos y linfocitos (proteasas: elasteasas y metaloproteasas y radicales libres: anión superóxido, peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso, etc.)<sup>28</sup>

Es bien conocido que dentro de la de las ruta prostaglandinas se encuentran algunos mediadores importantes en los procesos inflamatorios que involucran metabolitos del ácido araquidónico, ácido poliinsaturado metabolizado por tres vías enzimáticas: ciclooxigenasa, lipooxigenasa y citocromo P-450. La vía de la ciclooxigenasa da origen a las prostaglandinas y troboxano A<sub>2</sub> y prostacinas; la vía de la oxigenasa produce leucotrienos y ácido hidroperoxieicosatetraenoicos (HPETES), y la vía citocromo P-450 origina metabolitos oxigenados del ácido araquidónico. (figura 41) <sup>29</sup>

La evaluación de fármacos con actividad antiinflamatoria se lleva a cabo por diferentes métodos siendo la llamada prueba de la carragenina en las patas traseras de ratas y el edema inducido por el *13-Acetato-tetrahydroforbol* (TPA) las más usadas por ser confiables y reproducibles, además de que utilizan poco material.<sup>30</sup>

La prueba de la carragenina consiste en inyectar este agente inflamatorio en una de las patas traseras de la rata a la cual se va a tratar con el producto de prueba, el efecto antiinflamatorio se observará en el volumen de la pata tratada comparada con la pata no tratada.

Este modelo muestra dos fases:

- Fase inicial. Mediada por la histamina serotonina.
- Fase tardía. Mediada por metabolitos del ácido araquidónico.

También se conoce que existe activación de fosfolipasa A<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>).

Por otro lado se ha determinado que los inhibidores de araquidonato ciclooxigenasa (COX) son mucho más efectivos que los inhibidores de la araquidonato lipooxigenasa (LO) en inhibir la inflamación inducida por carragenina.<sup>30</sup>

El ensayo de TPA consiste en tratar una oreja con este agente flogístico y tratado con el producto a ensayar y la de actividad antiinflamatoria se determina comparando el peso de la oreja tratada con la no tratada.

Este ensayo involucra:

- Dependencia de la liberación de ácido araquidónico y metabolitos.
- Interacción con un sitio receptor en la proteína quinasa C (PKC).
- Un incremento en la enzima biosintética poliamina ODC (ornitina descarboxilasa).

Así mismo se ha determinado que inhibidores de PLA<sub>2</sub>, CO y LO así como corticoides, son efectivos en la supresión del edema después de la aplicación tópica de TPA.<sup>7</sup>

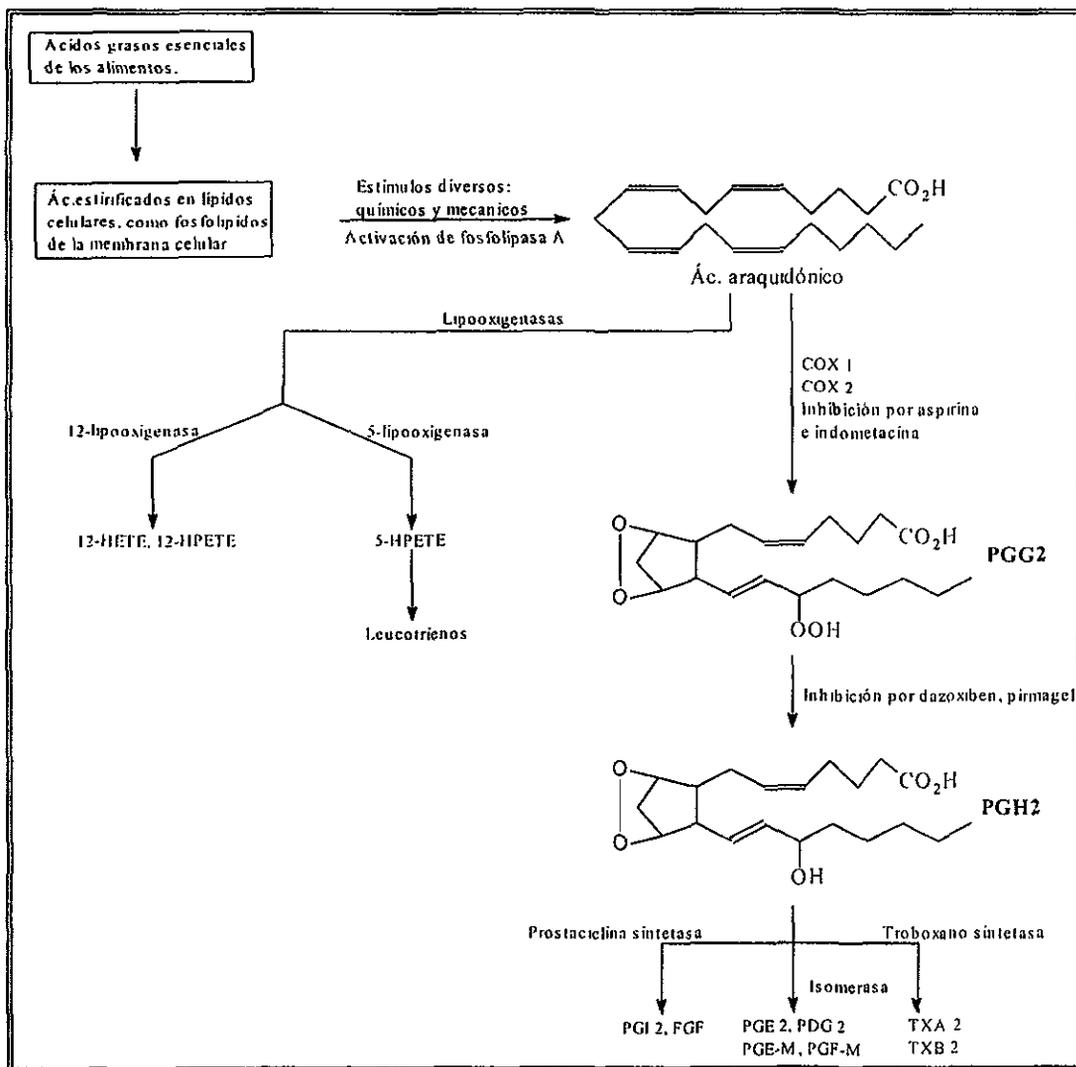
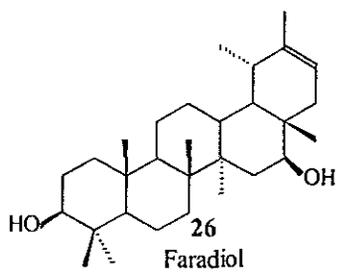
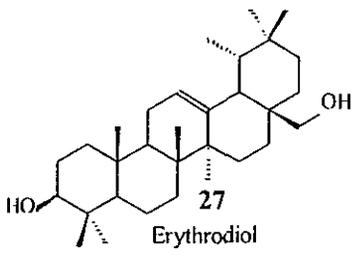
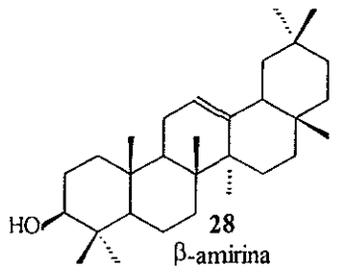


Figura 41. Biosíntesis de los productos del ácido araquidónico.<sup>29</sup>

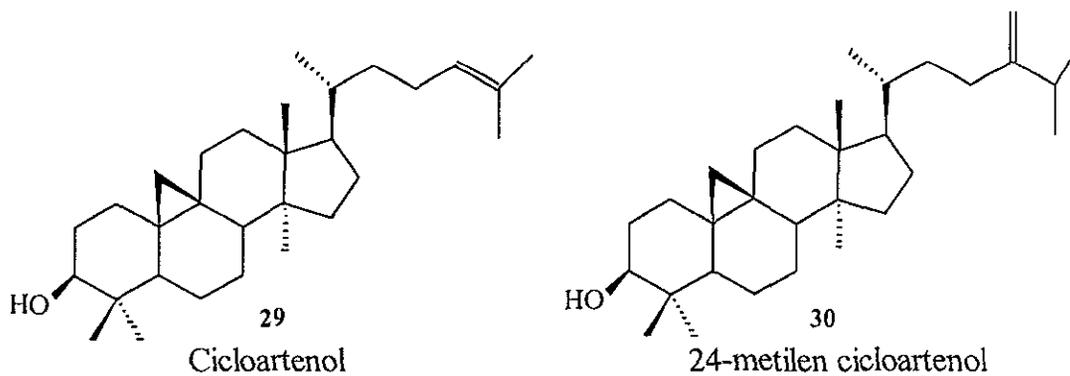
Por otro lado se conoce que los triterpenos son compuestos de amplia ocurrencia y diversidad estructural los cuales han llamado la atención por sus actividades farmacológicas, entre las que se han evaluado: Inhibición de la promoción de tumores, actividad antiinflamatoria e inhibición de peroxidación de lípidos.<sup>30</sup>

Entre los triterpenos que han sido evaluados por sus propiedades antiinflamatorias podemos mencionar al faradiol (26), erythrodiol (27) y  $\beta$ -amirina (28) (tabla 7).<sup>9</sup>

TABLA 7. Actividad antiinflamatoria de algunos triterpenos.

COMPUESTO	PRUEBA	DOSIS	% INHIBICIÓN
 <p>26 Faradiol</p>	TPA	120 $\mu$ g	73
 <p>27 Erythrodiol</p>	TPA	0.5 mg	93
 <p>28 <math>\beta</math>-amirina</p>	TPA	0.5 mg	64

Así mismo se han probado el *cicloartenol* (*cicloartan-21-en-3 $\beta$ -lo*) (29) y *24-metilen cicloartenol* (*24-metilen cicloartan-3 $\beta$ -lo*) (30) los cuales mostraron una dosis inhibitoria cincuenta (ID<sub>50</sub>) de 0.3 mg y 0.2 mg.<sup>31</sup>



Estas observaciones nos impulsaron a evaluar las argentatinas A (1), B (3), D (6), ya que son triterpenos estructuralmente relacionados al *cicloartenol* (29). También se evaluaron 6 derivados de la argentatina B y 8 derivados de la argentatina A, utilizando el ensayo de TPA como método de prueba.

## 4.2. METODO PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ANTIEDEMATORA EN EL EDEMA INDUCIDO CON TPA.

El ensayo del edema en la oreja de ratón inducido con TPA fue realizado tomando en cuenta el método de Tubaro y Gómez.<sup>32,33</sup>

Específicamente es este estudio se trabajaron con grupos de cinco ratones machos CD-1 (25-30 g) los cuales fueron anestesiados con Imalgen ®.

Posteriormente una solución de *13-acetato-12-o-tretadecanoil forbol* (TPA 2.5 µg) disueltos en etanol 10 µl fue tópicamente aplicada a la superficie interna y externa de la oreja derecha por medio de una microgeringa. La oreja izquierda recibió solamente 10 µl de etanol. Las soluciones de las argentatinas y sus derivados disueltos en acetato de etilo, a las concentraciones de 0.05, 0.1, 0.5 y 1.0 mg/oreja en un volumen de 20 µl fueron aplicados tópicamente 10 minutos después del tratamiento con TPA en la oreja derecha. Los grupos controles recibieron solamente acetato de etilo (20 µl) y el grupo testigo recibió indometacina disuelta en a la dosis especificadas anteriormente. Cuatro horas después los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y una porción central (9 mm de diámetro) de ambas orejas fue fueron tomadas con un saca bocado y posteriormente pesadas, la diferencia en peso de esta porción central tomado como una medida de la respuesta anti-edematosa. El % de inhibición se calculo por la ecuación 1.

$$\% \text{ Inhibición} = \left( \frac{\text{Edema A} - \text{Edema B}}{\text{Edema A}} \right) \times 100$$

### Ecuación 1.

Edema (mg) = Peso de la oreja tratada con TPA- Peso de la oreja sin TPA.

Edema A = Edema del grupo control.

Edema B = Edema del grupo tratado con los compuestos.

La respuesta del grupo control se comparo con el de cada compuesto a través de un análisis de varianza de una vía, seguida de una prueba t de Dunnett, siempre y cuando la "F" obtenida fuera mayor a la "F" de tablas, para comparar cada una de las concentraciones con su respectivo control.

Las dosis  $DI_{50}$  fueron estimadas mediante ecuaciones de regresión lineal del tipo  $\%I = a + b \log C$  ( $y = b + m X$ ), calculando los limites de confianza y la  $DI_{50}$ .<sup>11, 29</sup>

### 4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Los resultados obtenidos de los triterpenos argentatinas A (1), B (3) y D (6), así como de los derivados evaluados se presentan en las tablas 8-16.

El % de inhibición de cada uno de los ensayos realizados fue determinada por medio de la ecuación 2 y 3 mencionadas anteriormente. La columna 1: indica la unidad experimental, la columna 2 y 3 el edema (mg) de cada unidad experimental y la cuarta columna el porciento de inhibición.

**TABLA 8.** Efecto inhibitorio (%) de las argentatina A (1),B (3), D (6) e Indometacina (IND) a una concentración de 0.05 mg/oreja.

U.exp:	Control	IND	INDOMETACINA	U.exp:	Control	Comp.1	Comp.1
	(mg)	(mg)	% I		(mg)	(mg)	% I
1	18.8	15.3	18.62	1	10.10	3.80	62.38
2	17.1	12.2	28.65	2	6.80	5.40	20.59
3	16.8	14.4	14.29	3	10.90	6.00	44.95
4	15.1	10.4	31.13	4	10.00	3.70	63.00
5	15.3	9.5	37.91	5	7.30	7.90	8.22
Media	16.62	12.36	26.12	Media	9.02	5.36	39.83
Error std	0.67	1.11	4.28	Error std	0.82	0.77	11.05
U.exp:	Control	Comp.3	Comp.3	U.exp:	Control	Comp.6	Comp.6
	(mg)	(mg)	% I		(mg)	(mg)	% I
1	16.20	8.90	45.06	1	13.70	10.90	20.44
2	14.90	9.8	34.23	2	14.00	13.90	0.71
3	17.90	9.20	48.60	3	14.20	12.60	11.27
4	15.80	10.40	34.18	4	16.40	12.90	21.34
5	14.80	9.60	35.14	5	16.00	12.50	21.88
Media	15.92	9.58	39.44	Media	14.86	12.56	15.13
Error std	0.56	0.25	3.07	Error std	0.55	0.48	4.09

**TABLA 9.** Efecto inhibitorio (%) de los derivados de las argentatína A (1),B (3) a una concentración de 0.05 mg/oreja.

DERIVADOS ARGENTATINA B				DERIVADOS ARGENTATINA A			
U.exp.	Control (mg)	Comp.10 (mg)	Comp.10 %I	U.exp.	Control (mg)	Comp.11 (mg)	Comp.11 %I
1	11.1	9.6	13.51	1	10.10	10.40	2.97
2	6.8	6.0	11.76	2	6.80	9.60	41.18
3	11.9	9.0	24.37	3	10.90	10.30	5.50
4	10.0	9.1	9.00	4	10.00	7.10	29.00
5	8.3	10.3	24.10	5	7.30	6.80	6.85
Media	9.62	8.8	16.55	Media	9.02	8.84	17.10
Error std	0.92	0.73	3.22	Error std	0.82	0.78	7.62
U.exp.	Control (mg)	Comp.12 (mg)	Comp.12 %I	U.exp.	Control (mg)	Comp.13 (mg)	Comp.13 %I
1	18.70	7.10	62.03	1	13.50	8.30	38.52
2	16.10	9.40	41.61	2	14.30	11.40	20.28
3	13.80	8.80	36.23	3	14.00	9.30	33.57
4	12.70	8.10	36.22	4	13.40	9.0	32.84
5	12.70	11.60	8.66	5	12.90	8.60	33.33
Media	14.80	9.0	36.95	Media	13.62	9.32	31.71
Error std	1.15	0.75	8.52	Error std	0.24	0.54	3.04
U.exp.	Control (mg)	Comp.14 (mg)	Comp.14 %I	U.exp.	Control (mg)	Comp.15 (mg)	Comp.15 %I
1	16.30	6.70	58.90	1	10.1	8.9	11.88
2	14.90	8.80	40.94	2	6.8	7.7	13.24
3	17.90	10.60	40.78	3	10.9	8.2	24.77
4	15.80	11.30	28.48	4	10.0	5.5	45.00
5	14.80	11.80	20.27	5	7.3	7.8	6.85
Media	15.94	9.84	37.87	Media	9.02	7.62	20.35
Error std	0.56	0.93	6.55	Error std	0.82	0.57	6.83
U.exp.	Control (mg)	Comp.16 (mg)	Comp.16 %I	U.exp.	Control (mg)	Comp.17 (mg)	Comp.17 %I
1	13.7	10.70	21.90	1	9.80	9.00	8.16
2	14.0	11.50	17.86	2	10.70	9.50	11.21
3	14.2	9.80	30.99	3	10.30	10.60	2.91
4	16.4	11.70	28.66	4	13.00	9.80	24.62
5	16.0	9.50	40.63	5	12.50	10.0	20.00
Media	14.86	10.64	28.00	Media	11.26	9.78	13.38
Error std	0.55	0.44	3.93	Error std	0.62	0.26	3.95

TABLA 9. Continuación.

DERIVADOS ARGENTATINA B				DERIVADOS ARGENTATINA A			
U.exp.	Control	Comp.20	Comp.20	U.exp.	Control	Comp.21	Comp.21
	(mg)	(mg)	%I		(mg)	(mg)	%I
1	13.70	11.10	18.98	1	13.7	13.1	4.38
2	14.00	11.70	16.43	2	14	11.2	20.00
3	14.20	12.00	15.49	3	14.2	13.9	2.11
4	16.40	9.70	40.85	4	16.2	10.4	35.80
5	16.00	14.40	10.00	5	16.0	15.1	5.63
Media	14.86	11.78	20.35	Media	14.82	12.74	13.58
Error std	0.55	0.76	5.33	Error std	0.52	0.86	6.38
U.exp.	Control	Comp.22	Comp.22	U.exp.	Control	Comp.23	Comp.23
	(mg)	(mg)	%I		(mg)	(mg)	%I
1	13.70	8.01	41.53	1	13.30	14.10	6.02
2	14.00	10.10	27.86	2	12.90	10.20	20.93
3	14.20	8.60	39.44	3	12.90	10.90	15.50
4	16.40	11.40	30.49	4	15.80	10.00	36.71
5	16.00	8.80	45.00	5	15.30	10.20	33.33
Media	14.86	9.38	36.86	Media	14.04	11.08	22.50
Error std	0.55	0.60	3.29	Error std	0.6258	0.77	5.67
U.exp.	Control	Comp.24	Comp.24	U.exp.	Control	Comp.24	Comp.24
	(mg)	(mg)	%I		(mg)	(mg)	%I
1	13.70	10.80	21.17	1	13.70	10.80	21.17
2	14.00	9.70	30.71	2	14.00	9.70	30.71
3	14.20	11.40	19.72	3	14.20	11.40	19.72
4	16.40	12.20	25.61	4	16.40	12.20	25.61
5	16.00	10.30	35.63	5	16.00	10.30	35.63
Media	14.86	10.88	26.57	Media	14.86	10.88	26.57
Error std	0.55	0.43	2.97	Error std	0.55	0.43	2.97
U.exp.	Control	Comp.25	Comp.25	U.exp.	Control	Comp.25	Comp.25
	(mg)	(mg)	%I		(mg)	(mg)	%I
1	15.20	6.30	58.55	1	15.20	6.30	58.55
2	10.60	6.90	34.91	2	10.60	6.90	34.91
3	10.30	6.10	40.78	3	10.30	6.10	40.78
4	15.80	6.10	61.39	4	15.80	6.10	61.39
5	10.50	6.60	37.14	5	10.50	6.60	37.14
Media	12.48	6.40	46.55	Media	12.48	6.40	46.55
Error std	2.76	0.15	5.58	Error std	2.76	0.15	5.58

**TABLA 10.** Efecto inhibitorio (%) de las argentatina A (1),B (3), D (6) e Indometacina (IND) a una concentración de 0.1 mg/oreja.

U.exp.	Control (mg)	IND (mg)	INDOMETACINA (%I)	U.exp.	Control (mg)	Comp.1 (mg)	Comp.1 (%I)
1	18.8	9.30	50.53	1	18.70	6.70	64.17
2	17.1	11.60	32.16	2	16.10	9.50	40.99
3	16.8	1.10	93.45	3	13.80	7.40	46.38
4	15.1	11.40	24.50	4	12.70	6.10	51.97
5	15.3	10.80	29.41	5	12.70	8.10	36.22
Media	16.62	10.84	46.01	Media	14.80	7.56	47.95
Error std	0.67	0.40	12.65	Error std	1.15	0.58	4.84

U.exp.	Control (mg)	Comp.3 (mg)	Comp.3 (%I)	U.exp.	Control (mg)	Comp.6 (mg)	Comp.6 (%I)
1	13.9	5.60	59.71	1	16.10	12.10	24.84
2	18.7	3.40	81.82	2	13.40	8.70	35.07
3	13.4	5.70	57.46	3	14.80	10.0	32.43
4	14.8	5.40	63.51	4	16.10	8.20	49.07
5	12.7	7.40	41.73	5	12.20	8.40	31.15
Media	14.7	5.50	60.85	Media	14.52	9.48	34.51
Error std	1.06	0.63	6.42	Error std	0.76	0.72	4.01

**TABLA 11.** Efecto inhibitorio (%) de los derivados de las argentatina A (1),B (3) a una concentración de 0.1 mg/oreja.

DERIVADOS ARGENTATINA B				DERIVADOS ARGENTATINA A			
U.exp.	Control (mg)	Comp.10 (mg)	Comp.10 (%I)	U.exp.	Control (mg)	Comp.11 (mg)	Comp.11 (%I)
1	14.60	10.60	27.40	1	13.9	10.6	23.74
2	18.70	14.30	23.53	2	13.30	13.2	0.75
3	13.30	14.20	6.77	3	14.60	6.60	54.79
4	16.10	13.0	19.25	4	14.20	13.30	6.34
5	13.90	15.30	10.07	5	12.70	12.50	1.57
Media	15.32	13.48	17.40	Media	13.74	11.24	17.44
Error std	0.96	0.80	3.92	Error std	0.33	1.15	10.22

TABLA 11. Continuación.

DERIVADOS ARGENTATINA B				DERIVADOS ARGENTATINA A			
U.exp.	Control	Comp.12	Comp.12	U.exp.	Control	Comp.13	Comp.13
	(mg)	(mg)	%I		(mg)	(mg)	%I
1	15.2	5.50	63.82	1	13.9	9.10	34.53
2	10.6	2.50	76.42	2	11.90	9.30	21.85
3	11.3	3.90	65.49	3	14.80	5.80	60.81
4	14.8	3.70	75.00	4	14.20	9.80	30.99
5	10.5	8.10	22.86	5	18.70	8.70	53.48
Media	12.48	4.74	60.71	Media	14.70	8.54	40.33
Error std	1.03	0.96	9.79	Error std	1.1	0.7	7.26
U.exp.	Control	Comp.14	Comp.14	U.exp.	Control	Comp.15	Comp.15
	(mg)	(mg)	%I		(mg)	(mg)	%I
1	17.20	7.60	55.81	1	11.5	10.6	7.83
2	14.60	11.80	19.18	2	13.4	7.20	46.27
3	16.10	6.30	60.87	3	12.1	10.5	13.22
4	12.70	5.10	59.84	4	10.2	8.5	16.67
5	14.0	12.40	11.43	5			
Media	14.92	8.64	41.43	Media	11.80	9.20	21.00
Error std	0.78	1.46	10.77	Error std	0.66	0.62	8.62
U.exp.	Control	Comp.16	Comp.16	U.exp.	Control	Comp.17	Comp.17
	(mg)	(mg)	%I		(mg)	(mg)	%I
1	14.60	3.90	73.29	1	13.70	9.60	29.93
2	18.70	3.80	79.68	2	14.0	10.90	22.14
3	16.10	7.90	50.93	3	13.90	11.50	17.27
4	14.60	6.90	52.74	4	13.30	8.70	34.59
5	13.0	9.30	28.46	5	12.50	10.60	15.20
Media	15.40	6.36	57.02	Media	13.48	10.26	23.82
Error std	0.96	1.09	9.08	Error std	0.27	0.49	3.70
U.exp.	Control	Comp.20	Comp.20	U.exp.	Control	Comp.21	Comp.21
	(mg)	(mg)	%I		(mg)	(mg)	%I
1	7.00	1.6	77.14	1	14.2	11.1	21.83
2	8.20	6.9	15.85	2	14.70	11.5	21.77
3	6.50	1.6	75.38	3	14.70	10.4	29.25
4	4.70	3.6	23.40	4	14.20	15.6	9.86
5	13.00	5.1	60.77	5	13.0	7.5	42.31
6	12.00	3.9	67.50				
7	9.70	10.4	7.22				
8	12.70	10.1	20.47				
Media	9.23	5.4	43.47	Media	14.16	11.22	25.00
Error std	1.10	1.2	10.38	Error std	0.31	1.29	5.33

TABLA 11.Continuación.

DERIVADOS ARGENTATINA B				DERIVADOS ARGENTATINA A			
U.exp.	Control	Comp.22	Comp.22	U.exp.	Control	Comp.23	Comp.23
	(mg)	(mg)	%I		(mg)	(mg)	%I
1	13.30	7.60	42.86	1	7.0	4.0	42.86
2	11.90	8.0	32.77	2	8.2	5.4	34.15
3	11.0	6.30	42.73	3	6.50	3.9	40.00
4	12.0	4.20	65.00	4	4.70	4.4	6.38
5	12.20	4.70	61.48	5	12.70	5.5	56.69
				6	12.0	5.7	52.50
				7	9.7	3.8	60.82
Media	12.08	6.16	48.97	Media	8.68	4.83	40.68
Error std	0.31	0.75	6.13	Error std	1.1	0.31	6.13
				U.exp.	Control	Comp.24	Comp.24
					(mg)	(mg)	%I
				1	14.76	8.5	42.41
				2	18.7	5.3	71.66
				3	16.1	5.2	67.70
				4	14.6	6.4	56.16
				5	13.	8.8	32.31
				Media	15.4	6.8	54.05
				Error std	0.96	0.76	7.45
				U.exp.	Control	Comp.25	Comp.25
					(mg)	(mg)	%I
				1	17.7	4.3	75.71
				2	16.1	8.1	49.69
				3	14.6	6.8	53.42
				4	16.7	5.0	70.06
				5	2.9	9.3	27.91
				Media	15.60	6.7	55.36
				Error std	0.84	0.93	8.43

**TABLA 12.** Efecto inhibitorio (%) de las argentatina A (1),B (3), D (6) e Indometacina (IND) a una concentración de 0.5 mg/oreja.

U.exp.	Control (mg)	IND (mg)	INDOMETACINA %I	U.exp.	Control (mg)	Comp.1 (mg)	Comp.1 %I
1	18.8	6.20	67.02	1	18.70	5.20	72.19
2	17.1	7.20	57.89	2	16.10	5.60	65.22
3	16.8	7.80	53.57	3	13.80	7.0	49.28
4	15.1	6.50	56.95	4	12.70	3.10	75.59
5	15.3	5.10	66.67	5	12.70	6.40	49.61
Media	16.62	6.56	60.42	Media	14.80	5.46	62.38
Error std	0.67	0.45	2.72	Error std	1.15	0.66	5.54
U.exp.	Control (mg)	Comp.3 (mg)	Comp.3 %I	U.exp.	Control (mg)	Comp.6 (mg)	Comp.6 %I
1	13.90	1.20	91.37	1	16.10	6.00	62.73
2	18.70	3.20	82.89	2	13.40	8.50	36.57
3	13.40	3.0	77.61	3	14.80	5.70	61.49
4	14.80	1.80	87.84	4	16.10	8.40	47.83
5	12.70	2.80	77.95	5	12.20	6.10	50.00
Media	14.7	2.40	83.53	Media	14.52	6.94	51.72
Error std	1.06	0.38	2.71	Error std	0.76	0.62	4.82

**TABLA 13.** Efecto inhibitorio (%) de los derivados de las argentatina A (1),B (3) a una concentración de 0.5 mg/oreja.

DERIVADOS ARGENTATINA B				DERIVADOS ARGENTATINA A			
U.exp.	Control	Comp.10	Comp.10	U.exp.	Control	Comp.11	Comp.11
	(mg)	(mg)	%I		(mg)	(mg)	%I
1	14.60	10.7	26.71	1	13.9	4.60	66.91
2	18.70	11.70	37.43	2	13.3	7.60	42.86
3	13.30	11.50	13.53	3	14.60	6.50	55.48
4	16.10	8.0	50.31	4	14.20	4.70	66.90
5	13.90	10.0	28.06	5	12.70	8.70	31.50
Media	15.32	10.34	31.21	Media	13.74	6.42	52.73
Error std	0.96	0.66	6.11	Error std	0.33	0.8	6.92
U.exp.	Control	Comp.12	Comp.12	U.exp.	Control	Comp.13	Comp.13
	(mg)	(mg)	%I		(mg)	(mg)	%I
1	18.70	6.40	65.78	1	13.9	3.0	78.42
2	16.10	4.40	72.67	2	11.90	7.40	37.82
3	13.80	6.70	51.45	3	14.80	3.20	78.38
4	12.70	2.10	83.46	4	14.20	4.90	65.49
5	12.70	2.20	82.68	5	18.70	5.5	70.59
Media	14.80	4.36	71.21	Media	14.70	4.8	66.14
Error std	1.15	0.98	5.93	Error std	1.1	0.8	7.49
U.exp.	Control	Comp.14	Comp.14	U.exp.	Control	Comp.15	Comp.15
	(mg)	(mg)	%I		(mg)	(mg)	%I
1	17.20	6.60	61.63	1	11.5	5.70	50.43
2	14.60	6.20	57.53	2	13.4	4.50	66.42
3	16.10	8.30	48.45	3	12.1	3.60	70.25
4	12.70	5.90	53.54	4	10.2	8.20	19.61
5	14.0	9.70	30.71	5			
Media	14.92	7.34	50.37	Media	11.80	5.50	51.68
Error std	0.78	0.72	5.38	Error std	0.66	1.0	11.52
U.exp.	Control	Comp.16	Comp.16	U.exp.	Control	Comp.17	Comp.17
	(mg)	(mg)	%I		(mg)	(mg)	%I
1	14.60	5.10	65.07	1	9.8	9.6	2.04
2	18.70	3.20	82.89	2	10.7	8.3	22.43
3	16.10	5.50	65.84	3	10.3	8.5	17.48
4	14.60	5.1	65.07	4	13.0	4.3	66.92
5	13.0	3.0	76.92	5	12.5	5.4	56.80
Media	15.4	4.38	71.16	Media	11.26	7.22	33.13
Error std	0.96	0.53	3.70	Error std	0.62	1.0	12.31

TABLA 13.Continuación.

DERIVADOS ARGENTATINA B				DERIVADOS ARGENTATINA A			
Ensayo	Control	Comp.20	Comp.20	U.exp.	Control	Comp.21	Comp.21
	(mg)	(mg)	%I		(mg)	(mg)	%I
1	7.00	1.90	72.86	1	14.2	7.60	46.48
2	8.20	5.30	35.37	2	14.70	6.9	53.06
3	6.50	2.10	67.69	3	14.70	7.8	46.94
4	4.70	1.30	72.34	4	14.20	6.2	56.34
5	13.00	1.60	87.69	5	13.0	7.1	45.38
6	12.00	8.70	27.50				
7	9.70	3.00	69.07				
8	12.70	4.30	66.14				
Media	9.23	3.48	62.33	Media	14.16	7.12	49.64
Error std.	1.10	0.71	6.42	Error std.	0.31	0.28	2.14
U.exp.	Control	Comp.22	Comp.22	U.exp.	Control	Comp.23	Comp.23
	(mg)	(mg)	%I		(mg)	(mg)	%I
1	13.30	2.50	81.20	1	7.0	7.50	7.14
2	11.90	2.80	76.47	2	8.2	2.60	68.29
3	11.0	1.90	82.73	3	6.50	6.50	0.00
4	12.0	5.70	52.50	4	4.70	4.50	4.26
5	12.20	2.30	81.15	5	12.70	3.1	75.59
				6	12.0	2.10	82.50
				7	9.7	1.40	85.57
Media	12.08	3.0	74.81	Media	8.68	3.64	52.70
Error std.	0.31	0.69	5.68	Error std.	1.1	0.82	14.17
U.exp.	Control	Comp.24	Comp.24	U.exp.	Control	Comp.24	Comp.24
	(mg)	(mg)	%I		(mg)	(mg)	%I
1	147.6	2.4	83.74	1	147.6	2.4	83.74
2	18.7	1.5	91.98	2	18.7	1.5	91.98
3	16.1	1.2	92.55	3	16.1	1.2	92.55
4	14.6	2.8	80.82	4	14.6	2.8	80.82
5	13.	2.8	78.46	5	13.	2.8	78.46
Media	15.4	2.14	85.51	Media	15.4	2.14	85.51
Error std.	0.96	0.33	2.88	Error std.	0.96	0.33	2.88

TABLA 13.Continuación.

DERIVADOS ARGENTATINA B				DERIVADOS ARGENTATINA A			
U.exp.	Control	Comp.25	Comp.25	U.exp.	Control	Comp.25	Comp.25
	(mg)	(mg)	%I		(mg)	(mg)	%I
1	17.7	5.3	70.06	1	17.7	5.3	70.06
2	16.1	1.0	93.79	2	16.1	1.0	93.79
3	14.6	3.7	74.66	3	14.6	3.7	74.66
4	16.7	2.3	86.23	4	16.7	2.3	86.23
5	12.9	1.3	89.92	5	12.9	1.3	89.92
Media	15.60	2.72	82.93	Media	15.60	2.72	82.93
Error std	0.84	0.8	4.54	Error std	0.84	0.8	4.54

TABLA 14. Efecto inhibitorio (%) de las argentatina A (1),B (3), D (6) e Indometacina (IND) a una concentración de 1.0 mg/oreja.

U.exp.	Control	IND	INDOMETACINA	U.exp.	Control	Comp.1	Comp.1
	(mg)	(mg)	%I		(mg)	(mg)	%I
1	13.90	1.00	92.81	1	18.70	1.70	90.91
2	11.30	0.40	96.46	2	16.10	2.90	81.99
3	12.90	0.30	97.67	3	13.80	2.0	85.51
4	16.00	1.30	91.88	4	12.70	2.90	77.17
5	16.50	1.60	90.30	5	12.70	2.20	82.68
			3.12				5.05
Media	14.12	0.92	93.82	Media	14.80	2.34	83.65
Error std	0.96	0.25	1.40	Error std	1.15	0.24	2.26
U.exp.	Control	Comp.3	Comp.3	U.exp.	Control	Comp.6	Comp.6
	(mg)	(mg)	%I		(mg)	(mg)	%I
1	13.90	1.9	86.33	1	16.1	3.50	78.26
2	18.70	0.4	97.86	2	13.4	5.0	62.69
3	13.40	2.4	82.09	3	14.8	6.50	56.08
4	14.80	4.6	68.92	4	16.1	4.40	72.67
5	12.70	1.3	89.76	5	12.2	3.0	75.41
Media	14.70	2.12	84.99	Media	14.52	4.48	69.02
Error std	1.06	0.70	4.78	Error std	0.76	0.61	4.17

**TABLA 15.** Efecto inhibitorio (%) de los derivados de las argentatina A (1),B (3) a una concentración de 1.0 mg/oreja.

DERIVADOS ARGENTATINA B				DERIVADOS ARGENTATINA A			
U.exp.	Control	Comp.10	Comp.10	U.exp.	Control	Comp.11	Comp.11
	(mg)	(mg)	%I		(mg)	(mg)	%I
1	14.60	7.0	52.05	1	13.9	1.60	88.49
2	18.70	7.10	62.03	2	13.3	3.0	77.44
3	13.30	5.40	59.40	3	14.60	3.3	77.40
4	16.10	9.50	40.99	4	14.20	1.90	86.62
5	13.90	8.0	42.45	5	12.70	2.60	79.53
Media	15.32	7.40	51.39	Media	13.74	2.48	81.90
Error std	0.96	0.67	4.28	Error std	0.33	0.32	2.36
U.exp.	Control	Comp.12	Comp.12	U.exp.	Control	Comp.13	Comp.13
	(mg)	(mg)	%I		(mg)	(mg)	%I
1	18.70	1.90	89.84	1	13.9	5.1	63.31
2	16.10	4.20	73.91	2	11.90	1.9	84.03
3	13.80	3.30	76.09	3	14.80	2.0	86.49
4	12.70	2.90	77.17	4	14.20	3.0	78.87
5	12.70	2.10	83.46	5	18.70	5.0	73.26
Media	14.80	2.88	80.09	Media	14.70	3.4	77.19
Error std	1.15	0.42	2.91	Error std	1.1	0.7	4.15
U.exp.	Control	Comp.14	Comp.14	U.exp.	Control	Comp.15	Comp.15
	(mg)	(mg)	%I		(mg)	(mg)	%I
1	17.2	6.80	60.47	1	11.5	4.30	62.61
2	14.6	9.10	37.67	2	13.4	0.4	97.01
3	16.10	7.90	50.93	3	12.1	2.60	78.51
4	12.70	6.10	51.97	4	10.2	5.40	47.06
5	14.0	3.90	72.14	5			
Media	14.92	6.76	54.64	Media	11.80	3.18	71.30
Error std	0.78	0.87	5.70	Error std	0.66	1.08	10.71
U.exp.	Control	Comp.16	Comp.16	U.exp.	Control	Comp.17	Comp.17
	(mg)	(mg)	%I		(mg)	(mg)	%I
1	14.60	2.0	86.30	1	9.8	3.7	62.24
2	18.70	1.40	92.51	2	10.7	3.0	71.96
3	16.10	1.10	93.17	3	10.3	5.2	49.51
4	14.60	3.0	79.45	4	13.0	3.50	73.08
5	13.0	4.70	63.85	5	12.5	2.70	78.40
Media	15.4	2.44	83.06	Media	11.26	3.62	67.04
Error std	0.96	0.65	5.40	Error std	0.62	0.43	5.10

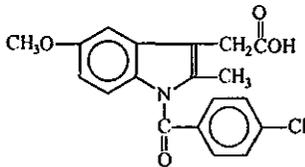
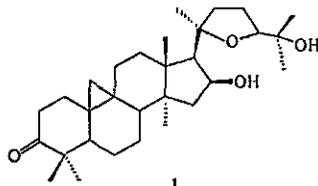
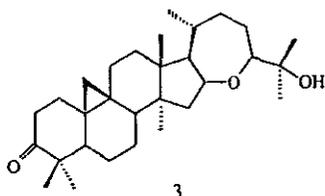
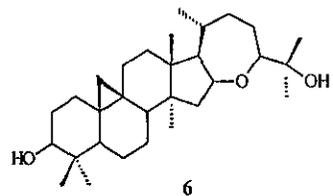
TABLA 15. Continuación.

DERIVADOS ARGENTATINA B				DERIVADOS ARGENTATINA A			
U.exp.	Control	Comp.20	Comp.20	U.exp.	Control	Comp.21	Comp.21
	(mg)	(mg)	%I		(mg)	(mg)	%I
1	7.00	1.60	77.14	1	14.2	5.8	59.15
2	8.20	3.10	62.20	2	14.70	5.4	63.27
3	6.50	1.40	78.46	3	14.70	5.3	63.95
4	4.70	1.70	63.83	4	14.20	8.2	42.25
5	13.00	1.60	87.69	5	13.0	5.8	55.38
6	12.00	2.40	80.00				
7	9.70	0.80	91.75				
8	12.70	5.10	59.84				
Media	9.23	2.54	75.11	Media	14.16	6.1	56.80
Error std.	1.10	0.47	3.78	Error std.	0.31	0.53	3.95
U.exp.	Control	Comp.22	Comp.22	U.exp.	Control	Comp.23	Comp.23
	(mg)	(mg)	%I		(mg)	(mg)	%I
1	13.30	2.60	80.45	1	7.0	3.8	45.71
2	11.90	0.70	94.12	2	8.2	4.4	46.34
3	11.0	0.1	99.09	3	6.50	5.0	23.08
4	12.0	2.7	77.50	4	4.70	0.5	89.36
5	12.20	0.6	95.08	5	12.70	0.8	93.70
				6	12.0	1.4	88.33
				7	9.7	1.9	80.41
				8	8.68	4.4	49.31
				Media	8.68	2.77	64.53
				Error std.	1.1	0.23	9.37
U.exp.	Control	Comp.24	Comp.24	U.exp.	Control	Comp.24	Comp.24
	(mg)	(mg)	%I		(mg)	(mg)	%I
1				1	147.6	2.0	86.45
2				2	18.7	1.3	93.05
3				3	16.1	1.3	91.93
4				4	14.6	0.7	95.21
5				5	13.	1.1	91.54
				Media	15.4	1.28	91.63
				Error std.	0.96	0.21	1.44

TABLA 15. Continuación.

DERIVADOS ARGENTATINA B				DERIVADOS ARGENTATINA A			
				U.exp.	Control	Comp.25	Comp.25 (D)
					(mg)	(mg)	%I
				1	17.7	1.3	92.65
				2	16.1	1.9	88.19
				3	14.6	1.5	89.72
				4	16.7	3.0	82.03
				5	12.9	2.6	79.84
				Media	13.6	2.06	86.49
				Error estándar	2.72	0.32	2.402

TABLA 16. Efecto inhibitorio (%) de las argentatinas A (1), B (3) y D (6) en el edema inducido con TPA.

COMPUESTO	 INDOMETACINA		 1	
DOSIS (mg/Oreja)	% INHIBICIÓN ±ES	DI <sub>50</sub>	% INHIBICIÓN ±ES	DI <sub>50</sub>
0.05	26.12 ± 4.2		39.86 ± 11.0	
0.1	46.01 ± 12.6 *	0.15	47.95 ± 4.8 *	0.11
0.5	60.42 ± 2.7 *	(0.046-55)	62.38 ± 5.5 *	(0.03, 0.36)
1.0	93.82 ± 1.4*		83.65 ± 2.2 *	
EC. DE REGRESION	%I = 85.8416 + 44.9986 logC		%I = 78.4454 + 30.7467 logC	
COMPUESTO	 3		 6	
DOSIS (mg/Oreja)	% INHIBICIÓN ±ES	DI <sub>50</sub>	% INHIBICIÓN ±ES	DI <sub>50</sub>
0.05	39.44 ± 3.0 *		15.13 ± 4.1	
0.1	60.85 ± 6.4 *	0.07	34.51 ± 4.01	0.35
0.5	83.53 ± 2.7 *	(0.01, 0.29)	51.72 ± 4.82 *	(0.16-0.73)
1.0	84.99 ± 4.7 *		69.02 ± 4.1 *	
EC. DE REGRESION	%I = 91.34771 + 39.5734 logC		%I = 67.4594 + 38.14908 logC	

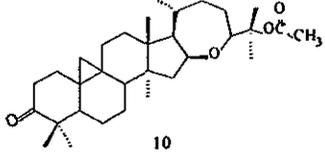
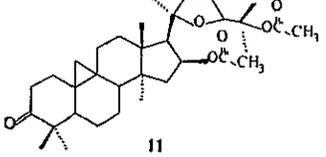
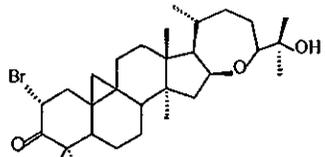
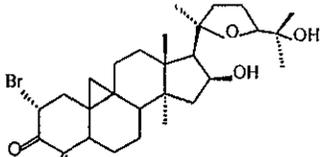
\* Prueba de Dunnet para datos no pareados (n=5; p<0.05) después de un ANADEVA. (Se comparan los mg de

edema entre el control y cada dosis de compuesto prueba).

De acuerdo con esto se observa que los compuestos aislados, presentan una inhibición de 84.2% para la argentinina A (1) y 85.6% para la argentinina B (3) que comparada con la argentinina D (6) presenta una inhibición del 69.1%, presentando una inhibición ligeramente menor a la indometacina.

Así mismo se realizó la evaluación de los derivados de las argentininas A (1) y argentinina B (3) cuyos resultados se presentan en la tabla 9.

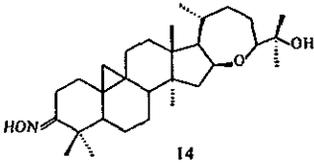
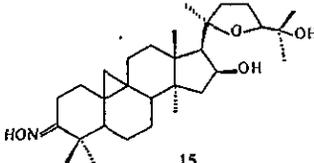
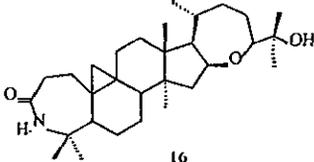
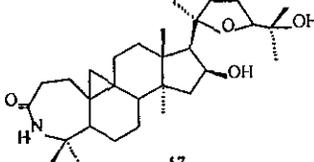
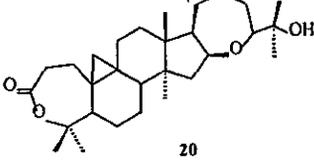
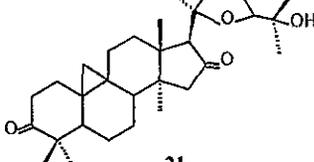
**TABLA 17.** Efecto inhibitorio (%) de los derivados de las argentininas A (1) y B (3).

DERIVADOS	ARGENTININA B		ARGENTININA A	
COMPUESTO	 10		 11	
DOSIS (mg/Oreja)	% INHIBICIÓN ±ES	DI <sub>50</sub>	% INHIBICIÓN ±ES	DI <sub>50</sub>
0.05	16.55 ± 3.2		17.10 ± 7.6	
0.1	17.40 ± 3.92	1.23	17.44 ± 10.2	0.31
0.5	31.21 ± 6.11 *	(0.047, .10)	52.73 ± 6.9 *	(0.13, 0.71)
1.0	51.39 ± 4.2 *		81.9 ± 2.3 *	
EC. DE REGRESION	%I = 45.5243 + 25.2105 logC		%I = 74.77 + 47.97 logC	
COMPUESTO	 12		 13	
DOSIS (mg/Oreja)	% INHIBICIÓN ±ES	DI <sub>50</sub>	% INHIBICIÓN ±ES	DI <sub>50</sub>
0.05	36.95 ± 8.52 *		31.71 ± 3.0*	
0.1	60.71 ± 9.7	0.084	40.33 ± 7.2 *	0.17
0.5	71.21 ± 5.9 *	(0.01, 0.45)	66.14 ± 7.4 *	(0.09, 0.28)
1.0	80.09 ± 2.9 *		77.19 ± 4.1 *	
EC. DE REGRESION	%I = 81.1552 + 29.097 logC		%I = 76.858 + 35.408 logC	

\* Prueba de Dunnet para datos no pareados (n=5; p<0.05 ) después de un ANADEVA. (Se comparan los mg de

edema entre el control y cada dosis de compuesto prueba).

TABLEA 17. Continuación.

COMPUESTO	 14		 15	
DOSIS (mg/Oreja)	% INHIBICIÓN ±ES	DI <sub>50</sub>	% INHIBICIÓN ±ES	DI <sub>50</sub>
0.05	37.8 ± 6.5 *		20.35 ± 6.83	
0.1	41.43 ± 10.7 *		23.82 <sup>i</sup> ± 3.7	0.238
0.5	50.37 ± 5.38 *		51.68 <sup>ii</sup> ± 11.5 *	(0.09, 0.62)
1.0	54.64 ± 5.7 *		71.3 <sup>iii</sup> ± 10.7 *	
EC. DE REGRESION	%I = 54.4733 + 12.9128 logC		%I = 83.25107 + 53.4496 logC	
DERIVADOS	ARGENTATINA B		ARGENTATINA A	
COMPUESTO	 16		 17	
DOSIS (mg/Oreja)	% INHIBICIÓN ±ES	DI <sub>50</sub>	% INHIBICIÓN ±ES	DI <sub>50</sub>
0.05	28.0 ± 3.9		13.38 <sup>iv</sup> ± 3.9	
0.1	57.02 ± 9.0 *	0.123	23.82 <sup>v</sup> ± 3.7	
0.5	71.16 ± 3.7 *	(0.03, 0.47)	33.13 <sup>ii</sup> ± 12.3 *	
1.0	83.06 ± 5.4 *		67.04 <sup>iii</sup> ± 5.1 *	
EC. DE REGRESION	%I = 84.1033 + 37.37 logC		%I = 67.58159 + 34.988 logC	
COMPUESTO	 20		 21	
DOSIS (mg/Oreja)	% INHIBICIÓN ±ES	DI <sub>50</sub>	% INHIBICIÓN ±ES	DI <sub>50</sub>
0.05	20.35 ± 5.3 *		13.58 ± 6.3	
0.1	43.47 ± 10.3	0.219	25.0 ± 5.3 *	
0.5	62.33 ± 6.42 *	(0.10, 0.46)	49.64 ± 2.1 *	
1.0	75.11 ± 3.7 *		56.80 ± 3.9 *	
EC. DE REGRESION	%I = 75.4771 + 38.7110 logC		%I = 58.1550 + 33.6885 logC	

\*\* Prueba de Dunnet para datos no pareados (n=5; p<0.05 ) después de un ANADEV. (Se comparan los mg de edema entre el control y cada dosis de compuesto prueba).

<sup>i</sup> Dosis de 0.125 mg/oreja.

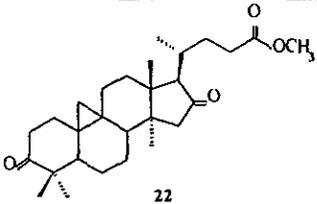
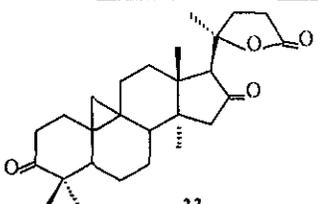
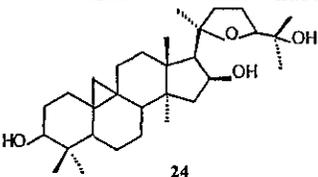
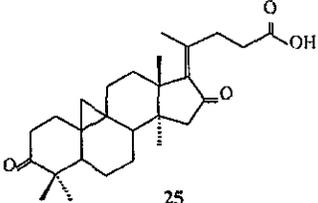
<sup>iv</sup> Dosis de 0.025 mg/oreja.

<sup>ii</sup> Dosis de 0.25 mg/oreja.

<sup>v</sup> Dosis de 0.05 mg/oreja.

<sup>iii</sup> Dosis de 0.5 mg/oreja.

TABLA 17. Continuación.

COMPUESTO	 22		 23	
DOSIS (mg/Oreja)	% INHIBICIÓN ±ES	DI <sub>50</sub>	% INHIBICIÓN ±ES	DI <sub>50</sub>
0.05	36.86 ± 3.2 *		32.50 ± 5.6	
0.1	48.97 ± 6.3 *	0.10	40.68 ± 6.1	0.28
0.5	74.81 ± 5.6 *	(0.04, 0.28)	52.7 ± 14.1 *	(0.15, 0.50)
1.0	89.25 ± 4.3 *		64.53 ± 9.3 *	
EC. DE REGRESIÓN	%I = 62.5265 + 22.96 logC		%I = 62.52 + 22.96 logC	
COMPUESTO			 24	
DOSIS (mg/Oreja)			% INHIBICIÓN ±ES	DI <sub>50</sub>
0.05			26.57 ± 2.9 *	
0.1			54.05 ± 7.4 *	0.11
0.5			85.51 ± 2.8 *	(0.04, 0.28)
1.0			91.63 ± 1.4 *	
EC. DE REGRESIÓN			%I = 96.2244 + 48.8991 logC	
COMPUESTO			 25	
DOSIS (mg/Oreja)			% INHIBICIÓN ±ES	DI <sub>50</sub>
0.05			46.55 ± 5.5 *	
0.1			55.35 ± 8.4 *	0.06
0.5			82.93 ± 4.5 *	(0.03, 0.13)
1.0			86.49 ± 2.4 *	
EC. DE REGRESIÓN			%I = 89.0676 + 32.6733 logC	

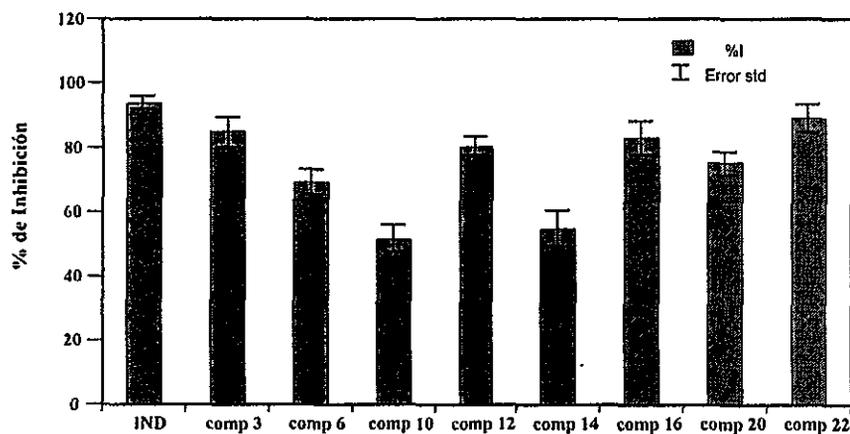
\* Prueba de Dunnet para datos no pareados (n=5; p<0.05) después de un ANADEV. (Se comparan los mg de edema entre el control y cada dosis de compuesto prueba).

**TABLA 18.** Efecto inhibitorio (%) de los epímeros 7 y 8 en el edema de la oreja de ratón inducido por

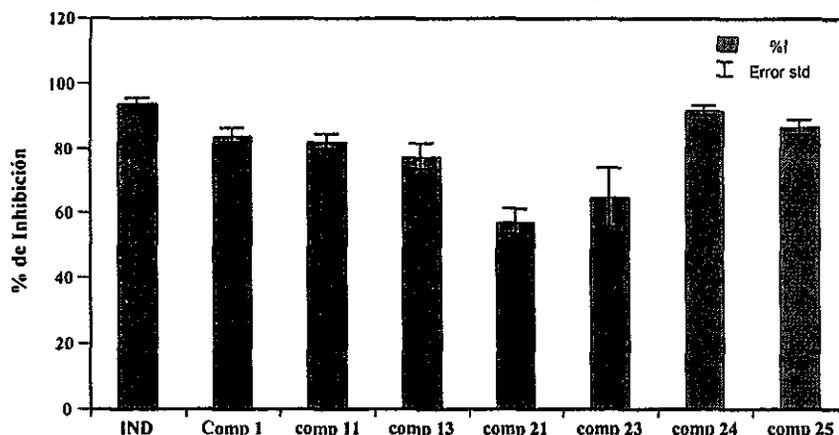
TPA.

COMPUESTO	7		8		
	DOSIS (mg/Oreja)	% INHIBICIÓN ±ES	DI <sub>50</sub>	% INHIBICIÓN ±ES	DI <sub>50</sub>
	0.05	8.9 ± 2.0		27.8 ± 3.3	
	0.1	12.2 ± 3.9	0.62	53.4 ± 1.1	0.147
	0.5	38.7 ± 1.4	(0.17, 2.2)	65.2 ± 2.6	(0.04, 0.51)
	1.0	65.4 ± 0.9		78.3 ± 1.5	
EC. DE REGRESIÓN	%I = 58.7311 + 42.2018 logC		%I = 78.2123 + 33.9036 logC		

**EFFECTO INHIBITORIO (%) DE LOS DERIVADOS DE LA ARGENTATINA B  
A UNA CONCENTRACIÓN DE 1 mg/oreja**



**EFFECTO INHIBITORIO (%) DE LOS DERIVADOS DE LA ARGENTATINA A  
A UNA CONCENTRACIÓN DE 1 mg/oreja**



**Figura 42.** Efecto inhibitorio (% Inhibición) de los derivados de las argentatinas A, B e Indometacina a una concentración de 1 mg/oreja.

La actividad antiinflamatoria de las argentatinas y sus derivados fue comparada con el grupo control correspondiente a los diferentes niveles de concentración evaluados mediante un análisis de varianza de una vía y una prueba de Dunnet a una  $p < 0.05$  y con  $n=5$ .

Del análisis estadístico realizado se observa una diferencia significativa para las dosis de 0.1, 0.5 y 1.0 mg/oreja en la indometacina.

Cabe mencionar que a las dosis de 0.5 y 1.0 mg/oreja todos los derivados de la argentatina B (3) y de la argentatina A (1) presentan diferencia significativa al efectuar la comparación con el grupo control; sin embargo, para la dosis de 0.5 y 0.1 mg/oreja no todos los compuestos tienen el mismo comportamiento, observándose que no existe diferencia significativa para los compuestos (11), (15), (17) y (23) derivados de (1) y para el compuesto (10) derivado de (3).

Los compuestos (1), (16) y (21) presentan el mismo comportamiento a dosis de 0.05 mg/oreja, y los compuestos (12) y (20) a concentración de 0.1 mg/oreja.

Como se observa en la figura 42 al realizar una comparación entre los compuestos 3 y 6 encontramos que al modificar el grupo funcional de la posición 3 del anillo A se modifica la actividad biológica, observándose una disminución (tabla 16), registrándose valores de  $85.0 \pm 4.7$  y  $69.02 \pm 4.1$ , a una dosis de 1 mg/oreja respectivamente. También se observa la importancia del alcohol en la posición C-25 de la argentatina B, ya que al realizar la acetilación en esa posición (10) la actividad anti-edematosa disminuye hasta un  $51.4 \pm 4.2$  porciento.

Una modificación mínima al sustituirse uno de los hidrógenos de la posición C-2 de la argentatina B (3) por un halogeno (12) no representa un cambio significativo en la actividad inhibitoria.

Por otra parte el aumento en el tamaño del anillo A de la argentatina B (3) produce un efecto en la respuesta inhibitoria detectando un ligero decremento en ésta, a dosis de 0.5 mg/oreja observando valores de  $83.53 \pm 2.7$ ,  $71.16 \pm 3.7$ ,  $62.3 \pm 6.42$  para (3), (16) y (20) respectivamente, determinando que el cambio de un átomo de nitrógeno por uno de oxígeno es importante cuando se trata de un anillo de siete miembros,

así como un incremento en el porcentaje de inhibición cuando el anillo D de la argentatina es hidrolizado para formar el compuesto (22).

Efectuando un análisis de la argentatina A (1) y su derivado (11) a una concentración de 0.5 mg/oreja se observa una disminución en la actividad biológica, sin embargo, se presenta mayor variabilidad en la respuesta, lo que denota un error estándar significativo, por otra parte al comparar (1) con el compuesto (24) a una concentración de 1 mg /oreja se observa un porcentaje de inhibición de  $83.65 \pm 2.2$  y  $91.63 \pm 1.4$  respectivamente, demostrando que el hidróxilo en posición C-3 es importante para la actividad antiinflamatoria; mientras que la sustitución del hidrógeno en C-2 (13) tiene un efecto negativo debido a que provoca la disminución de la actividad observándose un porcentaje de inhibición de  $77.19 \pm 4.1$  comparado con  $83.65\% \pm 2.2$  del compuesto original. Por otra parte, se determina que el grupo hidróxilo en la posición C-16 es importante debido a que se observa un valor de  $56.8\% \pm 3.9$  de inhibición cuando esté es oxidado para formar un grupo cetona presente en el compuesto (21).

Así mismo al comparar el compuesto (25) con la argentatina A (1) se observa una diferencia significativa en el porcentaje de inhibición dando valores de  $82.93 \pm 4.5$  y  $62.38 \pm 5.5$  a concentración de 0.5 mg/oreja, por otra parte se hace notar que al ser hidrolizado el anillo de cinco miembros del compuesto 23 para formar el ácido (25) se observa un incremento considerable en la actividad inhibitoria del edema, teniendo un valor de  $86.49\% \pm 2.4$ . Lo que significa que esta parte de la molécula es importante para la actividad biológica evaluada.

De la misma manera que los compuestos anteriores se llevó a cabo la evaluación de los epímeros *16 $\beta$ -hidroxi-24(R)*, *25-cetal-9 $\beta$* , *19 ciclolanostan-3-ona (7)* y *16 $\beta$ -hidroxi-24(S)*, *25-cetal-9 $\beta$* , *19 ciclolanostan-3-ona (8)*, presentando porcentajes de inhibición de  $65.4 \pm 0.9$  y  $78.30 \pm 1.5$  respectivamente, determinando la importancia que tiene la configuración de los carbonos en posición (24) de ambos compuestos, debido posiblemente a la interacción con alguna enzima.

## 5. CONCLUSIONES.

Los compuestos 7 y 8 son el resultado de reacciones de adición de acetona a la argentatina C y epiargentatina C respectivamente. Estas reacciones se efectúan durante la extracción industrial del hule, donde se utilizan cantidades masivas de acetona. Esta es la primera vez que se aísla la epiargentatina C, o alguno de sus derivados. Este hallazgo tiene implicaciones importante en la ruta biogénica de los triterpenos sintetizados por el *P. argentatum*.

Las argentatina A y B presentaron un perfil adecuado como agentes antiinflamatorios.

Con el fin de establecer una relación estructura actividad se obtuvieron 14 derivados a partir de las argentatins A y B. Este estudio demostró que las transformaciones más importantes son aquellas donde se lograron abrir los respectivos anillos heterocíclicos. Así los derivados mas potentes, obtenidos tanto para la argentatina A como de la argentatina B fueron aquellos donde se abrió el anillo etéreo de cinco miembros de la argentatina A y el de siete miembros de la argentatina B.

## BIBLIOGRAFÍA.

1. Martínez Cortés, F., Carlos Viesca Treviño, José Sanfilippo B., Javier Valdés Gutiérrez, Flores Olvera, H. *El Hule en México*. Ediciones Copilco S.A. México 1986. pp. 97-102.
2. Rollins, Reed C., *The guayule rubber plant and its relatives*, pp.3-72.
3. Proceedings of the International Guayule Conference Held in Saltillo, Coah, Agust 1977.
4. Rodríguez- Hahn, L., Romo de Vivar, A., Ortega A., Aguilar, M., y Romo, J. *Determinación de las estructuras de las argentatinas A, B y C del Guayule*. Revista Latinoamericana de Química, 1, 24-38 (1970).
5. Martínez-Vázquez, M. Martínez, R. and Toscano, A. *Preparation, spectral studies, and R-ray crystal Structures of (16S, 17R, 20S)-3-oxo-16-hydroxy-25 nor-lanostan-24-oic lactone (II) and (16S, 17R, 20S)-4. 16-dihydroxy-25-nor-3,4-seco-lanostan-3,24-dioic acid dilactone (III)*. Journal of Chemical Crystallography, 25 (6), 331-337 (1995).
6. Yasokawa, M. Takido, M. Takeuch, S. Nakagawa. *Sterol and Triterpene Derivatives from plants Inhibit the Effects of a Tumor Promotor and Sitosterol and Betulinin Acid Inhibit Tumor Formation in Mouse skin Two-Stage Carcinogenesis*. Oncology, 48, 72-76 (1991).
7. Safayhi H. and E.R. Sailer. *Anti-Inflammatory Actions of Pentaciclic Triterpenes*. Planta Medica, 63, 487-493 (1997).
8. Yoshimasa Kasahara, Kunio Kumaki and Jusuma Katagiri et al. *Carthami Flos Extracts and Its Component, Stigmasterol, Inhibit Tumor promotion in Mouse Skin Two-Stage Carcinogenesis*. Phytochemistry Research, 8, 327-331 (1994).
9. Della Loggia, R., Tubaro, A., Sosa, A., Becker, H., Saar. St., and Isaac, O. *The Role of Triterpenoids in the Topical Anti-Inflatory Activity of Calendula officinalis Flowers*, Planta Medica, 60, 516-520 (1994).

10. Recio M. C., Giner R. M., Máñez S. and Ríos J. L. *Structural Requirements for the Anti-Inflammatory Activity of Natural Triterpenoids*. Planta Medica, 61, 182-185 (1995).
11. Ken Yasakawa, Toshihiro Akihisa, Hirotohi Oinuma et al. *Inhibitory Effect of Taraxastane-Type Triterpenes on Tumor Promotion by 12-O-Tetradecanoyl phorbol-13-Acetate in two-Stage Carcinogenesis in Mouse Skin*. Oncology, 53, 341-344 (1996).
12. Rodríguez, E., Ph. D., *Allergic contact plant dermatitis caused by relatives of guayule*. School of Biological Sciences, University of California, Irvine, Ca., U.S.A. pp.103-112.
13. Espinosa Pérez Georgina E. Tesis de Maestría: *Algunas transformaciones químicas de la argentatina A*. Facultad de Química, UNAM. 1993.
14. Calzada, L., Salazar, Edith-Lucía, Téllez J., Martínez-Vázquez, M. and Martínez R. *Effect of tetracyclic triterpenes (argentatins A, B and D) on the estradiol receptor of hormone-dependent tumours of human breast*. Medical Science Research, 23, 815-816 (1995).
15. Genkichi Ohta, Katsumi Koshi, and Kazunaga Obata. *Investigations on Steroids. XI Synthesis of Steroidal Oxazole, Imidazole and Triazole*. Chemical Pharmacology Bulletin, 16 (8), 1487-1497 (1968).
16. Martínez, R., Arrellano García M., Martínez -Vázquez M. and Gallegos A. *Synthesis of Carbenoxolone Analogs from Argentatina B*. OPPI BRIEFS 25 (6), 698-702 (1993).
17. Peskar B.M., *Effect of carbenoxolone on prostaglandin synthesizing and metabolizing enzymes and correlation gastric mucosal carbenoxolone concentrations*. Scand J. Gastroenterol Suppl, 65, 109.14 (1980).
18. Komoroski R. A., Gregg E. C. and Shockor P. J., and Geckle M. *Identification of Guayule Triterpenes by Two Dimensional and Multipulse NMR Techniques*. Magnetic Resonance in Chemistry, 24, 534-543 (1986).

19. Romo de Vivar, A., Martínez-Vázquez, M., Matsubara, C., Pérez-Sánchez, G. and Joseph Nathan, P. *Triterpenes in parthenium argentatum, structures of argentatins C and D*. Phytochemistry, **29**, 915 (1990).
20. Romo de Vivar, A. y Matsubara Cecilia, *Los Terpenoides de Parthenium incanum Estudio Cristalografico por rayos-X de incalina y argentatina B*. Rev. Latinoamericana de Química, **17**, 1-2, 7-9 (1986).
21. Harold R. Nace and Iacona N. R. *The Reaction of 2- $\alpha$ -bromo-5 $\alpha$ -cholestan-3-one with Dimethyl Sulfoxide*. Journal Organic Chemistry **29**, 3498-3503 (1964).
22. Harold R. Nace and Olsen Barbara Ann. *Nor Steroid VI. Kinetic Studies on the Favorskii Rearrangement*. Journal Organic Chemistry, **32**, 3438-3442 (1967).
23. Fried Edwards. *Organic Reaction in Steroid*, Ed. by John Fried and John A. E. New York, 1972, pp.284; 292-295.
24. LucKner M., *Secondary Metabolism in Microorganism, Plants and animals*, Ed. Springer Verlag, 3<sup>a</sup> Ed., 1991, pp.183-237.
25. Jakupovic J., Pathak V.P., Bohlmann F. and Dominguez X.A., *Ambrosanolides from Parthenium lozaniaum*. Phytochemistry, **26**, 761-764 (1987).
26. Martínez, R., Martínez-Vázquez, M., y Zamorano-Macías, O., *New Mass Spectra (Electron Impact Mass Spectrometry of Triterpenoids from Guayule)*. Organic Mass Spectrometry **25**, 237-238 (1990)
27. Katzung Bertram G. *Farmacología Básica y Clínica*. Ed. El Manual Moderno, México 1987. pp.411-418.
28. Rainsford K.D., *Anti-inflammatory and anti-rheumatic Drugs*, Vol 11, CRC Press 1985. pp. 67-71.
29. Goodman and Gilman. *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. 9<sup>a</sup>Ed. Mc.Graw-Hill. Interamericana, pp. 643-660, 1996.

30. Recio María del Carmen, Giner S. Rosa María, Máñez, .Gueho J., Julien H. R., Hostettman K. and Ríos J. L. *Investigation on the Steroidal Anti-Inflammatory Activity of Triterpenoids from Diospyros leucomelas*. Planta Medica, **61**, 9-12 (1995).
31. Tshihiro Akihisa, Kin Yasurawa et al. *Triterpene Alcohols from the Flower of Compositae and their Anti-Inflammatory Effects*. Phytochemistry, **43** (6), 1255-1260 (1996).
32. Merlos M., Gómez L.A., Giral M. Vericat M.L, García-Rafanell J. Form, J. Br. J. Pharmacol **104**, 990-994 (1991).
33. Tubaro A., Dri P. Delbello G. Zilli, Della Loggia R. C., Agents Actions **17**,347-349 (1985).